



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
DR. ANTONIO FRAGA MOURET
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS TIPO OXA POR REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA EN ACINETOBACTER SP. DE
HEMOCULTIVOS DE PACIENTES DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
DR. ANTONIO FRAGA MOURET (2013–2016)

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA

DR. JOAO MARIO FLORES FERNÁNDEZ

TUTOR

DR. JORGE PROCOPIO VELÁZQUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Investigador Principal:

- Dr. Jorge Procopio Velázquez. Médico adscrito al servicio de infectología UMAE. Hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret del Centro Médico Nacional La Raza. IMSS. Seris S/N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, México D.F. Matrícula 99147766 Tel 57245900 Ext. 24363
Correo electrónico: jorge_kp@hotmail.com

Investigadores asociados:

- Dra. Elena Urdez Hernández. Médico adscrito al servicio de infectología de adultos del hospital de infectología Dr. Daniel Méndez Hernández. Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Jacarandas S/N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, Ciudad de México D.F. Profesora titular del curso de la especialidad de infectología adultos facultad de medicina UNAM. Matrícula 3264173 Teléfono: 55 832211 Correo electrónico: elena_urdez_hdz@yahoo.com.mx
- Dr. Daniel Pérez Laríos. Médico adscrito al servicio de infectología de adultos del hospital de infectología Dr. Daniel Méndez Hernández. Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Jacarandas S/N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, Ciudad de México D.F. Matrícula 99062676 Teléfono: 3316001574 Correo electrónico: danaztor@gmail.com

Colaboradores:

- QFB. María del Carmen Melchor Díaz. Jefa de sección de Bacteriología del Laboratorio Clínico. Hospital de Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret" Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Seris S/N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, México D.F. Teléfono: 57820129. Ext. 23090. Correo electrónico: calloyis@yahoo.com.mx

- QBP. Sandra Leticia Sánchez Tejeda. Adscrita al servicio de laboratorio clínico en el Hospital de Especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Seris S /N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, México D.F. Matrícula: 9215794. Teléfono celular: 044 55 28 11 32 73. Correo electrónico: Sandrita_sánchez_2001@yahoo.com.mx
- Dra. María del Carmen Silva Escamilla. Jefe de Epidemiología del Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández Centro Médico Nacional La Raza IMSS. Jacarandas S/N Col. La Raza. Del. Azcapotzalco, Ciudad de México D.F. Teléfono 5583 2211. Conmutador 578 21088 y 572 45900. Extensión: 23942. Correo electrónico: carmensilva18@gmail.com



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **3501** con número de registro **13 CI 09 002 149** ante
COFEPRIS

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA **11/08/2016**

DR. JORGE PROCOPIO VELAZQUEZ

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

Detección de carbapenemasas tipo OXA por reacción en cadena de la polimerasa en Acinetobacter sp. de hemocultivos de pacientes del hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret (2013–2016)

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro

R-2016-3501-95

ATENTAMENTE

DR.(A). ERNESTO ALONSO AYALA LÓPEZ

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3501

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

INDICE

RESUMEN	7
1. Antecedentes.....	9
2. Planteamiento del problema.....	15
3. Justificación	17
4. Objetivos	18
5. Hipótesis	19
6. Material y Métodos	19
6.1 Criterios de selección de muestras	19
6.1.1 Criterios de inclusión:	19
6.1.2 Criterios de exclusión:.....	19
6.1.3 Criterios de eliminación:	19
6.2 Población de estudio.....	19
6.3 Diseño.....	19
6.3.1 Tipo de Investigación.....	19
6.3.3 Período de estudio	19
6.4.1 Área de estudio	20
Tamaño de muestra:.....	20
Definición operacional de las variables.....	21
VARIABLES universales:	21
Variable Independiente:	21
Variable Dependiente:	22
7. Descripción del estudio.....	22
8. Análisis estadístico	27
9. Aspectos éticos.....	27
10. Recursos humanos.....	27
11. Recursos Financieros	28
12. Cronograma de actividades	29
13. Resultados	30
14. Discusión	32

15. Conclusión	34
16. Referencias	35
17. Anexos	39

RESUMEN

Detección de carbapenemasas tipo OXA por reacción en cadena de la polimerasa en *Acinetobacter sp.* de hemocultivos de pacientes del hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret (2013–2016)

Procopio-Velázquez J, Urdez-Hernández E, Pérez-Larios D, Melchor-Díaz MC, Sánchez-Tejeda SL, Silvia-Escamilla MC, Flores-Fernández JM.

Introducción: El uso de antibióticos ha permitido reducir la mortalidad e incrementar la sobrevida en las enfermedades infecciosas; sin embargo, el uso indiscriminado de antimicrobianos ha seleccionado microorganismos resistentes a varios antimicrobianos, principalmente en el ambiente intrahospitalario. *Acinetobacter baumannii* es un microorganismo oportunista nosocomial que ha desarrollado resistencia a diferentes antimicrobianos, entre los que se incluyen los carbapenémicos. Los carbapenémicos representan el último recurso para el manejo de infecciones graves; la resistencia se genera cuando el microorganismo produce enzimas hidrolíticas, llamadas carbapenemasas. *Acinetobacter sp.* produce 3 tipos de carbapenemasas: A, B y en mayor abundancia la D, también conocida como oxacilinas (OXA). Las carbapenemasas A y B se pueden identificar por métodos fenotípicos; las tipo D requieren métodos moleculares. El conocer la frecuencia y tipo de OXA en la población de *Acinetobacter sp.* causante de infección en nuestro medio facilitaría un mejor abordaje terapéutico.

Objetivo General. Detectar la presencia de carbapenemasas tipo OXA (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en aislados de *Acinetobacter sp.* de hemocultivos de pacientes del hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret

Material y Métodos. Se realizó un estudio clínico, ambispectivo, transversal, descriptivo, que comprendió de Noviembre de 2013 hasta Julio de 2016 en aislados de *Acinetobacter sp* provenientes de hemocultivos. Se efectuó PCR punto final para la determinación de carbapenemasas tipo OXA (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58). Se aplicó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión según correspondió, expresado en frecuencia y porcentaje

Factibilidad y aspectos éticos: El estudio no se contrapuso a disposiciones de ley general de salud, ni al tratado de Helsinki. Los recursos institucionales fueron óptimos para el cumplimiento.

Palabras clave. *Acinetobacter sp*, carbapenemasas, OXA, PCR

1. Antecedentes

El uso de antibióticos ha permitido reducir la mortalidad e incrementar la expectativa de vida en las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el empleo indiscriminado de los antimicrobianos ha seleccionado microorganismos con un espectro de resistencia tan amplio que las infecciones intratables son una realidad (1)

La resistencia antimicrobiana es tá integrada como uno de los 28 riesgos mundiales por el Foro Económico mundial, dentro de la categoría social (2). Cuando el microorganismo es multidrogo-resistente (MDR), las opciones terapéuticas son mínimas o nulas con gran mortalidad. En Europa se estima que los microorganismos multidrogo-resistentes, como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, producen 25,000 muertes por año, con un costo económico aproximado de 28.7 billones de pesos anuales (3). En México se desconocen datos al respecto.

Las bacterias presentan resistencia antimicrobiana de dos tipos: intrínseca, es decir, inherente a sus características funcionales/estructurales, y adquirida, a través de mutaciones cromosómicas o transferencia de genes. Entre los mecanismos de resistencia bacteriana se mencionan, la producción de bombas de expulsión, pérdida de porinas, modificación de diana terapéutica, así como la producción de enzimas que hidrolizan antibióticos, de las cuales destacan las β -lactamasas por su capacidad de producir resistencia a la familia de antimicrobianos más utilizada, los β -lactámicos (1). La variedad de enzimas β -lactamasas es muy amplia; así, existen β -lactamasas con la capacidad de hidrolizar sólo penicilinas; otras con efecto sobre cefalosporinas, y otras que afectan carbapenémicos, conocidas como carbapenemasas.

Las carbapenemasas, de acuerdo a la clasificación de Ambler son de tres tipos: A, B y D . Las de tipo A son inhibidas por clavulanato; usualmente hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de manera más eficiente que los carbapenémicos, y son inhibidas por ácido borónico. Las de tipo B o metalo- β -lactamasas (MBLs) típicamente hidrolizan carbapenémicos de manera eficiente, no así aztreonam; son resistentes a inhibidores de betalactamasas e inhibidas por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La mayoría de las enzimas de Clase D u ox acilinasas (OXA) hidrolizan débilmente los carbapenémicos y no tienen inhibidor específico (4) (5). *Acinetobacter baumannii* se encuentra entre los microorganismos con mayor capacidad para generar multidrogo-resistencia incluyendo producción de carbapenemasas (6). Dicho microorganismo, ha emergido como un patógeno oportunista nosocomial de gran importancia, por su capacidad para sobrevivir por tiempos prolongados en el ambiente hospitalario, lo que promueve su diseminación (7). El género *Acinetobacter* comprende bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, no fermentadoras, no fastidiosas, no móviles, catalasa positiva, oxidasa negativa. Son identificadas como bacilos muy cortos y anchos difíciles de desteñir, por lo que pueden identificarse erróneamente como cocos Gram positivos. Se desarrollan en medios sólidos, como el agar sangre de carnero y soya tripticasa, a 37°C; forma colonias lisas, mucoides y grisáceas con un diámetro de 1.5 a 3 mm. *Acinetobacter sp.* es considerado un microorganismo ubicuo. Puede ser encontrado en individuos sanos como bioma normal de piel en el 44% de los casos, y en heces fecales en el 25%. En contraste, *A. baumannii*, la especie más importante del género *Acinetobacter* en el ambiente nosocomial, sólo representa el 0.5% como bioma de piel y 0.8% en heces fecales, entre personal de la salud

(7). El principal mecanismo de patogenicidad de *Acinetobacter sp* es su capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, entre los cuales destaca la resistencia a carbapenémicos. Esto dificulta el tratamiento, aumenta la estancia hospitalaria, la mortalidad y el costo, ya que los carbapenémicos son los antibióticos más potentes con que se cuenta y la última opción terapéutica de la familia de los β -lactámicos para microorganismos MDR (7). De acuerdo a la resistencia, podemos reconocer tres tipos de *Acinetobacter*: multidrogo-resistentes, extremadamente-resistentes (XDR) y pandrogo-resistentes (PDR). Los MDR son los microorganismos con resistencia al menos a un antimicrobiano de tres familias diferentes; los XDR, son resistentes casi a todos los antimicrobianos excepto 2 antibióticos de dos diferentes familias, en donde la característica es su resistencia a carbapenémicos pero conservan sensibilidad a colistina y tigeciclina; los PDR son resistentes a todos los antimicrobianos (8).

Desde el punto de vista epidemiológico la frecuencia de resistencia en *A. baumannii* debe tomarse con reserva ya que no ha sido obligatorio reportarla en la mayoría de los países. De acuerdo al programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY entre 2001 – 2004, la resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos fue la siguiente: a nivel mundial, 19.25% y 22.25% para imipenem y meropenem, respectivamente; en Latinoamérica de 14% para imipenem y 16% para meropenem (9); en México, de acuerdo al MYSTIC (Meropenem Y early Susceptibility Test Information Collection) en 2004 la resistencia osciló de 10 – 15%.

La tendencia general evidencia que *A. baumannii* ha disminuido su sensibilidad a carbapenémicos, ya que en 1998 sólo un 5.9% fue resistente, mientras que

para el 2004 la tasa aumentó a 28.6%. De acuerdo al estudio de vigilancia de resistencia a antimicrobianos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante el 2010, en Latinoamérica las tasas de resistencia registradas fueron muy variables con máxima de 90% (10) (11).

En Europa de acuerdo al proyecto de vigilancia sobre enterobacterias productoras de carbapenemasas (EuSCAPE Project), sólo 21 de 38 países participantes cuentan con laboratorio de referencia nacional con capacidad de reportar aislados de *Acinetobacter* resistentes a carbapenémicos (ARC); sin embargo, sólo 10 los reportan obligatoriamente. El hecho de que el reporte y vigilancia de aislados de *Acinetobacter* no sea realizada de manera rutinaria, hace que la epidemiología permanezca incierta; sin embargo, se estima que ARC está diseminado en Europa (12). Durante los años 2012 - 2013 las tasas de resistencia reportadas también son diversas y permiten observar como en algunas áreas se han mantenido sin fenotipo de resistencia a carbapenémicos (Noruega), mientras en otras porcentajes tan altos como 90% han sido constantes (Grecia) (13).

En Asia utilizando aislados de la Red de Vigilancia de Patógenos Resistentes (Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens "ANSORP"), durante 2011 la resistencia a carbapenémicos fue del 82.5% (14) (15). En China dicha tasa aumentó del 14.8% durante el 2008 a 90.8% en el 2011. (16). En Corea del Sur, Turquía y Taiwán las prevalencias superaron al 50% (17) (18). En los Estados Unidos de América la resistencia osciló del 70 al 97% (19) (20) y en México fue del 8% durante el 1999 y del 88% en el 2011, para meropenem (21). El fenotipo de resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter sp.* se asocia a la producción de enzimas, clase D, tipo OXA u oxacilinasas (22). De estas existen

más de 350 subtipos, clasificadas de manera general como enzimas de espectro reducido y de amplio espectro. Los subgrupos de mayor importancia clínica por su amplia diseminación son OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58, todos reportados en el género *Acinetobacter*. A excepción de OXA-51 que es intrínseca de *A. baumannii*, el resto son adquiridas (23) (24) (25). Las características generales de las carbapenemasas tipo OXA son las siguientes: hidrolizan penicilinas (benzilpenicilina, ampicilina, piperacilina y ticarcilina) así como las cefalosporinas de espectro reducido (cefalotina); no hidrolizan los β -lactámicos de amplio espectro (ceftazidima, cefotaxima) ni aztreonam; tienen actividad hidrolítica baja para carbapenémicos; con mayor afinidad para imipenem, razón por la que se ve afectado en mayor medida en comparación al meropenem. (26)

A diferencia de las carbapenemasas de clase A y B, las cuales pueden ser determinadas por métodos fenotípicos, las carbapenemasas de tipo OXA requieren de métodos moleculares para su correcta identificación siendo la sensibilidad y especificidad de estas técnicas del 100%. (5) (27). Entre estas técnicas se cuenta con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la identificación completa del gen, considerada actualmente como método de elección (27). Los resultados se obtienen en 4 – 6 horas y pueden ser seguidas de secuenciación, en caso requerido. Las principales desventajas son el costo alto, el requerimiento de un alto grado de experiencia y la incapacidad para detectar genes nuevos no identificados (28) (29).

Desde la perspectiva epidemiológica, las oxacilinasas en *Acinetobacter sp.* han sido descritas al rededor del mundo como reportes aislados, incluyendo Latinoamérica. En Venezuela recientemente se reportó que el 96.6% de 60 aislados produjo oxacilinasas: OXA-23, 93.4%, y OXA-58, 6.6% (30). En México

solo existe un reporte de un centro hospitalario, en el que 148 de 303 *Acinetobacter baumannii* (49%) codificaron para OXA-72 (enzima miembro del subgrupo OXA-40) (31).

Por lo tanto, la información sobre prevalencia de oxacilinasas en *Acinetobacter sp* en nuestro país es pobre. El conocimiento sobre este rubro ayudaría al actuar clínico, ya que, al conocer el tipo de resistencia y mecanismo específico se podría instaurar de forma temprana el manejo de las infecciones relacionadas a dicho microorganismo con la consecuente reducción del tiempo de estancia, mortalidad y costo inherentes.

2. Planteamiento del problema

Acinetobacter sp. es un patógeno oportunisto nosocomial causante de infecciones en pacientes críticamente enfermos, que conlleva una prolongada estancia hospitalaria, alta mortalidad y elevado costo. Esto como consecuencia de la capacidad del microorganismo para generar resistencia a los antimicrobianos, característica que se ha incrementado a partir del 2010, con tasas de resistencia hasta del 90% en algunas comunidades. Hasta hace poco los carbapenémicos fueron el tratamiento de elección. Sin embargo, el microorganismo ha generado oxacilinasas que hidrolizan el fármaco, las cuales se han reportado mundialmente, son diversas y la mayoría transferidas por plásmidos. Para la detección de estas oxacilinasas los perfiles de resistencia fenotípicos no son útiles, y por lo tanto para su detección óptima se requiere del uso de herramientas moleculares (PCR), para determinar la presencia de genes de resistencia, cuyo costo ha limitado el conocer su frecuencia. La mayoría de los estudios que reportan la presencia de oxacilinasas carecen de información acerca del tipo de muestra clínica del cual se realizó la identificación, y en otros casos los aislados provinieron predominantemente de muestras de secreciones donde la probabilidad de colonización es muy alta, pocos estudios toman en cuenta aislados invasivos, es decir, de muestras clínicas que representan verdaderos patógenos (como hemocultivos), además la metodología que utilizan en la mayoría de los estudios no identifica las oxacilinasas de mayor importancia clínica (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58) o lo hacen parcialmente. Por lo tanto, la información obtenida durante la realización de este proyecto, permitiría conocer con certeza la proporción de las carbapenemasas tipo OXA de mayor importancia clínica (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58) en aislados invasivos, es decir, verdaderos patógenos y no

colonizantes de *Acinetobacter sp*, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para su identificación (PCR) y no solo inferencia por métodos fenotípicos, esto hasta el momento no ha sido documentado de manera clara y en México la información es escasa, reportándose solo 1 estudio, con el mismo sesgo de selección previamente mencionado

Pregunta de investigación

¿Cuáles serán las carbapenemasas de tipo OXA (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA 58) detectadas por PCR en aislados de *Acinetobacter sp* de hemocultivos de pacientes del Hospital de Especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret en el periodo de 2013 a 2016?

3. Justificación

Los datos obtenidos durante la realización del presente proyecto serían de gran utilidad en nuestra unidad por los siguientes motivos:

- 1) Aumentaría la base de información existente sobre las OXAs de importancia clínica más prevalentes en nuestro medio (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58)
- 2) Los datos serían muy confiables ya que procederían de microorganismos invasivos (hemocultivos) y no de colonizantes
- 3) Clínicamente el conocimiento del tipo de resistencia y mecanismo específico ayudaría al médico para instaurar de forma temprana el manejo adecuado de las infecciones relacionadas a este microorganismo, dándole la pauta para elegir, incluso de forma empírica el tratamiento apropiado, conllevando a una optimización de antimicrobianos y reducción del tiempo de estancia hospitalaria, mortalidad y costos.
- 4) Reforzaría al comité de infecciones nosocomiales para implementar medidas de vigilancia y control, evitando así la diseminación del microorganismo y de genes de resistencia de manera horizontal.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Principal

Detectar la presencia de carbapenemasas tipo OXA (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58) mediante la técnica de PCR en aislados de *Acinetobacter sp.* de hemocultivos de pacientes del hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret

4.2 Objetivos secundarios

- Determinar la principal carbapenemasa tipo OXA encontrada en los aislados de *Acinetobacter*

5. Hipótesis

De acuerdo a la variabilidad reportada esperamos detectar la presencia de carbapenemasas tipo OXA (OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58) en más del 50% de los aislados.

6. Material y Métodos

6.1 Criterios de selección de muestras

6.1.1 Criterios de inclusión:

Bacterias aisladas de al menos un hemocultivo periférico de pacientes consecutivos y que fueron identificadas por el sistema automatizado Vitek 2® como *Acinetobacter sp.*

6.1.2 Criterios de exclusión:

Ninguno

6.1.3 Criterios de eliminación:

Pérdida de la viabilidad bacteriana durante su conservación

Pérdida de la información en relación al aislamiento microbiológico

6.2 Población de estudio

Aislados de *Acinetobacter sp.* provenientes de hemocultivos, obtenidos durante la vigilancia epidemiológica establecida a partir de Noviembre de 2013 y hasta la autorización del protocolo de investigación por el comité.

6.3 Diseño

6.3.1 Tipo de Investigación: Clínica, ambispectiva, transversal, descriptiva

6.3.3 Período de estudio: Noviembre 2015 a Julio 2016

6.4 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret del centro médico nacional la raza

6.4.1 Área de estudio: Laboratorio de reumatología y laboratorio de bacteriología del hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret.

Tamaño de muestra:

Utilizamos la fórmula para cálculo de tamaño de muestra para estimar una proporción de una variable cualitativa en una población finita:

$$n = \frac{N Z^2 pq}{d^2 (N-1) + Z^2 pq}$$

Donde:

n= tamaño de la muestra

N= tamaño de la población

Z= nivel de confianza: 1,96 para el 95% de confianza, 2,56 para el 99%

p= proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia

q= proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno de estudio (1-p)

d= nivel de precisión absoluta

Sustituimos valores, tomando 95% de confianza, una frecuencia de 50% y un error admitido del 5%.

$$n = \frac{N Z^2 pq}{d^2 (N-1) + Z^2 pq}$$

$$n = \frac{(38) (1.96)^2 (0.50)(0.50)}{(0.05)^2 (38-1) + (1.96)^2 (0.50) (0.50)}$$

$$n = \frac{(38) (3.8416) (0.25)}{(0.0025) (37) + (3.8416) (0.25)}$$

$$n = \frac{36.4952}{1.0529}$$

$$n = 34$$

Tipo de muestreo:

No probabilístico por conveniencia

Definición operacional de las variables

Variables universales:

Debido a que la población de nuestro estudio fueron cepas tomadas de hemocultivos y que el objetivo fue identificar genes de resistencia antimicrobianos, no se requirieron de variables universales, además en vista de que el tipo de estudio fue retrospectivo no se requirió de dicha información.

Variable Independiente:

Acinetobacter

- Definición conceptual: Género bacteriano del orden las Gammaproteobacterias que comprende bacilos Gram negativos, no

fermentadores, no móvil, aerobios estrictos con un componente de 39 – 47% de G/C en DNA. Se integra por una gran variedad de especies.

- Definición o operacional: Colonias lisas, mucoides y grisáceas de 1.5 – 3mm, que desarrollan en aerobiosis estricta en medios sólidos. Al teñir con Gram son bacilos cortos gramnegativos, catalasa positivo, oxidasa negativo, identificados a través de Vitek 2® como *Acinetobacter sp*

Tipo de Variable: Categórica Nominal

Indicador: Si o No

Variable Dependiente:

Carbapenemasa clase D (tipo OXA)

- Definición conceptual: betalactamasa transferible, capaz de hidrolizar la oxacilina, la cefotaxima y los carbapenémicos. Tiene un sitio activo constituido por serina pobremente inhibido por EDTA y ácido clavulánico.
- Definición operacional: Amplificación de los genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}*, *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-58}* por reacción en cadena de la polimerasa.

Tipo de Variable: Categórica Nominal, para cada una

Indicador: Si o No, para cada una

7. Descripción del estudio

Previa autorización del comité local de investigación del hospital de especialidades “Antonio Fraga Mouret” del centro médico nacional la raza, se investigaron los aislados clínicos de *Acinetobacter sp* obtenidos de hemocultivos e identificados por el sistema Vitek 2®. Se realizó amplificación de genes por Reacción en cadena de la polimerasa. La metodología de aislamiento,

identificación, conservación y reactivación de cepas así como el procedimiento de PCR se detallan a continuación:

Flujograma de trabajo

I. Aislamiento e identificación y susceptibilidad de *Acinetobacter sp* por el sistema automatizado Vitek2

- A partir del hemocultivo se sembró caldo Brain Heart Infusión (BHI)
- De medio BHI turbio se sembró en placas de gelosa sangre y agar cromogénico CPS por estría cruzada, y se incubó 24 h de 35 a 37°C.
- Se revisó la pureza de la cepa
- Se realizó tinción Gram y prueba de oxidasa, el género *Acinetobacter* es un bacilo corto Gram negativo y oxidasa negativo
- A partir de cultivos puros de 24h de cepas identificadas como bacilos Gram negativos oxidasa negativos se realizó una suspensión al 0.5 McFarland en solución salina estéril al 0.45% para realizar pruebas de identificación y de susceptibilidad con equipo Vitek 2® Bioréieux utilizando tarjetas de identificación GN y de sensibilidad AST-GN286.
- Los aislados identificadas como *Acinetobacter sp.* se conservaron

II. Método de conservación de cepas

Conservación a -20°C

- A partir de cultivos puros de 24h de *Acinetobacter sp.* se tomó con una asa una carga de microorganismos para inocular en tubos Eppendorf con caldo soya tripticaseína más glicerol al 5% y con caldo BHI con glicerol al 5%. La conservación fue a – 20°.

Conservación de 4 a 8°C

- A partir de cultivos puros de 24h de *Acinetobacter sp.* se resembró en dos tubos con agar soya tripticaseína para conservación en refrigeración de 4 a 8°C

III. Activación de cepas

- A partir de cepas congeladas a -20°C se tomó con hisopo estéril y resembró en caldo BHI de 24 a 48 h, incubando de 35 a 37°C.
- Se Observó turbidez y resembró en gelosa sangre y agar cromogénico CPS incubando de 24 a 48hrs a 35 - 37°C

IV. Purificación de cepas

- En caso de contaminarse la cepa durante el proceso de conservación, una vez activada la cepa, se escogieron colonias puras de *Acinetobacter* y resembró en gelosa sangre y agar cromogénico CPS. Se incubó 24h a 35 - 37°C

V. Detección de carbapenemasas tipo OXA por PCR

a. Identificación molecular *bla-oxa51* like

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante la técnica de tiocianato de guanidina (TG)

- a) Se cosechó una placa de *A. baumannii* y se re-suspendió en solución de lisis.
- b) Se adicionó 500 µL de GE (Guanidina 5 M y EDTA 0.1 M). Se homogenizó y adicionaron 25 µL de sarcosinato al 10 %, después se mezcló por inversión, 5 min a temperatura ambiente y se colocó en hielo 5 min.
- c) Se adicionaron 250 µL de acetato de amonio 7.5 M. Se mezcló por inversión y se volvió a colocar en hielo durante 5 min.

- d) Para la separación de las fases se colocaron 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1); se volvió a mezclar por inversión 5 min y después se centrifugó por 10 min a 11000 rpm.
- e) Se recuperó la fase acuosa y se repitieron los pasos **d** y **e**.
- f) A la fase acuosa se le adicionó isopropanol frío, mezcla v/v y se homogenizó por inversión suavemente hasta observar cómo se precipitó el DNA; después se colocó en hielo 5 min y se centrifugó a 11000 rpm.
- g) Después de centrifugar el sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 200 μ L etanol al 70%, 2 veces, centrifugando a 11000 rpm/ 10 min; la pastilla formada se dejó secar al aire
- h) Finalmente, la pastilla se disolvió con 100 μ L de agua y se midió a 260 nm para determinar la concentración de DNA y se guardó a -20°C .

a. Amplificación de *bla-oxa51* like

La detección del gen *bla-oxa51* se llevó a cabo usando la técnica de PCR con los iniciadores F : 5' –ATGACCATTMAARCRCTCTTACTTA-3' Y R : 5' - CTATAAAATACCTAATTMTTCTAA-3'. La amplificación se realizó en volumen final de 25 μ L; la mezcla de reacción contuvo 1 pM de cada uno de los iniciadores a una concentración de 80 a 100 pm.

El programa de amplificación que se utilizó fue: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; posteriormente 35 ciclos de desnaturalización a 94°C , 1 min; alineamiento, a 50°C , 1 min y por último la extensión a 72°C , 1 min, con una extensión final de 72°C por 7 min.

Los productos amplificados fueron resueltos por electroforesis en gel, a una concentración de agarosa del 1.6%, a 100 V y posterior revelación con bromuro de etidio al 1 %, en agua durante 10 min. El tamaño del amplificado fue de 825 pb.

a. Detección de genes *bla*_{OXA23LIKE}, *bla*_{OXA40LIKE}, *bla*_{OXA58LIKE}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SMP} asociados a carbapenemes.

La detección de genes asociados a carbapenemes *bla*_{OXA23LIKE}, *bla*_{OXA40LIKE}, *bla*_{OXA58LIKE}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SMP} se realizó por PCR utilizando iniciadores previamente reportados (Tabla A).

b. Identificación de los productos amplificados por PCR

La integridad del DNA se observó con la preparación de un gel de agarosa al 1%; se colocó 100 ml de TBE (Tris-Boratos-EDTA) 0.5X en un matraz Erlenmeyer de 250 ml; se adicionó 1g de agarosa, se mezcló y calentó en el horno de microondas a temperatura alta, evitando el sobrecalentamiento y la formación de burbujas, hasta que se obtuvo la completa disolución de la agarosa.

Se lavó cuidadosamente la cámara de electroforesis utilizando detergente líquido para eliminar la grasa y se enjuagó con abundante agua corriente. Se secó con un trapo suave y se colocó en una superficie nivelada. Se vació lentamente el volumen necesario, dependiendo del tamaño del receptáculo para el gel, en el depósito de la cámara de electroforesis, evitando la formación de burbujas. Se colocó el peine aproximadamente a 3 cm de uno de los extremos y se esperó por 20 minutos, para que se formara el gel; después se quitó el peine con cuidado para evitar la fractura o daño del gel.

La detección de los amplicones se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5 % utilizando como regulador TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) a 85 V durante 2 h 10min. Los marcadores de talla molecular empleados

fueron de 1 kb, 100 pb y 130 pb (Invitrogen®). Se reveló en una solución de bromuro de etidio durante 10 min. Se observó en un transiluminador de luz ultravioleta, se fotografió y se editó empleando el programa Adobe Photoshop CS®.

8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico con el paquete SPSS versión 20 en español para Windows, donde se aplicó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión según correspondió, expresado en frecuencia y porcentaje

9. Aspectos éticos

El presente estudio no se contrapuso a las disposiciones de la ley general de salud de nuestro país, ni a las recomendaciones del tratado de Helsinki. Con respecto al grado de riesgo para los participantes, debido a que se utilizaron muestras clínicas previamente tomadas se consideró un riesgo nulo. También se cumple con las normas, reglas e instructivos del Instituto Mexicano del Seguro Social en materia de investigación de salud. La aprobación del presente estudio compitió al comité local de investigación médica y al comité de ética del hospital de especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret del Centro Médico Nacional La Raza. Debido a que se trabajó con muestras clínicas no se requirió consentimiento informado.

10. Recursos humanos.

Dr. Jorge Procopio Velázquez asesor principal, realizó la logística de la metodología de investigación y coordinación del proyecto.

Dra. Elena Urdez Hernández co-asesor, realizó revisión y apoyo metodológico del proyecto de investigación

Dr. Daniel Pérez Larios asesor metodológico, realizó el análisis estadístico de los resultados.

QFB. María del Carmen Melchor Díaz y QBP. Sandra Leticia Sánchez Tejeda realizaron la identificación por sistema Vitek2 así como la conservación y reactivación de las cepas

Dra. Rosa González Vázquez llevó a cabo la detección de los genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}*, *bla_{OXA-51}* y *bla_{OXA-58}* por PCR (Biología molecular).

Dr. Joao Mario Flores Fernández llevó a cabo la recopilación de la información obtenida así como colaboró en la genotipificación de los aislados clínicos obtenidos

11. Recursos Financieros

El equipo necesario para la reacción en cadena de la polimerasa estaba disponible en el Laboratorio de Reumatología (termociclador)

Los insumos para la reacción en cadena de la polimerasa fueron proporcionados por los investigadores participantes y colaboradores

El resto de los recursos necesarios fueron de uso común en el laboratorio de bacteriología.

12. Cronograma de actividades

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES 2015 - 2016												
	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE
RECOPILACION BIBLIOGRAFICA	■	■	■									
ELABORACIÓN DE PROTOCOLO				■	■	■	■					
AUTORIZACIÓN POR COMITÉ								■	■	■	■	
REACTIVACIÓN DE AISLADOS											■	
REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA											■	
RECOPILACIÓN DE DATOS CIENTIFICOS											■	
ANÁLISIS DE RESULTADOS											■	
DISCUSIÓN DE RESULTADOS											■	
ELABORACIÓN DE TESIS												■
PUBLICACIÓN DE TESIS												■

13. Resultados

Se obtuvieron 34 aislados de hemocultivos perifericos, los cuales fueron identificados por el sistema Vitek2 como género *Acinetobacter*, solo se identificaron dos tipos de especies siendo estas el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) y *haemolyticus*. 4 de los aislados fueron eliminados por pérdida de viabilidad durante la conservación, otros 4 aislados fueron eliminados debido a que correspondían a duplicación del mismo paciente. Se realizó detección de genes de resistencia para producción de carbapenemasas de tipo D en 26 aislados, de los cuales 23 es decir el 88% fueron pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* y 3 (12%) a la especie *haemolyticus*. En el gráfico 1, ubicado en el Anexo 2 podemos observar la distribución de las 2 especies de *Acinetobacter* mencionadas.

En cuanto a la frecuencia de detección de carbapenemasas, 21 aislados (80.7%) presentaron detección para cualquier tipo de oxacilinasas, en 5 aislados (19.3%) no se logró detectar la presencia de oxacilinasas. De los 21 aislados que fueron positivos a la detección de carbapenemasas de clase D, 18 (85.7%) pertenecían al complejo ACB y 3 (14.3%) a la especie *haemolyticus*. De estos 21 aislados, 8 (38.1%) fueron positivos para detección de OXA-51, 11 (52.4%) para detección de OXA-23 y 16 (76%) para OXA-40, no se realizó detección para OXA-58 debido a inconvenientes técnicos. En el gráfico 2, ubicado en el Anexo 2 podemos observar el porcentaje de detección de oxacilinasas en los aislados.

Tomando en cuenta los 18 aislados positivos para la detección de carbapenemasas clase D y que pertenecieron al complejo ACB, 1 aislado

presentó las 3 oxacilinasas en estudio, 10 presentaron 2 oxacilinasas y 7 presentaron 1 oxacilinasas. De estos mismos 18 aislados, 7 presentaron OXA-51. Tomando en cuenta los aislados de *A. haemolyticus*, todas presentaron solo una oxacilinasas, y 1 de ellas era tipo OXA-51.

14. Discusión

De los resultados obtenidos encontramos que la especie de *Acinetobacter* aislada con mayor frecuencia pertenece al grupo de ACB (88.5%) y solo el 11.5% pertenecen a una especie diferente, la cual en el 100% de los casos fue *A. haemolyticus*. De todos los aislados se encontró una frecuencia de detección de carbapenemasa clase D de 80.7% y solo una quinta parte de los mismos (19.3%) no tuvieron detección de oxacilinasas. La oxacilinasas encontrada con mayor frecuencia fue OXA-40 (76%), seguida por OXA-23. De los aislados del complejo ACB solo el 38.8% presentaron OXA-51, así mismo un aislado de especie *haemolyticus* fue positivo también para OXA-51. Al analizar estos resultados y compararlos con lo reportados en la literatura internacional podemos encontrar discordancia, esto debido a que en reportes previos se ha encontrado a OXA-23 como la enzima de clase D más frecuente en aislados de *Acinetobacter*, mientras que nosotros encontramos mayor frecuencia de detección de OXA-40. Por otro lado la mayoría de los reportes refieren una prevalencia importante de OXA-51, casi a la par de OXA-23, demostrando con esto que la mayoría de sus aislamientos corresponden a una especie específica del complejo ACB, es decir, *Acinetobacter baumannii* (ya que OXA-51 es intrínseca de esta especie), sin embargo en nuestros resultados menos de la mitad de los aislados fueron positivos para esta OXA, lo anterior indicaría que solo 38.8% de nuestros aislamientos identificados por el sistema Vitek2 como complejo ACB son especie *baumannii*. Llama también la atención que uno de los aislados identificados como *A. haemolyticus* fue positivo para OXA-51, lo cual indicaría un error de identificación del sistema Vitek2, siendo en realidad especie *baumannii*.

Al comparar nuestro estudio con el único reporte realizado en México encontramos concordancia con los resultados. En este estudio llevado a cabo por Alcántar-Curiel et al (31) se reporta que 49.6% de los aislados estudiados portan la oxacilinasasa OXA-72 (la cual es un subtipo del grupo OXA-40), demostrando así que el principal tipo de OXA corresponde al grupo OXA-40, lo cual coincide con nuestros resultados aunque en una proporción menor, esto último podría estar condicionado por el período en el cual se realizó el estudio, siendo que con el paso del tiempo aumentó la proporción de OXA-40, es to debido a que el estudio mencionado se llevó a cabo de los años 2004 a 2011, mientras que el nuestro se realizó de 2013 a 2016.

Entre las limitaciones del presente estudio se encuentra la pérdida de la viabilidad y la repetición de algunos aislados, así como la falta de realización de detección de OXA-58. Consideramos que el número de aislados es significativo debido a que el tiempo de vigilancia es suficiente para determinar con certeza la frecuencia de oxacilinasas en nuestro hospital, además de que las muestras clínicas de donde se obtuvieron los aislados son representativas de verdadera infección, descartando así la posibilidad de colonización.

15. Conclusión

En conclusión, nuestro estudio a diferencia de lo reportado en la literatura internacional, muestra que en aislamientos invasivos del género *Acinetobacter*, la oxacilinas más prevalente es OXA-40, así mismo se demuestra que solo el 38% por ciento de los aislamientos del complejo ACB corresponden a *Acinetobacter baumannii*, con lo que el resto puede corresponder a la genespecie 3 o 13TU. Estos resultados podrían verse modificados con el aumento de la población, lo cual requeriría un mayor tiempo de vigilancia. El conocimiento del fenotipo de resistencia a antimicrobianos así como del mecanismo específico de resistencia es necesaria en la práctica clínica y tiene gran importancia en las infecciones causadas *Acinetobacter* en pacientes críticamente enfermos. Recomendamos medidas de aislamiento de contacto en todo paciente con infección por este microorganismo para evitar su diseminación y la posibilidad de un brote epidémico. Es necesario conjugar esfuerzos con unidades de investigación para poder determinar la prevalencia de los mecanismos de resistencia bacteriana y poder realizar un óptimo abordaje terapéutico y uso adecuado de antimicrobianos, limitando así tiempo de estancia intrahospitalario, mortalidad, costos y transmisión de genes de resistencia de manera horizontal. Se requieren más estudios realizados en nuestro país para poder tener una mayor precisión de la prevalencias de los mecanismos de resistencia.

16. Referencias

1. Blair J M, Webber M A, Baylay A J, Ogbolu D O, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(1):42-51. .
2. World Economic Forum. *Global Risks 2015: Insight Report*. 2015; Disponible en www.weforum.org/reports/global-risks-report-2015. .
3. Davies, S.C. *Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance*. *Annu Rep Chief Med Off - Vol Two*. 2013;Chapter 5.:73. .
4. Thomson K S. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1019-25. .
5. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(7):524-34. .
6. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clin Microb Newsl* 2009; 31(8):55-62. .
7. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):538-82. .
8. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81. .
9. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3471-84. .
10. Casellas J M. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica* 2011;30(6):519-28. .
11. Labarca JA, Salles J, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*. 2014; 27:1-17. .
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenemase-producing bacteria in Europe: interim results from the European Survey on

carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project. Stockholm: ECDC; 2013. .

13. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014. .
14. Kim DH, Choi JY, Kim HW, Kim SH, Chung DR, Peck KR et al. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 2 in Asia and AbaR-type resistance islands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5239-46. .
15. Chung DR, Song JH, Kim SH, Huang SG, Wang H, So TM et al. High prevalence of multidrug-resistant non-fermenters in hospital acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(12):1409-17. .
16. Xu T, Xia W, Rong G, Pan S, Huang P, Gu B. A 4-year surveillance of antimicrobial resistance patterns of *Acinetobacter baumannii* in a university-affiliated hospital in China. *J Thorac Dis.* 2013;5(4):506-12. .
17. Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park KH, Jang HC. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Med J.* 2014;50(2):37-44. .
18. Lemos EV, de la Hoz FP, Einarson TR, McGhan WF, Quevedo E, Castañeda C, et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(5):416-23. .
19. Vaze ND, Emery CL, Hamilton RJ, Brooks AD, Joshi SG. Patient Demographics and Characteristics of Infection with Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Teaching Hospital from the United States. *Adv Infect Dis,* 2013;3:10-16. .
20. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM et al. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3849-54. .

21. Morfín-Otero R , Alcántar-Curiel M D, Rocha M J, Alpuche-Aranda C M, Santos-Preciado JI, Gayosso-Vázquez C et al . Acinetobacter baumannii infections in a tertiary care hospital in Mexico over the past 13 years. *Chemotherapy*. 2013;59(1):57-65. .
22. Brown S, Amyes S. OXA (β)-lactamases in Acinetobacter: the story so far. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jan;57(1):1-3. .
23. Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):241-63. .
24. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D β -lactamases: are they all carbapenemases? *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2119-25. .
25. Espinal P, Roca I, Vila J. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-baumannii Acinetobacter. *Future Microbiol*. 2011;6(5):495-511. .
26. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(3):373-83. .
27. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemother*. 2016;28:1-21. .
28. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods*. 2014;107:106-18. .
29. Meletis G, Tzampaz E and Sianou E. Phenotypic and Molecular Methods for the Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram Negative Nosocomial Pathogens. En: S hailendra K S (ed). *Trends in Infectious Diseases*. Croacia: InTech; 2014. pp.139-162. .
30. Cuaical-Ramos NM, Delgado-Borrego YA, Anzola-Anzola YM, Marcano-Zamora DM, Carlos-Torres L. Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de Acinetobacter baumannii de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 2012; 32:95-100. .
31. Alcántar-Curiel MD, García-Torres LF , González-Chávez MI, Morfín-Otero R, Gayosso-Vázquez C, Jarillo-Quijada MD et al . Molecular mechanisms

associated with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico. Arch Med Res. 2014;45(7):553-60. .

17. Anexos

Anexo 1

Tabla A. Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes asociados a resistencia a carbapenemes

Gen	Secuencia 5'---3'
<i>bla</i> _{OXA23LIKE} F	GATCGGATTGGAGAACCAGA
<i>bla</i> _{OXA23LIKE} R	ATTTCTGACCGCATTTCAT
<i>bla</i> _{OXA40LIKE} F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA
<i>bla</i> _{OXA40LIKE} R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT
<i>bla</i> _{OXA58LIKE} F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG
<i>bla</i> _{OXA58LIKE} R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC
<i>bla</i> _{IMP} F	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG
<i>bla</i> _{IMP} R	AACCAGTTTTGCCTTACCAT
<i>bla</i> _{VIM} F	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G
<i>bla</i> _{VIM} R	ATG AAA GTG CGT GGA GAC
<i>bla</i> _{SIM} F	TAC CAG GGA TTC GGC ATC G
<i>bla</i> _{SIM} R	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG
<i>bla</i> _{SMP} F	CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC
<i>bla</i> _{SMP} R	TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC

Tabla B. Condiciones de amplificación de genes asociados a resistencia a carbapenemes

Reactivo	Volumen
Regulador	2.5 µL
MgCl ₂	2.5 µL

dNTP'S	2.0 μ L
Iniciador R	1.0 μ L
Iniciador F	1.0 μ L
DNA	2.0 μ L
Taq Polimerasa	0.2 μ L

Anexo 2.



