**FORMATO 1**

**FORMATO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**SECCION A: DATOS GENERALES**

1. **Título o nombre del proyecto**

Evaluación de técnicas fenotípicas para la detección de Carbapenemasas en bacilos Gram negativos y confirmadas mediante PCR

1. **Línea de investigación de la Facultad/Área**

Ciencias Básicas: Microbiología-Biología Molecular

1. **Unidad académica (Facultad/Escuela profesional/otra)**

Escuela de Medicina Humana

1. **Equipo investigador**

* (Investigador principal): Mercado Martínez Pedro Estuardo, ID 000179131

<http://directorio.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do;jsessionid=10b1307a2e09367f9ffb6de17124?id_investigador=934>

* Co – investigador: Silva Chávez Amalia Celina: ID 000135543

<http://directorio.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do;jsessionid=e517e379152b166626923d1efa7a?id_investigador=214586>

* Asistente de Investigación: Quiñonez Cerna Claudio: ID 000209867

<http://directorio.concytec.gob.pe/appDirectorioCTI/VerDatosInvestigador.do;jsessionid=ec78720ef05fc7b2b1f034175672?id_investigador=48213>

* Estudiante tesista: Por Definir

1. **Institución y/o lugar donde se ejecutará el proyecto**

Parte Fenotípica: Laboratorio de Inmunología-UPAO

Parte Genotípica; Laboratorio Genética, Reproducción Asistida y Biología-Molecular, Universidad Privada Antenor Orrego.

1. **Duración (Fecha de Inicio y término)**

Setiembre 2020 a Setiembre 2021

**SECCIÓN B: PLAN DE INVESTIGACIÓN**

1. **Planteamiento y formulación del problema**

La identificación de EPC se lleva a cabo mediante sistemas automatizados mediante la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, que están basados en la reconstitución, con una suspensión bacteriana, de diferentes concentraciones de una serie de antimicrobianos liofilizados en unos paneles y su posterior lectura, realizando la interpretación de sensible, intermedio o resistente de acuerdo con los puntos de corte establecidos en cada caso. Además, tienen configurados unas recomendaciones de “sistemas expertos” que permiten inferir mecanismos de resistencia a través de las CMIs de los antimicrobianos obtenidas. Ejemplos de sistemas automatizados son: Wider, Vitek, MicroScan, Phoenix. Los métodos fenotípicos de identificación detectan la producción de una carbapenemasa por una cepa productora de esta enzima. En contraste con las técnicas moleculares tienen la ventaja de que no sólo detectan las carbapenemasas conocidas, sino que son capaces de detectar nuevas carbapenemasas. El principal inconveniente es que no son capaces de identificar con precisión la carbapenemasa producida.

Detectar la presencia de carbapenemasas y categorizar correctamente la sensibilidad a carbapenems en aislamientos clínicos sigue siendo un problema para muchos laboratorios de microbiología. Ya hemos reseñado varias técnicas fenotípicas para la detección de carbapenemasas que, de acuerdo a su descripción tienen distinta sensibilidad y especificidad; de ellas se han elegido tres técnicas que tienen cada una distinta aplicación en cuanto a la interpretación de resultados y que cada una ya ha sido validad mediante su sensibilidad y especificidad. Estas técnicas son: Método de Hodge modificado-HMT (CLSI, 2016), Tercera variación a la prueba de Hodge modificado usando agar Mac Conkey (Ocampo y col., 2015) y El Método de Inactivación de Carbapenem (CIM)(Kim et al., 2015).

**Formulación del problema**

### ¿Cuáles de las técnicas fenotípicas usadas para detectar carbapenemasas: Método de Hodge modificado-HMT, Tercera variación a la prueba de Hodge modificado usando agar Mac Conkey y el Método de Inactivación de Carbapenem (CIM), rinde mejor para detectar las clases de Carbapenemasas detectadas en bacilos Gram negativos, de origen intrahospitalario y que serán validadas mediante la técnica del PCR para los genes KPC, VIM, IMP, ¿NDM y OXA-48?

1. **Antecedentes**

Desde el principio de la aparición de los antibióticos llamó la atención sobre el riesgo de usar estos compuestos en forma indiscriminada, dado que tempranamente se reconoció la aparición de organismos resistentes. Su utilización creció rápidamente y en la actualidad la proporción de pacientes que reciben antibióticos en hospitales de especialidad es cercana al 50%, lo que significa que uno de cada dos pacientes internos recibe uno o más antibióticos lo que agravaría la aparición de la resistencia bacteriana; para lo cual se han definido políticas y recomendaciones por parte de la OMS.OPS, cuyo factor condicionante principal es el uso no prudente de los antimicrobianos, estrechamente relacionado con la inducción de la resistencia. Los resultados de estos fenómenos son tan preocupantes, que ya se considera como un grave problema de Salud Pública, cuyo control y manejo debe involucrar al estado, sus representantes y todos los estamentos de la sociedad(Pasteran et al., 2016).

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por la capacidad natural o adquirida de una cepa bacteriana a permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antimicrobiano. El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental, realizada por los antisépticos y desinfectantes, ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir eficazmente la acción bactericida de los antimicrobianos (Gastelo y col., 2016). La resistencia a antibióticos (RA), sobre todo la resistencia combinada a múltiples familias es una prioridad de primer orden para los enfermos, la comunidad, los profesionales sanitarios y la salud pública. En los últimos años la RA ha aumentado manifiestamente hasta convertirse en una emergencia sanitaria según todas las agencias internacionales de salud. Las enterobacterias son una de las familias bacterianas que presentan con mayor frecuencia resistencia a múltiples antibióticos (Oteo y col., 2014; Rodríguez y Col., 2014).

Las *Enterobacteriaceae* representan aproximadamente el 50% de los microorganismos de importancia clínica. *Escherichia coli ( E.coli* ) es la más importante y la más descrita como causa de patología en los seres humanos. La vía urinaria es el origen de la mayoría de las bacteriemias y su posterior diseminación a otros tejidos, así mismo constituyen una de las patologías infecciosas más frecuentes en la comunidad y en el intrahospitalario. Los antibióticos betalactamicos son el principal grupo de antimicrobianos y el más utilizado para el tratamiento; son activos frente a las Grampositivas, Gramnegativas y Espiroquetas. Su eficacia está en continuo reto debido a la emergencia de cepas bacterianas resistentes que producen Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), un grupo de enzimas producidas por bacilos Gram-negativos que hidrolizan Cefalosporinas de amplio espectro, los Monobactámicos y últimamente las Cefamicinas, pero no a los Carbapenèmicos. Están mediadas generalmente por plásmidos y derivan de otras enzimas con menor espectro hidrolítico. Resaltan en este grupo a las Cefotaximasas (CTX) (Gómez et al., 2013).

La aparición de las penicilinas en el año 1940 se vio aparejada con el descubrimiento de la resistencia bacteriana. Edward P. Abraham y Ernest Chain, quienes habían participado junto con Howard Florey y Heatley en la purificación y aplicación de las penicilinas, observaron en ciertos cultivos de Escherichia coli la inactivación de las soluciones de penicilinas por una sustancia producida por dichas bacterias. Años después, Kirby identificaría que existían cepas de *Staphylococcus aureus* que producían una sustancia capaz de inactivar las penicilinas, resultaron ser las penicilinasas, comúnmente llamadas las betalactamasas clásicas. Más adelante, con el surgimiento de nuevas penicilinas surgieron nuevas betalactamasas como las TEM-1 (amoxicilina); SHV 1-3 (aminopenicilinas, cefalosporinas de 1ra generación, carboxipenicilinas y las ureidopenicilinas). Se ha determinado que estas enzimas rompen al anillo beta lactámico e inactivan al betalactámico y no puedan unirse a su diana, la PBP (Gastelo y col., 2016).

En 1983, de una cepa de *Klebsiella ozaenae* se aisló una nueva betalactamasa producto de mutaciones de la SHV-1, la nombraron SHV-2, la misma que era capaz de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima) y el aztreonam; se les denominó betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Pena, 2016). Al año siguiente son aisladas, en Francia, cepas de *Klebsiella pneumoniae* con fenotipo similar, por una mutación de las TEM-2, fueron las TEM-3. Hasta finales de los años 90, la mayoría de las BLEE detectadas pertenecían a estas dos familias, que provenían, fundamentalmente, de brotes epidémicos nosocomiales. En el momento actual se han descrito más de 160 tipos de TEM y 100 tipos de SHV. Estas enzimas son de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación, lo que favoreció su rápida dispersión (Morejón, 2013).

Un nuevo tipo de BLEE aisladas de enterobacterias hace su aparición en 1989 de forma simultánea en Alemania, Argentina y Francia, fueron llamadas CTX-M y se comprobó que no tenían relación alguna con las BLEE descritas hasta ese momento; eran filogenéticamente diferentes a las TEM y SHV. En la actualidad se reconocen alrededor de 65 tipos de CTX-M. En el año 1991 se aislaron las primeras enzimas del grupo de las oxacilinasas (OXA), el reporte fue realizado en Ankara, Turquía, con un perfil superponible a las BLEE, pero aisladas más frecuentemente de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Continuamente se están descubriendo BLEE, algunas semejantes a las ya conocidas y otras con escasas homología genética a las anteriores, en la actualidad suman más de 200 tipos. Otras familias de BLEE menos prevalentes son las PER, VEB-1 y BES-1, SFO-1, TLA-1, CME-1, GES/IBS (Morejón, 2013).

En los últimos años estamos asistiendo al surgimiento de bacterias con producción de un nuevo tipo de betalactamasas; las carbapenemasas, enzimas que confieren resistencia a todos los antibióticos β-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos. Estas enzimas se han encontrado en numerosas especies de enterobacterias, pero con diferencia el mayor impacto epidemiológico y clínico lo encontramos en los últimos años en el patógeno *Klebsiella pneumoniae,* siendo responsables de brotes endémicos y casos aislados en diversas regiones del mundo. Se han identificado mecanismos de transmisión horizontal mediadas por transposones que contienen pequeños segmentos de material genético responsables de la producción de carbapenemasas y con capacidad de transmisión vía clonal (Oteo y col., 2014; Rojo y col., 2018). Actualmente se reconocen tres clases de carbapenemasas: Clase A (serincarbapenemasas), principalmente enzimas del tipo KPC. Clase B o metalobetalactamasas (MBL) dependientes de Zinc, principalmente enzimas del tipo VIM, IMP y NDM. Clase D o serin-carbapenemasas (principalmente OXA-48) (Morejón, 2013).

En 1991, en Japón, se describió en *P. aeruginosa,*  *S. marcescens*, *Pseudomonas putida* y *Achromobacter xyloxoxidans* una enzima que se correspondía con una metalo-betalactamasa, y por tanto de clase B o grupo 3 de Bush y Jacoby, a la que se denominó IMP-1. El gen responsable se encontraba localizado en un integrón incluido en plásmidos trasferibles. En la actualidad se conocen hasta 29 variantes en el grupo de las enzimas IMP y se han descrito con más frecuencia en *P. aeruginosa* que en las enterobacterias. Asimismo, en el año 1997 se detectó en Italia, también en *P. aeruginosa*, una enzima, igualmente de clase B, de carácter transferible que recibió el nombre de VIM-1 y cuyo gen se asocia a integrones de clase 1. Esta enzima se detectó con posterioridad en Corea en *S. marcescens* y en Grecia en *E. coli* y en *K. pneumoniae*. En España se han descrito tanto enzimas del tipo IMP, como del tipo VIM en diferentes enterobacterias *(K. pneumoniae, E. coli y E. cloacae)* , *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Muñoz y col., 2017).

El aumento en la aparición de nuevas betalactamasas y, en especial, las carbapenemasas ponen en alerta del grave problema de salud pública que se generaría si se siguen diseminando. Las enterobacterias productoras de estas enzimas se han convertido en un problema clínico y de salud pública emergente, en continua evolución y con una alta velocidad de diseminación intra e interhospitalaria, de difícil control y tratamiento. Este incremento se debe principalmente a 2 vías de dispersión, en muchas ocasiones coexistentes: la adquisición horizontal de genes que codifican las carbapenemasas y la diseminación clonal de clones productores de estos enzimas especialmente exitosos. Desde un punto de vista clínico, los principales factores de riesgo para la colonización e infección por estas cepas son la estancia en la UCI, la administración de antibioterapia de amplio espectro de forma prolongada, la cirugía, los procedimientos instrumentales invasivos y la inmunosupresión (Pena, 2016).

Las tasas de mortalidad, ocasionadas por la acción de las carbapenemasas son altas, oscilando entre el 18 y el 60% en casos de infección por *Klebsiella pneumoniae*, siendo las tasas más altas entre pacientes con bacteriemia. 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. Con frecuencia las cepas productoras de carbapenemasas presentan corresistencias a otras familias de antibióticos no β-lactámicos, por lo que es habitual la existencia de casos de resistencia extensa o panresistencia, frente a los cuales no hay una alternativa óptima de tratamiento antibiótico. Muchas de las enterobacterias productoras de carbapenemasas solo se muestran sensibles in vitro a antibióticos como la colistina, la tigeciclina, la fosfomicina o la amikacina (Oteo y col., 2014).

Las carbapenemasas representan la familia de β-lactamasas más versátil, con un amplio espectro. Aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los β-lactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores de los β-lactámicos. Algunos investigadores han preferido la nomenclatura de “enzimas que hidrolizan carbapenémicos” al término “carbapenemasas”, sugiriendo que los carbapenémicos son sólo una parte de sus sustratos. Las carbapenemasas han sido principalmente aisladas en la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Dentro de las enterobacterias, estas enzimas se aíslan principalmente en *K. pneumoniae* y en menor medida en *E. coli* y otras especies, con una prevalencia más alta en el sur de Europa y Asia que en otras partes del mundo (Pena, 2016).

La detección de Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas (EPC), incluye técnicas de primer paso (pruebas de sensibilidad) a técnicas de segundo paso confirmatorias (métodos fenotípicos y/o genotípicas). Las pruebas de sensibilidad están basadas en el análisis de susceptibilidad a los carbapenémicos. El ertapenem es un buen candidato para la detección, sobre todo de KPC, ya que sus valores de CMIs son más altos que de otros carbapenémicos. El inconveniente es que le falta especificidad porque una permeabilidad disminuida combinada con enzimas BLEE o AmpC puede afectar a las CMIs. El meropenem es el más activo, puesto que sus CMIs suelen ser las más bajas, pero esto dificulta su interpretación. Todo esto, hace que el imipenem sea el carbapenémico de elección para un primer paso en la detección de EPC, sus CMIs suelen ser elevadas en caso de *Proteus spp., Serratia spp., Providencia spp. y M. morganii* debido a otros mecanismos de resistencia (Rodríguez, 2014; Tamara y Lau, 2017; Mathers et al., 2017; Saavedra y col., 2016).

1. **Justificación (importancia, beneficiarios, resultados esperados).**

Los carbapenems son antibióticos β-lactámicos de amplio espectro con actividad bactericida frente a bacterias gram positivas y gram negativas, tanto aeróbicas como anaeróbicas. Debido a estas propiedades, los carbapenems han sido inicialmente considerados como antibióticos de reserva para ser empleados solo frente a casos puntuales. Sin embargo, dado el aumento general de la resistencia a los antibióticos, cada vez se los ha utilizado con mayor frecuencia y hoy en día son parte de la terapéutica empírica inicial en diversas circunstancias.

Este uso habitual de los carbapenems ha llevado al aumento de la resistencia a estos antibióticos, principalmente en *K. pneumoniae*, *E. coli*, Enterobacter, *Pseudomonas aeruginosa* y en el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, microorganismos en los que pueden estar involucrados múltiples mecanismos de resistencia (van der Zwaluw et al., 2015).

Hasta hace relativamente pocos años la resistencia a carbapenems era una rareza microbiológica, mediada principalmente por la presencia conjunta de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) e impermeabilidad. No obstante, hace algo más de diez años se describieron las primeras enterobacterias productoras de carbapenemasas, es decir, β-lactamasas capaces de hidrolizar eficientemente a los carbapenems. Poco tiempo después se documentaron en diversas partes del mundo brotes epidémicos producidos por enterobacterias productoras de carbapenemasas, por lo general del tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae*). Los estudios sobre la epidemiología molecular de las carbapenemasas revelaron que estas se encuentran en elementos móviles fácilmente transmisibles, lo que resalta la importancia epidemiológica de este nuevo mecanismo de resistencia. En ciertas regiones, como en la costa este de EE.UU., los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas KPC ya son endémicos (Dordet et al., 2014).

En nuestro país, hasta hace algunos años el principal mecanismo de sensibilidad disminuida a los carbapenems en enterobacterias continuaba siendo la conjunción de BLEE e impermeabilidad. Sin embargo, algunas publicaciones recientes dan cuenta de la emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas del tipo KPC y NDM (Sacsaquispe y col, 2018; Resurrección y col., 2017; Quispe y col., 2018). Detectar la presencia de carbapenemasas y categorizar correctamente la sensibilidad a carbapenems en aislamientos clínicos sigue siendo un problema para muchos laboratorios de microbiología. Ya hemos reseñado varias técnicas fenotípicas para la detección de carbapenemasas que, de acuerdo a su descripción tienen distinta sensibilidad y especificidad; de ellas se han elegido tres técnicas que tienen cada una distinta aplicación en cuanto a la interpretación de resultados y que cada una ya ha sido validad mediante su sensibilidad y especificidad. Estas técnicas son: Método de Hodge modificado-HMT (CLSI, 2016), Tercera variación al Test de Hodge modificado usando agar Mac Conkey (Ocampo y col., 2015) y El Método de Inactivación de Carbapenem (CIM)(van der Zwaluw et al., 2015).

Todos los cultivos positivos a las tres técnicas evaluadas serán sometidos a la Prueba de discos combinados (Pasterán y col., 2009; Tsakris et al., 2010) para determinar la clase de carbapenemasas a la que pertenece (clase A serin carbapenemasas, clase B metalo carbapenemasas). Al usar las tres técnicas descritas, con sus resultados se puede presumir de la presencia de carbapenemasas del grupo D y descartar betalactamasas del grupo C (AmpC). Una vez distribuidos los cultivos positivos en sus tres clases: A, B y D, se procederá a la confirmación molecular mediante el uso del PCR para la detección de los genes; Clase A: KPC, Clase D: VIM, IMP, NDM y Clase D: Oxa-48. De los resultados obtenidos, veremos cuál de las tres técnicas evaluadas tiene mejor rendimiento y que será incorporada al protocolo de detección de carbapenemasas en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Privada Antenor Orrego, lugar donde se llevará a cabo el estudio.

1. **Objetivos**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Objetivo General  (Propósito del proyecto ) | Resultados Finales | Medios de Verificación |
| Estandarizar un protocolo para la identificación fenotípica de carbapenemsas, mediante el ensayo de tres técnicas, luego identificarlos a que grupos de carbapenemasas pertenecen para poder validarlas mediante la técnica del PCR convencional. | R1: Resultados de las tres técnicas ensayadas para identificación de carbapenemasas | MV1: Tablas con resultados de cada técnica |
| R2: Resultados de la prueba de clasificación de los distintos grupos de carbapenemasas identificadas (A, B, C, D) | MV2: Tablas con resultados de la clasificación de carbapenemasas |
| R3: Validación de los dos resultados obtenidos mediante la técnica del PCR convencional, para identificar genes más comunes de cada grupo (KPC, VIM, IMP, NDM y OXA).  R4: Análisis estadístico para demostrar cual de las primeras tres técnicas usadas identifica mejor a las carbapenemasas | MV3: Electrroforesis de los corridos de las amplificaciones de cultivos probados  MV4: Resultados del análisis estadístico |

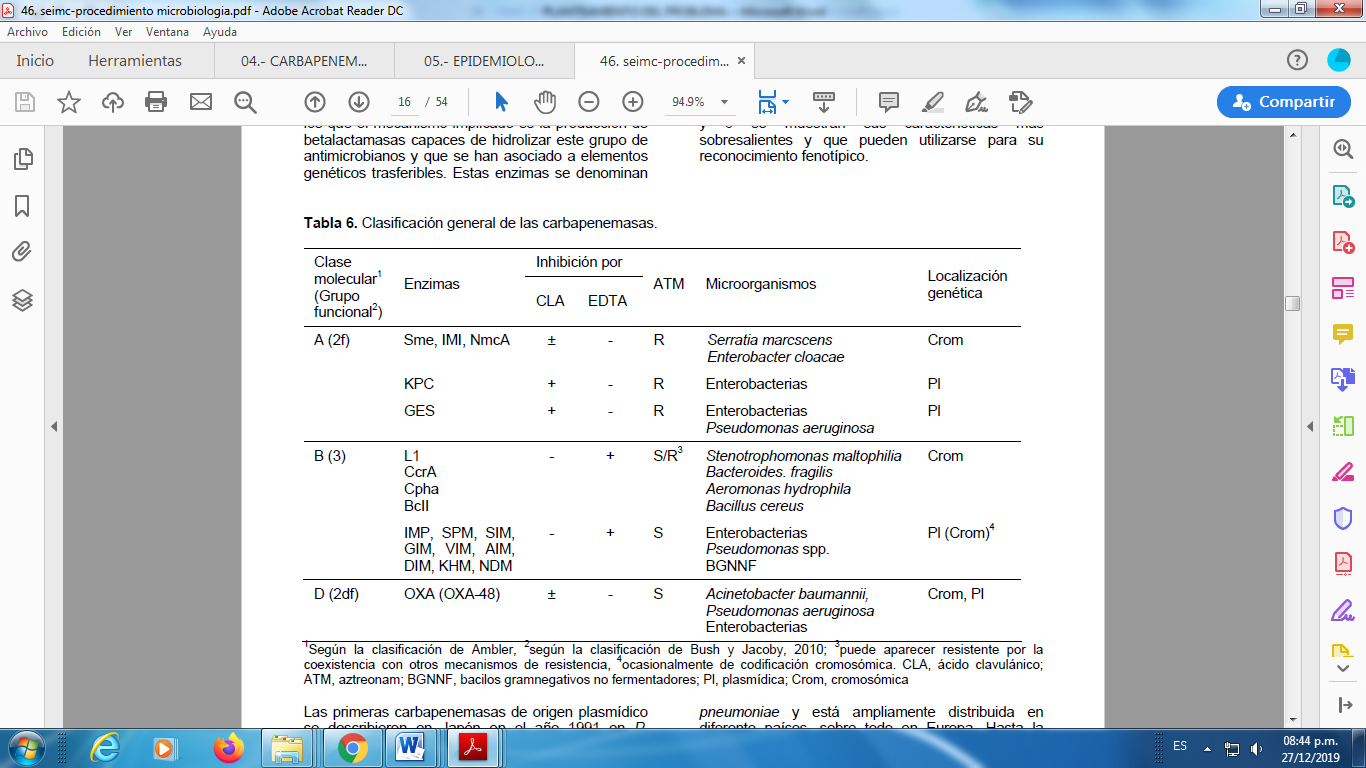
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Objetivos Específicos  (Componentes) | Resultadosintermedios | Medios de Verificación |
| 1.- Ensayar tres técnicas de identificación fenotípica para carbapenemasas: Método de Hodge modificado, Tercera variación del método de Hodge usando agar Mac Conkey y Método de la inactivación de carbapenem.  2.- Clasificar los grupos de carbapenemasas (A, B, C, D) a la que pertenecen los cultivos que dieron positivo a las técnicas anteriores, mediante la técnica de los discos combinados.  3.- Validar los cultivos positivos mediante la técnica del PCR convencional.  4.- Evaluación estadística de los resultados. | P1: Observar y separar los cultivos que dieron positivo a las tres técnicas de ensayo  P2: Clasificar y separar los cultivos que pertenecen a los distintos grupos de carbapenemasas  P3: Anotar y separar resultados de los distintos genes amplificados (KPC, VIM, IMP, NDM y OXA).  P4: Realizar la evaluación estadística de resultados | MV1: fotos de trabajo en el laboratorio de Inmunología y de resultados y tablas parciales de resultados  MV2: fotos de trabajo en el laboratorio de Inmunología y de resultados y tablas parciales de resultados |
| MV3: Fotos de trabajo en laboratorio de Biología Molecular y de los corridos electroforéticos de genes amplificados.  MV4: Análisis y tablas del trabajo estadístico |

1. **Marco teórico**

**Clasificación de las ß-lactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros** (Morejón, 2013).

**Clasificación general de las carbapenemasas** (Martínez, 2017; Cercenado, 2015)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Grupo funcional y subgrupo** | **Clase molecular (Ambler)\*** | **Características** |
| 1 | C | Cefalosporinasas, a menudo cromosómicas, pero pueden ser plasmídicas. Resistencia a todos los ß-lactámicos, excepto carbapenémicos (a no ser que coexistan alteraciones en las porinas).  No inhibidas por el ácido clavulánico. |
| 2 | A, D | Penicilinasas, cefalosporinasas o ambas. La mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico (salvo casos de hiperproducción o subgrupos determinados). |
| 2a | A | Penicilinasas. Incluye las de *Enterococcus* y *Staphylococcus.* Resistencia a penicilinas*.*  Inhibidas por ácido clavulánico. |
| 2b | A | ß-lactamasas de amplio espectro (penicilinasas y cefalosporinasas), |



Entre los métodos fenotípicos más usados para la identificación de las carbapenemasas tenemos: La prueba de Hodge modificado (THM) es un método basado en la degradación de un carbapenémico por una cepa productora de carbapenemasa que permite que una cepa sensible a carbapenémicos se extienda creciendo más cerca del disco que contiene el carbapenémico, distorsionando el halo de inhibición. Los métodos basados en la inhibición por ácido borónico se utilizan para la detección de carbapenemasas de la clase A (serincarbapenemasas). Tienen algunas limitaciones en las especies de enterobacterias productoras de AmpC Combinando el ácido borónico y la cloxacilina se consigue diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas clase A de las cepas productoras de AmpC. Los métodos basados en la inhibición por EDTA se utilizan para la detección de MBL (metalo betalactamasas–grupo B). El EDTA es un compuesto que se une al centro activo de las enzimas de clase B de Ambler que contiene iones de Zn+2 (Pasteran et al., 2016; Gastelo y col., 2016; Morejon, 2012; Reyes y col., 2017).

Los métodos espectrofotométricos están basados en la medida de la hidrólisis del imipenen con una longitud de onda de 297 nm con un extracto que contiene carbapenemasas obtenido de un caldo de cultivo. Últimamente se ha propuesto el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la detección de la actividad carbapenemasa, basada en el análisis del espectro de degradación de una molécula de un carbapenémico. El test Carba NP (CNP) es un test bioquímico que está basado en la hidrólisis in vitro del imipenem. La hidrólisis es detectada por un cambio en el valor del pH (el colorante pasa de rojo a amarillo/naranja). Agar ChromID CARBA®. Agar cromogénico que permite la recuperación de microorganismos resistentes a carbapenémicos a partir de hisopados rectales, suplementado con antimicrobianos, contiene cromógenos que facilitan la identificación presuntiva. Requiere de un tiempo de incubación de 24 a 48 h. Otros usados son el test de la escalera, test tridimensional (Josa y col., 2018; Sacsaquispe y col., 2018; Ocampo y col., 2015; Torres, 2015).

Las técnicas moleculares siguen siendo el método de referencia para la identificación de genes que codifican enzimas carbapenemasas. Las ventajas de estas técnicas son el poco tiempo que necesitan, una elevada sensibilidad y especificidad. La mayoría de estas técnicas están basadas en la PCR y pueden estar seguidas de una secuenciación si es necesaria la identificación exacta del gen. Existen técnicas de PCR de detección de genes de las carbapenemasas más prevalentes (VIM, IMP, NDM, KPC y OXA) (Rodríguez, 2014; Tamara y Lau, 2017; Josa y col., 2020; Sacsaquispe y col., 2018; Ocampo y col., 2015). Otros métodos moleculares son los microarrays (Pena, 2016; March, 2017) que son métodos más versátiles que pueden ser implantados en la rutina para detectar varias las clases de carbapenemasas a la vez con una alta sensibilidad y especificidad. Estas técnicas tienen interés epidemiológico, no clínico, ya que no es necesaria una identificación precisa del tipo de carbapenemasa para tratar a los pacientes o para prevenir brotes. En la literatura se informa del uso de diversas técnicas para la extracción, hibridación y amplificación, que tienen relación con el tipo de primers (cebadores) usados.

1. **Hipótesis**

IMPLICITA

1. **Metodología (Diseño experimental en detalle)**

**Diseño de la investigación**

1. **Población muestral**

Todos los cultivos de bacilos Gram negativos procedentes de los hospitales Belén-Trujillo y EsSalud-Chocope de la región norte del Perú, recolectados en el periodo setiembre 2020 a julio 2021.

1. **Unidad muestral**

Todos los cultivos de bacilos Gram negativos fermentadores (Familia *Enterobacteriaceae*) y no fermentadores (Pseudomonas, Acinetobacter) de origen intrahospitalarias, recolectados de hospitales Belén-Trujillo y EsSalud-Chocope, de la región norte del Perú, en el periodo setiembre 2020 a julio 2021. y que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

1. **Material Biológico:**

**Cultivos controles**

* *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
* *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705
* *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706
* *Pseudomonas aeruginosa* multisensible PAO-1
* *E. coli ATCC® 25922*
* *K. pneumoniae* KPC+, Generbim-UPAO-2019
* *K. pneumoniae* VIM+, Generbim-UPAO-2019
* *K. pneumoniae* NDM+, Benerbim UPAAO-2019

1. **Criterios de inclusión**
2. **Pruebas de sensibilidad:** Aquellas que han resultado como intermedio o resistente al antibiograma, con el siguiente rango (mm diámetro), para los siguientes antibacterianos: (Martínez, 2017; Cercenado, 2015; Rodríguez, 2014; Quispe y col., 2018; Vera y col, 2017).

* Imipenem: ≤16-23
* Meropenem: ≤16-28
* Ertapenem: ≤18-25
* Aztreonam: sensibles (presuntiva para grupos B y D) (Gómez et al., 2013; Morejón, 2012; Martínez, 2017; Cercenado, 2015).
* Aztreonam: resistentes (presuntiva para grupo A) (Martínez, 2017)

1. **Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)** ug/ml, para los siguientes antibacterianos: Pena, 2016; Martínez, 2017; Cercenado, 2015; Tamara y Lau, 2017; Mathers et al., 2015).

* Imipenem: ≥1-8
* Meropenem: ≥0.12-8.
* Ertapenem: ≥0.12-5

1. **Criterios de exclusión**

* Cultivos que al momento de su estudio se encuentren contaminados

**Material y métodos**

1. **Técnicas fenotípicas de evaluación para detectar carbapenemasas**
2. **Método de Hodge modificado-HMT (CLSI, 2016)**

**Criterios de inclusión:**

La recomendación es que esta prueba debe realizarse cuando los aislamientos de *Enterobacteriaceae* son sospechosos de producción de carbapenemasas basadas en las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) de imipenem o meropenem de 2–4 µg / ml o de ertapenem de 2 µg / ml.

**Procedimiento:**

Preparar una suspensión 1:10 de inóculo equivalente al tubo 0.5 McFarland, obtenido de una colonia de *E. coli ATCC® 25922* (organismo indicador) en SSF e inocular en sobre una placa de agar Müller Hinton (MHA). En placas de 150 mm colocar discos de ertapenem 10 μg y meropenem 10 μg. Para cada disco, utilizando un hisopo o aza, tomar inóculo de 3–5 colonias de cultivo de prueba incubado toda la noche en agar sangre e inocular en línea recta desde el borde del disco. El inóculo debe tener al menos 20–25 mm de longitud. Incubar a 35 ° C ± 2 ° C; 16-20 horas.

**Cultivos controles**: Usar en cada prueba.

* K. pneumoniae ATCC® BAA-1705 — MHT positivo
* K. pneumoniae ATCC® BAA-1706 — MHT negativo

**Lecturas:**

Después de la incubación, examinar la placa de MHA para ver si hay un crecimiento mejorado de la bacteria indicadora alrededor del inóculo de la prueba en la intersección de la línea y la zona de inhibición.

* Crecimiento mejorado = positivo para la producción de carbapenemasas.
* Sin crecimiento mejorado = negativo para la producción de carbapenemasas.

**Interpretación de lecturas:**

* Algunos aislamientos de prueba pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento de E. coli ATCC® 25922. Cuando esto ocurre, se verá un área despejada alrededor de la raya. Esto impide interpretar resultados.
* Se pueden encontrar resultados positivos para MHT en aislamientos con mecanismos de resistencia a carbapenemas distintos de la producción de carbapenemasas, como las betalactamasas tipo C (AmpC) (Pena, 2016; Martínez, 2017).
* No es necesario ningún cambio en la interpretación de los resultados de la prueba de susceptibilidad a carbapenem para los aislamientos MHT positivos.

**Validación de la técnica:** Sensibilidad (> 90%) y especificidad (>90%) para KPC. La sensibilidad y especificidad de la prueba para detectar otras carbapenemasas pueden variar.

### **Tercera variación al Test de Hodge modificado usando agar Mac Conkey (Ocampo y col, 2015).**

### Se emplea el mismo procedimiento que MHT, pero con las siguientes variaciones:

* Usar agar Mac Conkey en vez de MHA, para favorecer la liberación de las carbapenemasas de las células en presencia de compuestos biliares.
* Emplear *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como cepa indicadora sensible en lugar de *Escherichia coli* ATCC 25922, debidos a la inhibición de *Escherichia coli* por algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa.*
* Usar como control positivo la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705 y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* multisensible PAO-1 como control negativo.

**Validación de la prueba:** Sensibilidad (> 90%) y especificidad (85.7%); valores predictivo positivo y negativo del 94,7% y 75,0%, respectivamente.

1. **El Método de Inactivación de Carbapenem (CIM) (Morejón, 2012)**

**Criterios de inclusión**

* *Enterobacteriaceae* con un MIC para meropenem >0.25 μg / ml.
* Bacilos Gram negativos no fermentadores (Pseudomobas y Acinetobacter).
* El 35% de los aislamientos tenían MIC por debajo de 0.25 μg / ml.
* Cultivos de crecimiento en agar sangre carnero o MHA.
* **Procedimiento**
* Tomar una azada de cultivo problema joven y realizar una suspensión en 400 ul de agua. Colocar en la suspensión un disco de meropenen 10ug y se incubó durante un mínimo de dos horas a 35 ° C. Después de la incubación, el disco se retiró de la suspensión y se colocó en una placa de agar MHA inoculada con una *E coli* susceptible indicadora (ATCC 29522), con una turbidez equivalente al tubo 0.5 de McFarland y posteriormente incubada a 35 ° C.

**Cultivos controles**: Usar en cada prueba.

* K. pneumoniae ATCC® BAA-1705 — MHT positivo
* K. pneumoniae ATCC® BAA-1706 — MHT negativo

**Ventajas para la prueba**

* A mayor densidad, mejor resultados positivos.
* Tiempo de incubación del disco en la suspensión bacteriana: entre 30 minutos a 2 horas. No dejar toda la noche.
* Temperatura de incubación: 30 °C, 35 °C o 35 °C.
* Cultivo de bacteria problema: en MHA más sangre de oveja.
* Las suspensiones bacterianas mantenidas en refrigeración no varían su actividad de carbapenemasas.

**Interpretación de lecturas:**

* Si el cultivo problema produce carbapenemasas, el meropenem en el disco de susceptibilidad se inactiva permitiendo el crecimiento sin inhibiciones de la cepa indicadora susceptible.
* Los discos incubados en suspensiones que no contienen carbapenemasas producen una zona de inhibición clara.
* Si los resultados se requieren dentro del mismo día, se pueden leer después de seis horas o después de la incubación durante la noche.

**Validación de la prueba:**

* Concordancia entre CIM y PCR: (100% para *Enterobacteriaceae* y 98.8% para no fermentadores.
* Valor predictivo positivo y negativo del 100%.

A todos los cultivos que dan positivos para las 3 técnicas evaluadas, se les realizará la prueba de discos combinados.

1. **Prueba de discos combinados para la diferenciación de carbapenemasas MBL y KPC (Pasterán y col., 2009; Tsakris et al., 2010)**

**Criterios de inclusión**

* IMP zonas de inhibición: ≤20 mm. MIC de ≥1 μg / ml.
* MEM zonas de inhibición: 21-27 mm. MIC ≥0.5 μg / ml
* ETP zonas de inhibición: ≤21 mm. MIC ≥0.5 μg / ml

**Procedimiento:**

Se inoculan placas de agar Mueller-Hinton con muestras de las cepas problemas, ajustadas a una turbidez equivalente a un estándar de 0,5 McFarland. Colocar en una placa 4 discos de meropenem (MER 10 ug). Un disco queda solo, a otros dos se le añade discos de Ácido Fenil Borónico (APB 300 ug) y de Etilén diamino tetra acético (EDTA 292 ug), respectivamente; al cuarto disco se le añade los discos de APB y EDTA juntos.

Se incuban durante la noche a 35 ° C. Luego se registra el diámetro de las zonas de inhibición. El diámetro de la zona inhibidora del crecimiento alrededor de los discos MER con APB y EDTA se comparan con las del disco solo.

El ensayo se repite con Imipenem (IMP 10ug) y Meropenem (ERT 10ug).

**Interpretación de lectura**

* Se considera la producción de serin carbapenemasas clase A (KPC) cuando el diámetro de la zona inhibidora del crecimiento alrededor del disco con PBA y el disco con PBA y EDTA se incrementaron ≥5 mm en comparación con el diámetro de la zona inhibidora del crecimiento alrededor del disco solo.
* Se considera la producción de Metalo betalactamasas (MBL), clase B cuando el diámetro de la zona inhibidora del crecimiento alrededor de los discos con EDTA y el disco con PBA y EDTA se incrementaron ≥5 mm en comparación con el diámetro de la zona inhibidora del crecimiento alrededor del disco solo.
* Se considera la producción de enzimas KPC y MBL cuando el diámetro de la zona inhibidora del crecimiento alrededor de los tres discos combinados aumentó ≥5 mm en comparación con el diámetro de la zona inhibidora del crecimiento alrededor del disco solo.
* Pueden aparecer falsos positivos (sinergismo débil) que pueden corresponder a betalactamasas del tipo C (AmpC)
* Cuando ninguna de las tres pruebas combinadas de disco fue positiva, el aislado se consideró negativo para la producción de carbapenemasas MBL y KPC y se presume sean del grupo D (OXA) (Pena, 2016; Martínez, 2017; Cercenado, 2015).

1. **Determinación genotípica de genes**

Se realiza a los cultivos que dieron positivos a la prueba de discos combinados y aquellos que se presumen del grupo D (OXA).

1. **Extracción del ADN bacteriano:**

Se realizará usando el Genejet Genomic Dna Purif Kit, siguiéndose las instrucciones del fabricante y el ADN extraído se almaceno a -20°C.

1. **Secuencia de los cebadores y condiciones utilizadas para la amplificación**

**CLASE A:**

**Gen KPC (Yigit et al., 2008)**

* KPC F: 5´ATG TCA CTG TAT GGC CGT CT 3´
* KPC R: 5´TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC 3´
* Tª de hibridación: 58 ºC
* Tamaño del fragmento: 893 pb
* Las condiciones de amplificación se realizarán de acuerdo con lo señalado por el autor de referencia.

**CLASE B:**

**Gen VIM (Mei-Feng et al., 2008)**

* VIM A: 5´ ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC 3´
* VIM B: 5´TGG GCC ATT CAG CCA CAT C 3´
* Tª de hibridación: 52 ºC
* Tamaño del fragmento: 510 pb
* Las condiciones de amplificación se realizarán de acuerdo con lo señalado por el autor de referencia.

**Gen IMP (Mei-Feng et al., 2008)**

* IMP A: 5´CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG 3´
* IMP B: 5´AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT 3´
* Tª de hibridación: 52 ºC
* Tamaño del fragmento: 587 pb
* Las condiciones de amplificación se realizarán de acuerdo con lo señalado por el autor de referencia.

**Gen NDM(Tamara y Lau, 2017)**

* NDM F: 5’ AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC 3’
* NDM R: 5’- GGC GTA GTG CTC AGT GTC 3’
* Tª de hibridación: ºC
* Tamaño del fragmento: 512 pb
* Las condiciones de amplificación se realizarán de acuerdo con lo señalado por el autor de referencia.

**CLASE D**

**Gen OXA (Pena, 2016)**

* OXA F: 5´GCT TGA TGG CCC TCG ATT 3´
* OXA R: 5´AAA CCA TCC GAT GTG GGG CAT 3´
* Tª de hibridación: 57 ºC
* Tamaño del fragmento: 511 pb
* Las condiciones de amplificación se realizarán de acuerdo con lo señalado por el autor de referencia.

1. **Electroforesis**

Se utilizará 10 µl de los productos PCR en gel agarosa al 1,5 % con Safe Green, a un voltaje de 120 V por 45 minutos, luego se analizarán las bandas que correspondan al nivel de los genes de estudio visualizadas en el transiluminador UV y fotografiados con un sistema de captura Bio Doc Analyze Darkhood.

La presencia de bandas al nivel que correspondan a los respectivos genes de estudio se considera como prueba positiva para el gen respectivo.

Para asegurar la calidad del proceso, los productos de PCR de 20 cepas seleccionadas al azar, se enviará a un laboratorio especializado para la secuenciación respectiva y asegurar que se amplificaron las secuencias de los genes encontrados.

**Aspectos éticos**

Al tratarse de una investigación no realizada directamente en seres humanos, debido a que se trabajaron con cepas procedentes de hospitales, no es necesario la aprobación de un consentimiento informado.

**Análisis estadísticos**

Para el orden de los datos en relación con los resultados de los métodos, estos se almacenarán en una base de datos en Microsoft Excel. Posteriormente, se realizará el análisis descriptivo y estadístico, mediante la prueba t-Student, considerando que se van a evaluar tres grupos de resultados. Esta prueba permite comparar muestras, N ≤ 30 y/o establece la diferencia entre las medias de las muestras. El análisis matemático y estadístico de la prueba con frecuencia se minimiza para N > 30, utilizando pruebas no paramétricas, cuando la prueba tiene suficiente poder estadístico (Sánchez, 2015).

1. **Bibliografía**

Cercenado, E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. Rev Esp Quimioter, 28 (l.1), 8-11.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100S, 26th Edition.

Dortet, L., Poirel, L., Errera, C., Nordmann, P. (2014). CarbAcineto NP Test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol, (7), 2359-64. DOI: [10.1128/JCM.00594-14](https://doi.org/10.1128/jcm.00594-14)

Gastelo, R., Díaz, R., Maguiña, C. (2016). Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque, diciembre 2014 - julio 2015. Acta méd. Peru, 33(3), 183-188.

Gomez, S., Pasteran, F., Faccone, D., Bettio, M., Veliz, O., De Belder, D., Rapoport, M., Gatti, B., Petroni, A. and Corso, A. (2013). Intrapatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol and Inf, 19(5),233-235.

doi: 10.1111/1469-0691.12142.

Josa, D., Bustos, G., Torres, I., Esparza, S. (2018). Evaluación de tres métodos de tamizaje para detección de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas en hisopados rectales. Rev. chil. Infectol, 35(3), 253-261. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000300253>

March, G. (2’17). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. Enferm Infecc Microbiol Clin, 35(3), 182–188.

DOI: 10.1016/j.eimc.2016.12.005

Martinez, L. (2017). Aspectos microbiológicos de las Enterobacterias productoras de Carbapenemasas. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Congreso Nacional

18-21 octubre 2017. Madrid. 34 p. Disponible en: <https://www.sefh.es/eventos/62congreso/ponencias/LuisMartinez_2017_10_19_Carbapenemasas_Microb_SEFH.pdf>

Mathers, A., Stoesser, N., Sheppard, A., Pankhurst, L., Giess, A., Yeh, A., Didelot, X., Turner, S., Sebra, R., Kasarskis, A., Peto, T., Crook, D., Sifri, C. (2015). *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* at a Single Institution: Insights into Endemicity from Whole-Genome Sequencing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(3), 1656-1663. **DOI:** 10.1128/AAC.04292-14

Mei, L., Chien, P., Hui, H., Yen, Ch. (2008). Molecular characterisation of the metallo--lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. International Journal of Antimicrobial Agents, 32, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.009>

Morejón, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. Revista Cubana de Medicina, 52(4), 272-280. Disponible en: http://scielo.sld.cu

Morejón, M. (2012). Carbapenemasas, una amenaza actual. Rev Cub Med Int Emerg, 11(4), 2613-2618.

Muñoz, C., Zumarán, Z., González, T., Wozniak, A., Castillo, C. y García, P. (2017). Evaluación de test rápidos y diseño de una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos. Rev Chilena Infectol, 34 (4), 326-332.

http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182017000400326.

Ocampo, A., Giraldo, L., Melo, K., Obando, A., Jiménez, J. (2015). Variaciones al Test de Hodge modificado para la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*. Med. Lab, 21(11/12), 551-564.

<http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/yvy5m>

Oteo, J., Calbo, E., Rodríguez, J., Oliver, A., Hornero, A., Ruiz, P., Horcajada, J., Del Pozo, J., Riera, Bou, G. y 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. Enferm Infecc Microbiol Clin, 32(10). 666–670. DOI: 10.1016/j.eimc.2014.02.011

Pasteran, F., Denorme, L., Ote, I., Gomez, S., De Belder, D., Glupczynski, Y., Bogaerts, P., Ghiglione, B., Power, P., Mertens, F., Corso, A. (2016). Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. J Clin Microbiol, 54(11), 2832-2836.  DOI: [10.1128/JCM.01175-16](https://doi.org/10.1128/jcm.01175-16)

Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., Corso, A. (2009). Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol, 47(6),1631–1639. doi: [10.1128/JCM.00130-09](https://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.00130-09)

Pena, I. (2016), Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. 2016. 194p. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>

Quispe, J., Ingaruca, J., Castro, A., Castro, M., Ccoicca, F., Montalvo, R, Prieto, A., Salvador, F. (2018*). Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en Perú: reporte de caso y discusión de la resistencia a los antimicrobianos. Medwave, 18(2): e7191. doi: 10.5867/medwave.2018.02.7191

Resurrección, C., Montenegro, J., Chiappe, A., Vargas, R., Cucho, C., Mamani, D. et al. *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo: Lima, Perú. Rev. peru. med. exp. salud pública, 34(2), 261-267.

doi: 10.17843/rpmesp.2017.342.2615

Reyes, J., Villacís, J., Chicaiza, S., Satán, C., Salas, S., Ushiña, L. et al. (2017). Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae. Infectio, 21(4), 251-254.

http://dx.doi.org/10.22354/in.v21i4.688.

Rodríguez, E. (2014). Caracterización genética de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae,* resistentes a carbapenémicos, remitidos al grupo de resistencia bacteriana de Bogotá GREBO por hospitales del distrito, en un periodo de 3 años. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 2014. 117p. Disponible en:

<http://www.bdigital.unal.edu.co/39486/1/1186729.2014.pdf>

Rodríguez, E., Saavedra, S., Leal, A., Álvarez, C., Valderrama, A. et al. (2014). Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. Biomédica, 34(1), 224-231.

<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1696>.

Rojo, V., Vázquez, P., Reyes, S., Puente, L., Cervero, M. (2018). Risk factors and clinical evolution of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in a university hospital in Spain. Case-control study. Rev Esp Quimioter, 31(5), 427–434. PMCID: [PMC6194862](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc6194862/)

Saavedra, C., Arias, G., Gualtero, S., Leal, A., Saavedra, S., Murcia, M. (2016). Factores de riesgo para infección o colonización por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en pacientes adultos hospitalizados en Unidades de Cuidado Intensivo, Bogotá, Colombia. Infectio, 20(4), 238-249.

<https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.11.003>

Sacsaquispe, R., Bailón, H. (2018). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. Rev. peru. med. exp. salud pública, 35(2), 259-264. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3829>

Sánchez, R. (2015). t-Student. Usos y abusos. Rev Mex Cardiol. 2015; 26(1): 59 – 61.

Disponible en: http://www.medigraphic.com/revmexcardiol

Tamara, P, y Lau, D. (2017). Detección de los genes de carbapenemasas blaKPC y blaNDM en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 26(2), 8-17.

Torres, V. Determinación de características fenotípicas y genotípicas de carbapenemasas en el hospital pediátrico Baca Ortiz de Quito en el año 2013. Tesis para Titulación. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2015. 77p.

<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/10161>

Tsakris, A., Poulou, A., Pournaras, S., Voulgari, E., Vrioni, G., Themeli, K., Petropoulou, D., Sofianou, D. (2010). A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-β-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates, J Antim Chemotherapy, 65(8), 1664–1671. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq210>

van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G., Bootsma, H., de Neeling, A., Schouls, L (2015) The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. PLoS ONE, 10(3), e0123690. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690

Vera, A., Barría, C., Carrasco, S., Lima, C., Aguayo, A., Domínguez, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. Rev. chil. Infectol, 34(5), 476-484. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>

Yigit, H., Queenan, A., Anderson, G., et al. (2008). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 45(4), 1151–1161.

**DOI:** 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001

**SECCIÓN C: CRONOGRAMA DE INVESTIGACIÓN**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Actividad** | | **Meses** | | | | | | | | | | | |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **1** | **Ambientación de laboratorios** | **X** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **2** | **Compra de materiales** | **X** | **X** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **3** | **Recolección de cultivos** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** |  |  |
| **4** | **Evaluación de tres técnicas para Carbapenemasas** |  |  | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** |  |  |
| **5** | **Determinación del grupo de Carbapenemasas** |  |  |  |  |  | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** |  |
| **6** | **Validación mediante técnica de PCR** |  |  |  |  |  |  | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** |  |
| **7** | **Análisis estadístico y preparación del informe final** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | **X** | **X** |

**SECCIÓN D: PRESUPUESTO DEL PROYECTO**

|  |  |
| --- | --- |
| **Partida presupuestaria** | **Monto (S/.)** |
| 1. Equipos y bienes duraderos | …… |
| 1. Recursos humanos (hasta un 20% del presupuesto) | **2,700.00** |
| 1. Materiales e insumos | **12,421‬.00** |
| 1. Pasajes y viáticos | **2,500.00** |
| 1. Servicios tecnológicos | **2,200.00** |
| **TOTAL** | **19,821‬.00** |

**CUADRO Nº 1: Equipos y bienes duraderos (adjuntar proformas)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Equipos y bienes duraderos** | **Especificaciones técnicas** | **Proforma (fecha)** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| **---------** |  |  |  |  | **-------------** |
| **-----------** |  |  |  |  | **-------------** |
| **------------** |  |  |  |  | **------------** |

**CUADRO Nº 2: Recursos Humanos - Valorización del equipo Técnico**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nombre** | **Escuela o Unidad a la que pertenece** | **% de dedicación** | **Honorario mensual** | **Nº de meses** | **Costo total S/.** |
| **Estadístico** | **Unidad de Estadística** | **5** | **700.00** | **01** | **700.00** |
| **Tesista** | **Medicina** | **20** | **500.00** | **04** | **2,000,00** |
| **TOTAL** |  |  |  |  | **2,700.00** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **CUADRO Nº 3: Material e insumos (adjuntar proformas)** | | |  |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Caja de guantes de nitrilo Caja x 100 unid. | 15.00 | 6 | 90.00 |
| Mascarillas descartables. Caja x 50 unid. | 10.00 | 6 | 60.00 |
| Gorros desechables. Caja x 100 unid. | 10.00 | 4 | 40.00 |
| Tips 0.5-10 uL con filtro estéril. Caja x 96 unid. | 30.00 | 4 | 120.00 |
| Tips de 100 uL con filtro estéril. Caja x 96 unid. | 30.00 | 3 | 90.00 |
| Tips 1000 uL con filtro estéril. Caja x 100 unid. | 25.00 | 2 | 50.00 |
| Tubo microcentrífugo de 1.5mL Bolsa por 500 unid. | 100.00 | 1 | 100.00 |
| Platinum PCR SuperMix x100 Rx. Kit x 100 Rxns | 800.00 | 1 | 800.00 |
| Geberuler 100bp DNA Ladder. Kit x 5 ug | 273.50 | 1 | 273.00 |
| SYBR SAFE DA STAIIN 400 uL. Vial x 400 uL | 505.00 | 1 | 505.00 |
| TAE, 50 X 1000ml- Fco x 1000ml | 810.00 | 1 | 810.00 |
| PBS, Ph 7,4 1000 ml. Fco x 1000ml | 230.00 | 1 | 230.00 |
| Agua destilada UltraPura™. Fco x 500ml | 256.80 | 1 | 256.00 |
| PureLink™ Microbiome DNA Purification. Kit x 50 | 600.00 | 2 | 1200.00 |
| Disco de antibióticos carbapénicos de 10 µg. 5x50 Discs | 65.00 | 10 | 650.00 |
| Discos de inhibidores EDTA-APB. 5x50 Discs | 200.00 | 4 | 800.00 |
| Cepas controles de bacterias para pruebas. Vial 1.0 mL | 220.00 | 5 | 1100.00 |
| Agar Mueller-Hinton. Fco x 1 lb | 450.00 | 3 | 1350.00 |
| Agar Mac Conkey. Fco x 1 lb | 480.00 | 2 | 960.00 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | | |  |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Agarosa, Tipo I, para Biología molecular x 1 lb | 350.00 | 1 | 350.00 |
| Klebsiella pneumoniae derived from ATCC® BAA-1705™ | 675.00 | 1 | 675.00 |
| Primers para 5 genes x dos secuencias | 60.00 | 5 | 300.00 |
| Klebsiella pneumoniae derived from NCTC 13442 | 360.00 | 1 | 360.00 |
| Escherichia coli derived from ATCC® BAA-2452 | 330.00 | 1 | 330.00 |
| Base Charge, Standard Oligonucleotide Synthesis 50 nmol | 3.00 | 50 | 150.00 |
| Safe-Green&trade; | 185.00 | 1 | 185.00 |
| 100bp Opti-DNA Marker | 292.00 | 1 | 292.00 |
| 2X PCR Taq MasterMix. Contenido: 5.0 ml (200 Rxns) | 295.00 | 1 | 295.00 |
| **TOTAL** |  |  | **12,421‬.00** |

**CUADRO Nº 4: Pasajes y viáticos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| **Movilidad Local: domicilio-UPAO-Hospitales-UPAO-domicilio.** | **100 x mes** | **12** | **1,200.00** |
| **Pasajes a regiones del Perú: capacitaciones, información** | **200.00** | **04** | **800.00** |
| **Viáticos** | **100.00** | **05** | **500.00** |
| **TOTAL** |  |  | **2,500.00** |

**CUADRO Nº 5: Servicios tecnológicos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| **Pago inscripción Proyecto Hospitales para autorización de muestras** | **300.00** | **2** | **600.00** |
| **Útiles de escritorio** | **100.00** | **2** | **200.00** |
| **Empastado del informe y tesis** | **200.00** | **2** | **400.00** |
| **Publicación en revista indexada** | **1000.00** | **1** | **1000.00** |
| **TOTAL** |  |  | **2,200.00** |

**FORMATO 2**

**DECLARACION JURADA DE COMPROMISO Y AUTENTICIDAD DEL PROYECTO**

**(SOLO PARA EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)**

Trujillo 05 de junio del 2020

**Señor Doctor**

**Luis Cerna Bazán**

**Vicerrector de Investigación**

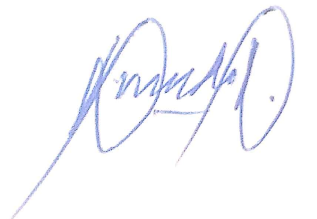
**Presente.-**

De mi consideración:

El suscrito docente de la Facultad de Medicina Humana, Escuela Profesional de Medicina Humana identificado con DNI N° 17861964 y domicilio en Calle Cristal Nro. 464, Urbanización San Isidro-Trujillo, DECLARO BAJO JURAMENTO mi compromiso de participar como Investigador Principal y **responsable** del proyecto de investigación titulado: **“Evaluación de técnicas fenotípicas para la detección de Carbapenemasas en bacilos Gram negativos y confirmadas mediante PCR”**; el cual es **ORIGINAL Y AUTENTICO** y está enmarcado en las áreas académicas y líneas de investigación priorizadas por la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO).

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente,



----------------------------------------------------

PEDRO ESTUARDO MERCADO MARTINEZ

DNI N° 17861964

CARGO EN LA INSTITUCION

Docente Contratado Facultad de Medicina Humana

Escuela de Medicina Humano

Administrativo: Laboratorio Genética, Reproducción Asistida y Biología-Molecular, Universidad Privada Antenor Orrego.