



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

Título:

Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas provenientes de Centros de Salud durante el 2018 al 2022

Phenotypic and genotypic characterization of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical samples from Health Centers during 2018 to 2022

TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

AUTORES

Tamin Nohely Ortíz Gómez

ASESOR

MSc Steev Orlando Loyola Sosa

LIMA – PERÚ

2022

ASESOR

MSc Steev Orlando Loyola Sosa

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-5455-2423

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que formaron parte de este proyecto aportando conocimientos e ideas para poder concretarlo y finalmente quede plasmado.

A mi asesor, Steev, por su apoyo y tiempo invertidos en este proyecto.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El proyecto será autofinanciado. Los autores declaramos no tener conflictos de interés.

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Este trabajo académico es original, y ha sido elaborado siguiendo los lineamientos que respetan la ética en investigación. Este trabajo será utilizado para obtener un Título de Segunda Especialidad

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	9
2 OBJETIVO.....	10
2.1 Objetivo general.....	10
2.2 Objetivos secundarios.....	10
3 MATERIAL Y MÉTODO.....	11
3.1 Diseño del estudio.....	11
3.2 Población y lugar de estudio.....	11
4.2.1 Criterios de inclusión.....	11
4.2.2 Criterios de exclusión.....	11
3.3 Muestra.....	11
3.4 Definición operacional de variables.....	12
3.5 Procedimientos y técnicas.....	13
3.5.1 Recolección de datos:.....	14
3.5.2 Transporte de aislamientos bacterianos:.....	14
3.5.3 Detección de la producción de carbapenemasas mediante la prueba de Carba NP:.....	14
3.5.4 Sinergia de Discos:.....	14
3.5.5 Detección de genes de betalactamasas:.....	14
3.5.6 Tipificación multilocus de secuencias (MLST):.....	15
3.5.7 Detección de Plásmidos conjugativos:.....	15
3.6 Aspectos éticos.....	15
3.7 Plan de análisis.....	15
4 PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO.....	16
5 CRONOGRAMA.....	18
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
7 ANEXOS.....	20
7.1 Anexo 1: Flujograma para el procesamiento de aislados bacterianos.....	20
7.2 Anexo 2: Plantilla para Sinergia de Discos.....	21
7.3 Anexo 3: Protocolo de conjugación bacteriana.....	22

RESUMEN

Introducción: La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema de salud pública, debido a su alarmante incremento y aparición cada vez más frecuente de bacterias multirresistente y panresistentes representando serios retos para el tratamiento de estas infecciones. Los carbapenems son antibióticos betalactámicos dotados de mayor espectro y actividad, siendo los más resistentes frente a betalactamasas. Son considerados imprescindibles al momento de tratar infecciones nosocomiales graves e infecciones producidas por bacterias multirresistentes, por lo que la aparición de betalactamasas que hidrolizan carbapenems denominadas carbapenemasas se ha convertido en un gran desafío. La detección y dispersión de enterobacterias resistentes a carbapenémicos es un problema de salud pública a nivel mundial, y nuestro país no es ajeno a esta realidad.

Objetivo: Caracterizar el fenotipo y genotipo de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas provenientes de Centros de Salud en Perú.

Métodos: Se desarrollará un estudio transversal y descriptivo de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas provenientes de muestras biológicas recolectados de centros de salud tanto públicos como privados. Para la caracterización fenotípica se determinará el perfil de resistencia bacteriano con los datos obtenidos del antibiograma por disco difusión y para detectar carbapenemasas tipo KPC y Metalobetalactamasas se realizará la prueba de sinergia con ácido borónico (APB) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Para la caracterización genotípica se realizará la identificación de los tipos de genes de carbapenemasas mediante PCR múltiplex para los genes *bla*NDM, *bla*KPC, *bla*OXA-48, *bla*IMP, *bla*VIM. El estudio de clonalidad de las cepas se realizará mediante la técnica de MLST, finalmente se desarrollarán ensayos de conjugación para determinar la transferencia de plásmidos portadores de genes de resistencia.

Palabras clave: Epidemiología, *Klebsiella pneumoniae*, Enterobacteriaceae Resistentes a los Carbapenémicos.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial resistance has become a public health problem, due to its alarming increase and the increasingly frequent appearance of multi-resistant and pan-resistant bacteria, representing serious challenges for the treatment of these infections. Carbapenems are beta-lactam antibiotics with a broader spectrum and activity, being the most resistant to beta-lactamases. They are considered essential when treating serious nosocomial infections and infections caused by multiresistant bacteria, so the appearance of beta-lactamases that hydrolyze carbapenems called carbapenemases has become a great challenge. The detection and spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae is a public health problem worldwide, and our country is no stranger to this reality.

Objective: To characterize the phenotype and genotype of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical samples from Health Centers in Peru.

Methods: A cross-sectional and descriptive study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from biological samples collected from both public and private health centers will be developed. For the phenotypic characterization, the bacterial resistance profile will be determined with the data obtained from the antibiogram by disc diffusion and to detect KPC-type carbapenemases and Metallobetalactamases, the synergy test will be carried out with boronic acid (APB) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). For the genotypic characterization, the identification of the types of carbapenemase genes will be carried out by multiplex PCR for the blaNDM, blaKPC, blaOXA-48, blaIMP, blaVIM genes. The clonality study of the strains will be carried out using the MLST technique, and finally conjugation tests will be developed to determine the transfer of plasmids carrying resistance genes.

Keywords: Epidemiology, *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae.

1 INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras de la misma especie.(1) En la actualidad la resistencia bacteriana es un problema de salud pública debido a su alarmante incremento a lo largo de los últimos años y su extensa dispersión a nivel global, así como al frecuente reporte de bacterias multidrogoresistentes y panresistentes. La resistencia bacteriana ha generado que el tratamiento de enfermedades infecciosas se convierta en un gran desafío a la hora de brindar opciones terapéuticas.(2)(3)

Motivados por el incremento de la resistencia a nivel global, la Organización Mundial de la Salud emitió una alerta epidemiológica sobre la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos y la mejora de los existentes. Es por ello que el 21 de Febrero del 2017 en un comunicado de prensa publican una lista de patógenos resistentes a antibióticos, ubicando como prioridad crítica a *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, Enterobacteriaceae resistentes a los carbapenémicos y productoras de betalactamasas de espectro extendido.(4)

Los carbapenems son antibióticos betalactámicos dotados de un amplio espectro de acción y actividad. Los carbapenems actúan inhibiendo la formación de la pared celular y facilitando la lisis de la bacteria y son considerados imprescindibles al momento de tratar infecciones nosocomiales graves e infecciones producidas por bacterias multirresistentes.(5) La aparición de betalactamasas que hidrolizan carbapenems denominadas carbapenemasas se ha convertido en un gran desafío al momento de tratar enfermedades infecciosas limitando las opciones terapéuticas.(6)

En el año 1996 se reportó la primera enterobacteria productora de carbapenemasas en Estados Unidos, una cepa de *Klebsiella pneumoniae* clon ST258, la cual se diseminó rápidamente a nivel mundial durante la siguiente década.(7) En la actualidad, estas enzimas se aíslan principalmente en *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida en *Escherichia coli* y otras especies, con una prevalencia más alta al sur de Europa y Asia en comparación a otras partes del mundo. Las más frecuentemente aisladas son las carbapenemasas tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC), New Delhi metalobetalactamasa (NDM) y OXA-48.(8)

En el Perú, la primera enterobacteria productora de carbapenemasas fue un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* tipo KPC reportada en el año 2013 proveniente de un hemocultivo de un paciente internado en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.(9) Posteriormente, en el año 2016 se realizaron los primeros reportes de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo NDM, donde se identificaron nueve aislamientos provenientes del Hospital Dos de Mayo.(10) En el año 2018, investigadores del Instituto Nacional de Salud del Perú realizaron una publicación que describe 83 enterobacterias productoras de carbapenemasas provenientes de 12 hospitales a nivel nacional que fueron recolectadas durante los años 2013 al 2017. La especie bacteriana más comúnmente aislada fue *Klebsiella pneumoniae*, y del total de las 83 cepas, en el 67.5% se detectó el gen *bla*NDM, en el 31.3% al gen *bla*KPC, y solo una aislamiento fue positivo para la detección del gen *bla*IMP.(11)

En el 2020, un estudio más profundo sobre las características moleculares de enterobacterias productoras de carbapenemasas fue publicado por un grupo de investigadores del Hospital Guillermo Almenara. En dicho estudio, la relación clonal fue evaluada mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y tipificación de secuencia multilocus (MLST). Un grupo de 30

aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo NDM fueron recuperados de hemocultivos durante el mes de junio del 2018. Todos los aislamientos, excepto dos, pertenecían al tipo de secuencia ST348. Dicho reporte es actualmente considerado el primer informe de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo NDM recuperada de niños y adultos en Lima, así como el primer reporte que describe la cepa ST348 en un brote en Perú.(12)

Las características moleculares y el impacto de la frecuencia de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenems ha sido poco estudiada en el Perú. Actualmente, no hay información disponible sobre la frecuencia y tipos de carbapenemasas circulantes en nuestro territorio para los últimos años. Conocer la presencia de carbapenemasas permitiría implementar programas de vigilancia epidemiológica según las necesidades de cada centro de salud. Por otro lado, identificar el tipo de carbapenemasa permitiría brindar un tratamiento adecuado y oportuno al paciente, debido a que los nuevos antibióticos poseen inhibidores de betalactamasas específicos para cada tipo de carbapenemasa.(13)

Este proyecto busca caracterizar el fenotipo y genotipo de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas procedentes de diferentes muestras biológicas recolectadas de diversos centros de salud tanto públicos como privados, siendo el objetivo principal describir el perfil de resistencia y los tipos de genes circulantes, así como la clonalidad de estas cepas a nivel nacional. El potencial impacto de este proyecto está relacionado a la generación de información del tipo; epidemiológica y bacteriana, estructura poblacional de cepas circulantes intrahospitalarias, y relación de líneas clonales hipervirulentas. Finalmente, los resultados serán de gran importancia para conocer nuestra realidad y preparar un plan de respuesta e intervención futuro.

2 OBJETIVO

2.1 *Objetivo general*

Caracterizar fenotípica y genéticamente cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas provenientes de un laboratorio privado en Lima durante el 2018 al 2022.

2.2 *Objetivos secundarios*

Determinar el perfil de resistencia bacteriano con los datos obtenido del antibiograma e identificar el tipo de carbapenemasa mediante el método de sinergia de discos en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas de un laboratorio privado en Lima durante el 2018 al 2022.

Identificar los tipos de genes de resistencia a betalactámicos en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas de un laboratorio privado en Lima durante el 2018 al 2022.

Determinar la clonalidad de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas de un laboratorio privado en Lima durante el 2018 al 2022 mediante la técnica de MLST.

Determinar la presencia de plásmidos conjugativos en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas de un laboratorio privado en Lima durante el 2018 al 2022.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Diseño del estudio

El diseño del estudio es de tipo descriptivo y transversal de periodo.

3.2 Población y lugar de estudio

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de muestras clínicas provenientes de un laboratorio privado el cual cuenta con un área dedicada al diagnóstico microbiológico. El laboratorio se encuentra ubicado en la ciudad de Lima y realiza el proceso de muestras biológicas de pacientes hospitalizados y ambulatorios.

4.2.1 Criterios de inclusión

- Aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* identificada mediante métodos manuales, automatizados o por ambos
- *Klebsiella pneumoniae* aislada de una muestra biológica procesada por el área de Microbiología de un laboratorio privado en Lima durante los años 2018 al 2022.
- Aislamientos bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* que evidencien resistencia a uno o más carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem) al momento de realizar el antibiograma de rutina.

4.2.2 Criterios de exclusión

- Cepa de *Klebsiella pneumoniae* que no permita realizar la trazabilidad del origen de la muestra y obtener datos del antibiograma.
- *Klebsiella pneumoniae* no viable y que no permita realizar los protocolos establecidos en el presente estudio.
- Cepas de *Klebsiella pneumoniae* con múltiples pasajes que hayan podido perder sus plásmidos.

3.3 Muestra

Se recolectarán todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de diferentes muestras clínicas provenientes de un laboratorio privado en Lima durante los años 2018 al 2022.

Este proyecto no propone realizar un cálculo de tamaño de muestra ya que el presente estudio busca caracterizar molecularmente todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión, y que además se encuentren disponibles durante el periodo de estudio

Asimismo, la determinación de un tamaño de muestra mediante un método de muestreo podría ocasionar sesgo de selección y favorecer la selección de aislamientos frecuentes a expensas de subpoblaciones infrecuentes. Por tal motivo, este trabajo propone la caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de diferentes muestras clínicas y provenientes de un laboratorio privado ubicado en Lima que conforme parte de la población futura de estudio.

3.4 Definición operacional de variables

Variable “Tipo de muestra biológica”

- a) Definición operacional: Fluido biológico o secreción humana que proviene de un paciente atendido en el laboratorio de microbiología.
- b) Definición conceptual: Muestras tales como orina, sangre, secreciones, líquidos biológicos son consideradas muestras biológicas.
- c) Criterios de medición: Origen de la muestra.
- d) Tipo de Variable: Categórica politómica.

Variable “Susceptibilidad antimicrobiana”

- a) Definición operacional: Susceptibilidad de determinados antibióticos frente a un aislamiento bacteriano cuya interpretación se basa en los criterios establecidos por la CLSI. (14) Cada antibiótico ensayado se realizará según el tipo de muestra de donde proviene el aislamiento bacteriano.
- b) Definición conceptual: La susceptibilidad antibiótica se determina por la concentración antibiótica necesaria para producir la inhibición del aislamiento bacteriano evaluado. (14)
- c) Criterios de medición: Se determinará los valores de MIC (mínima concentración inhibitoria) mediante el uso de equipos automatizado. Y su posterior interpretación como sensible, intermedio y resistente se realizarán basados en los criterios establecidos por el CLSI.
- d) Tipo de variable: Categórica politómica (sensible, intermedio y resistente).

Variable “Perfil de Resistencia Fenotípico”

- a) Definición operacional: Perfil de resistencia bacteriano determinado de forma fenotípica con pruebas de sinergia de discos.
- b) Definición conceptual: El perfil de resistencia bacteriano puede ser detectado por métodos fenotípicos utilizando discos de forma estratégica.
- c) Criterios de medición: Antibiograma por disco difusión y sinergia de discos.
- d) Tipo de Variable: Categórica politómica (β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) / AmpC /Metalo- β lactamasas / carbapenemasa tipo KPC).

Variable “Carbapenemasa clase B: NDM, IMP, VIM”

- a) Definición operacional: Clasificación de las carbapenemasas según Ambler y Bush.

- b) Definición conceptual: Enzimas que hidrolizan penicilinas de 2da, 3era y 4ta generación y carbapenems y son consideradas metalobetalactamasas cuyo sitio de activo depende de Zinc. (15)
- c) Criterios de medición: Serán detectadas mediante PCR multiplex para los genes NDM, VIM,IMP.
- d) Tipo de variable: Categórica dicotómica (Detectado/No detectado)

Variable “Carbapenemasa clase D: OXA-48”

- a) Definición operacional: Clasificación de las carbapenemasas según Ambler y Bush.
- b) Definición conceptual: Enzimas que hidrolizan penicilinas de 1era y 2da generación y carbapenems. No hidrolizan cefalosporinas de 3era o 4ta generación ni aztreonam. (15)
- c) Criterios de medición: Serán detectadas mediante PCR multiplex.
- d) Tipos de variable: Categórica dicotómica (Detectado/No detectado)

Variable “Carbapenemasa clase A: KPC”

- a) Definición operacional: Clasificación de las carbapenemasas según Ambler y Bush.
- b) Definición conceptual: Enzimas que hidrolizan penicilinas de 1era, 2da, 3era y 4ta generación, aztreonam y carbapenems. (15)
- c) Criterios de medición: Serán detectadas mediante PCR multiplex.
- d) Tipo de variable: Categórica dicotómica (Detectado/No detectado)

Variable “Secuencia tipo”

- a) Definición operacional: Número de secuencia tipo obtenida.
- b) Definición conceptual: Perfil alélico de cada bacteria que se caracteriza por secuencias únicas de alelos en cada uno de los loci de los genes evaluados.
- c) Criterios de medición: Determinado mediante la técnica de tipificación multilocus de secuencias (MLST).
- d) Tipo de variable: Categórica politómica.

Variable “Plásmido conjugativo”

- a) Definición operacional: Proceso de conjugación bacteriana.
- b) Definición conceptual: Molécula de ADN circular que se encuentra dentro de la bacteria y puede ser transferido o no a otra bacteria por lo que se clasifican como plásmidos conjugativos y no conjugativos.
- c) Criterios de medición: Ensayos de conjugación de plásmidos bacterianos.
- d) Tipo de variable: Categórica dicotómica (Conjugativo/ No conjugativo)

3.5 *Procedimientos y técnicas*

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* serán identificadas y confirmadas por el área de microbiología del centro de salud de su procedencia. Los aislamientos serán recolectados de forma colaborativa entre las instituciones de salud, y posteriormente enviadas al Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los procedimientos del laboratorio fueron resumidos en el Anexo 1.

3.5.1 Recolección de datos:

Los datos serán recolectados del laboratorio de microbiología del centro de salud del cual provengan las cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Se obtendrá información sobre el tipo de muestra del cuál proviene el aislamiento bacteriano junto con el resultado de antibiograma y los datos de la mínima concentración inhibitoria según corresponda. Se colocará si se realizaron pruebas adicionales tales como test de sinergia con EDTA, test de sinergia con APB o inmunocromatografía de tipos de genes de carbapenemasas.

3.5.2 Transporte de aislamientos bacterianos:

Las cepas serán almacenadas a - 20 °C en medio TSB glicerol al 10%, para su posterior reactivación y caracterización genética. Todos los aislamientos serán mantenidos en condiciones adecuadas que permitan su futura reactivación.

3.5.3 Detección de la producción de carbapenemasas mediante la prueba de Carba NP:

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de los diferentes centros de salud serán reactivadas en Agar Mueller Hinton con un disco de meropenem para estimular la producción de carbapenemasas, posterior a este procedimiento se realizará la confirmación de la producción de carbapenemasas mediante la prueba de Carba NP.(16) Se seleccionarán todas las cepas cuyo resultado sea positivo.

3.5.4 Sinergia de Discos:

Para la detección fenotípica de carbapenemasas tipo KPC y Metalobetalactamasas se realizará la prueba de sinergia con ácido borónico (APB) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), respectivamente utilizando el protocolo establecido por el Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.(17) Se utilizará una planilla patrón para la ubicación estratégica de los discos para evidenciar mecanismos de resistencia a carbapenémicos, betalactamasas de espectro extendido y AmpC, utilizando los discos de Meropenem, Imipenem, Ertapenem, Cloxacilina, Aztreonam, Piperacilina/Tazobactam, Amoxicilina/clavulánico y los discos de inhibidores EDTA y APB (Anexo 2).

3.5.5 Detección de genes de betalactamasas:

La detección de tipos de genes de betalactamasas de realizará mediante PCR convencional donde de evaluarán los siguientes genes:

Genes de producción de betalactamasas de espectro extendido: *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM. Se utilizarán cebadores y condiciones de PCR previamente establecidos. (18)

Genes de producción de carbapenemasas: Se incluirá en la búsqueda los genes *bla*NDM, *bla*KPC, *bla*OXA-48, *bla*IMP, *bla*VIM. Se realizará un PCR multiplex para estos 5 genes, utilizando el protocolo establecido por el INLS- Malbrán. (19)

3.5.6 Tipificación multilocus de secuencias (MLST):

Se realizará utilizando los siguientes genes conservados: rpoB, gapA, mdh, pgi, phoE, infB, tonB. Según los protocolos elaborados por el Instituto Pasteur. (20)

Para el posterior análisis de las secuencias obtenidas e identificación del perfil alélico y secuencias tipos (ST) se utilizará la base de datos del mismo instituto (https://bigsdB.web.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdB/bigsdB.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef).

La herramienta bioinformática BioNumerics se utilizará para investigar la diversidad de la población y la relación entre las secuencias tipo (ST) identificadas. El análisis permitirá obtener complejos, grupos clonales y la construcción de árboles filogenéticos y redes divididas según lo ameriten los resultados obtenidos. Asimismo, se evaluará la relación filogenética de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas recolectados por el presente estudio y aislamientos previamente identificados a nivel mundial. (21)

3.5.7 Detección de Plásmidos conjugativos:

Para los ensayos de conjugación se utilizará como cepa receptora una *E. coli* MC1061 AziR y las cepas donadoras serán las cepas problema de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas. El procedimiento se realizará como se indica en el Anexo 3. De cada experimento de conjugación se seleccionará una cepa transconjugante a la cual se le realizará el estudio de patrón de resistencia. (22)

3.6 Aspectos éticos

La recolección de datos y almacenamiento de cepas bacterianas se realizará asignándole un código único a cada aislamiento por lo que se mantendrá el anonimato y no permitirá la identificación de pacientes.

Este protocolo se registrará en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), y será evaluado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución. Durante la implementación del estudio se respetarán los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y se seguirán estrictamente las recomendaciones realizadas por el CIE-UPCH.

3.7 Plan de análisis

Se realizará el análisis de los perfiles de resistencia bacterianos, frecuencia de los aislamientos, datos obtenidos de los estudios de conjugación plasmídica y secuencia tipos detectados mediante la técnica de MLST. Se elaborarán tablas y gráficos que permitan visualizar los hallazgos obtenidos de forma global y estratificada de acuerdo con los objetivos propuestos.

Para el análisis bioinformático de la técnica de MLST se utilizará la base de datos del Instituto Pasteur y el programa BioNumerics para investigar la diversidad de la población, la relación

entre las secuencias tipo (ST) y analizar complejos clonales. Las secuencias de alelos y ST están disponibles en el sitio web público de MLST en <http://pubmlst.org/kpneumoniae>.

4 PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO

PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Título del estudio: Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas provenientes de Centros de Salud durante el 2018 al 2022.

Investigador(es) principal(es): Lic. Tamin Nohely Ortíz Gómez

Fuente de financiamiento (marque el que corresponda):

Autofinanciado: (X)

Otro: (___) Mencione el nombre de la institución financiadora: _____

MATERIALES

Cantidad	Unidad de Medida	Descripción	Costo Unitario	Costo Total (S/.)
DISCOS ANTIBIÓTICOS				
5	UND	Meropenem OXOID	S/ 12.80	S/. 64.00
5	UND	Imipenem OXOID	S/ 12.80	S/. 64.00
5	UND	Ertapenem OXOID	S/ 12.80	S/. 64.00
3	UND	APB	S/ 64.50	S/. 193.50
3	UND	EDTA	S/ 64.50	S/. 193.50
5	UND	Cloxacilina	S/ 12.80	S/. 64.00
5	UND	Aztreonam	S/ 12.80	S/. 64.00
5	UND	Amoxicilina/clavulánico	S/ 12.80	S/. 64.00
AGARES				
1	500 gr	Agar Mueller Hinton OXOID	S/ 280.00	S/. 280.00
1	500 gr	Caldo TSB OXOID	S/ 245.00	S/. 245.00
1	500 gr	Caldo Mueller Hinton BD	S/ 260.00	S/. 260.00
1	100 gr	Agarosa grado molecular	S/ 260.00	S/. 260.00
PROCEDIMIENTOS MOLECULARES				
1	200 x 50µl Reactions	MyTaq™ Red Mix	S/ 606.20	S/. 606.20
2	500 ul/100 loads	Ladder abm 100 pb	S/ 230.88	S/. 461.76
20	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaNDM R'	S/ 5.18	S/. 103.60
18	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaNDM F'	S/ 5.18	S/. 93.24
20	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaKPC R'	S/ 5.18	S/. 103.60
20	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaKPC F'	S/ 5.18	S/. 103.60
26	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaIMP R'	S/ 5.18	S/. 134.68

24	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaIMP F'	S/ 5.18	S/. 124.32
19	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaVIM R'	S/ 5.18	S/. 98.42
18	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaVIM F'	S/ 5.18	S/. 93.24
22	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaOXA-48 R'	S/ 5.18	S/. 113.96
20	200 nmol 80-160 nmol	Primer blaOXA-48 F'	S/ 5.18	S/. 103.60
15	200 nmol 80-160 nmol	Primer SHV R'	S/ 5.18	S/. 77.70
16	200 nmol 80-160 nmol	Primer SHV F'	S/ 5.18	S/. 82.88
16	200 nmol 80-160 nmol	Primer TEM R'	S/ 5.18	S/. 82.88
16	200 nmol 80-160 nmol	Primer TEM F'	S/ 5.18	S/. 82.88
17	200 nmol 80-160 nmol	Primer CTX-M R'	S/ 5.18	S/. 88.06
17	200 nmol 80-160 nmol	Primer CTX-M F'	S/ 5.18	S/. 88.06
70	200 nmol 80-160 nmol	Primers para MLST R'	S/ 5.18	S/. 362.60
71	200 nmol 80-160 nmol	Primers para MLST F'	S/ 5.18	S/. 367.78
MATERIALES PLÁSTICOS				
25	Paq x 10 und	Asas de siembra descartables	S/ 8.43	S/. 210.75
4	96 uni/rack	Tips Esteril con filtro 10 µl	S/ 29.00	S/. 116.00
4	96 uni/rack	Tips Esteril con filtro 50 µl	S/ 28.00	S/. 112.00
1	Paq x 200 und	Hisopos estériles	S/ 8.10	S/. 8.10
2	Bolsa x 200 und	Criovial 1.5 mL	S/ 275.00	S/. 550.00
15	Bolsa x 12 strips	PCR Strips 8 x 0.1 mL	S/ 42.00	S/. 630.00
CEPAS ATCC				
1	1 vial	<i>Escherichia coli</i> MC1061 AziR	S/ 120.00	S/. 120.00
1	1 vial	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA - 1705	S/ 145.00	S/. 145.00
1	1 vial	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA - 2146	S/ 155.00	S/. 155.00
1	1 vial	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA - 2524	S/ 155.00	S/. 155.00
1	1 vial	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA - 1706	S/ 148.00	S/. 148.00
			Subtotal	S/. 7,538.91

SERVICIOS

Cantidad	Unidad de Medida	Descripción	Costo Unitario	Costo Total (S/.)
800	1 GEN R y F	Servicio de Secuenciamiento Macrogen	S/ 38.46	S/ 30,768.00
			Subtotal	S/ 30,768.00

TOTAL DE BIENES Y SERVICIOS

S/. 38,306.91

5 CRONOGRAMA

Actividades	Tiempo (meses)	Año 2022											
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic
Registro y aprobación del proyecto en la Facultad de Medicina de UPCH	1.5	X	X										
Registro y aprobación del proyecto en el Comité de Ética de UPCH	1.5		X	X									
Registro y aprobación del proyecto en el centro de salud	1			X									
Recolección de datos	1			X									
Procesamiento de muestras	5			X	X	X	X	X					
Análisis de datos	5						X	X	X	X	X		
Redacción de informe final	3										X	X	X

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fariña N. Bacterial resistance. A global public health problem with difficult solution. Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud. 2016 May 10;14(1):4–7.
2. Alós JI. Antibiotic resistance: A global crisis. Vol. 33, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Elsevier Doyma; 2015. p. 692–9.
3. Kazmierczak KM, Karlowsky JA, de Jonge BLM, Stone GG, Sahn DF. Epidemiology of carbapenem resistance determinants identified in meropenem-nonsusceptible enterobacteriales collected as part of a global surveillance program, 2012 to 2017. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(7).
4. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017 [cited 2020 Dec 10]. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
5. Miller AD, Ball AM, Bookstaver PB, Dornblaser EK, Bennett CL. Epileptogenic potential of carbapenem agents: Mechanism of action, seizure rates, and clinical considerations.

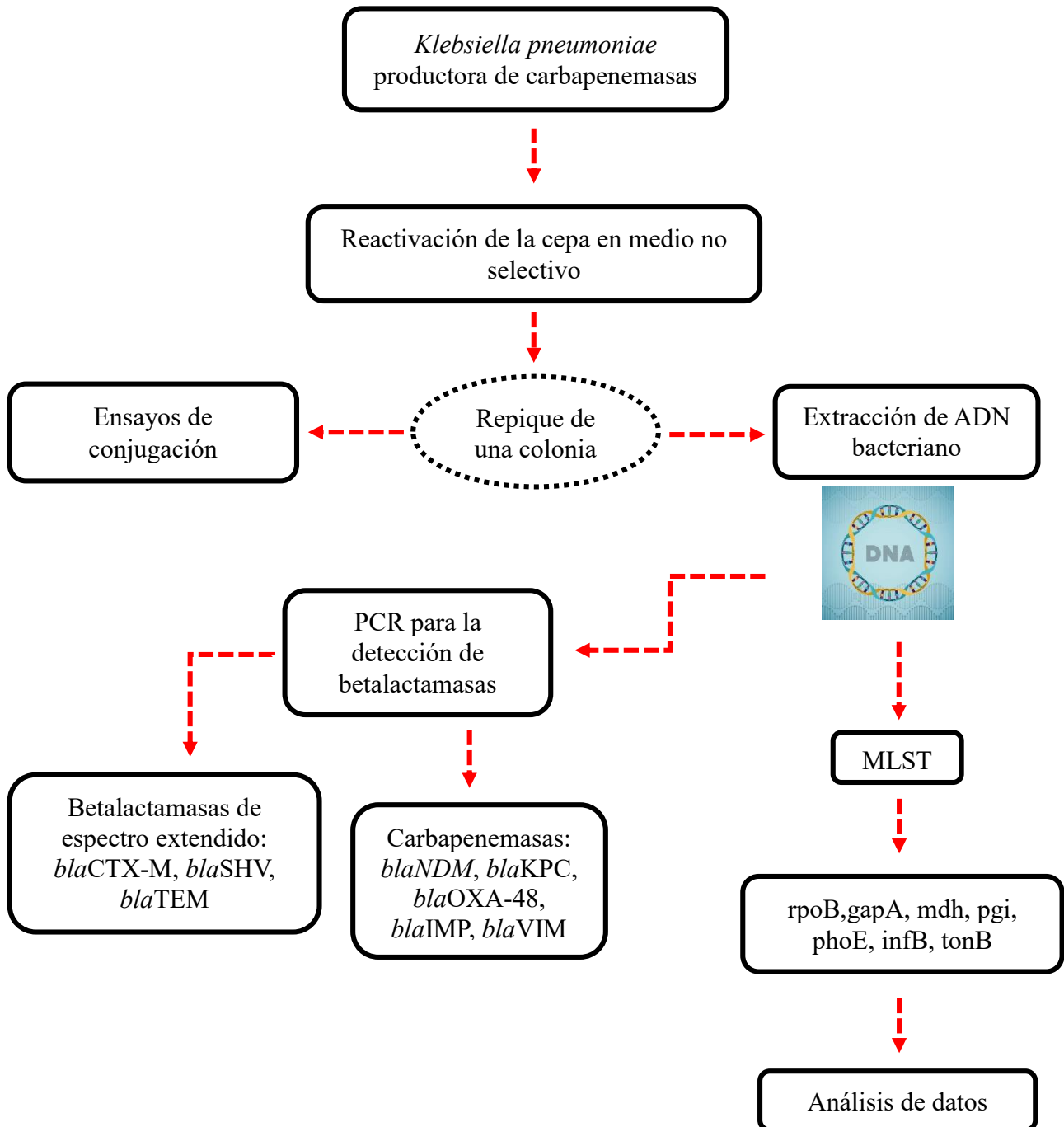
- Pharmacotherapy. 2011;31(4):408–23.
6. Garau J, Elías J, Sánchez G, José M, Martínez F, Inmaculada M, et al. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias [Internet]. Vol. 28, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010. Available from: www.elsevier.es/eimc
 7. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct;25(4):682–707.
 8. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* [Internet]. 2014;44(2):51–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>
 9. Velásquez J, Fernández N, Suárez L, Sacaquispe R, Pinedo Y, Candiotti M, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenems: primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú TT - Carbapenems resistant *Klebsiella pneumoniae*: first case of type KPC carbapenemase in Peru. *Rev Soc Peru Med Interna* [Internet]. 2013;26(4):192–6. Available from: http://www.medicinainterna.org.pe/pdf/2013/vol26num4/reporte_de_caso.pdf
 10. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo JJ, Chiappe-Gonzalez A, Vargas-Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori DH, et al. *Klebsiella pneumoniae* New Delhi metallo-lactamase in a Peruvian national hospital. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017 Apr 1;34(2):261–7.
 11. Sacaquispe-Contreras R, Bailón-Calderón H. Identification of carbapenem-resistant genes in enterobacteria from Peruvian hospitals, 2013-2017. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018 Apr 1;35(2):259–64.
 12. Pons MJ, Marí-Almirall M, Ymaña B, Moya-Salazar J, Muñoz L, Sauñe S, et al. Spread of st348 *klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in a peruvian hospital. *Microorganisms*. 2020 Sep 1;8(9):1–10.
 13. Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Bondi A, Ghibaud D, Zanotto E, et al. Carbapenemase detection testing in the era of ceftazidime/avibactam-resistant KPC-producing Enterobacteriales: A 2-year experience. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2021;24:411–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.008>
 14. CLSI. 28th Edition M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Journal of Services Marketing. 2018.
 15. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Vol. 54, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010. p. 969–76.
 16. Österblad M, Hakanen AJ, Jalava J. Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7553–6.
 17. Algoritmos | antimicrobianos.com.ar [Internet]. [cited 2022 Feb 7]. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/category/algoritmo/>
 18. Delgado-Auna Lima C, Peruana Cayetano Heredia Lima U, Nacional Federico Villarreal Lima U, Galván F, Agapito J, Bravo N, et al. INVESTIGACIÓN ORIGINAL / ORIGINAL RESEARCH. Vol. 27, *Rev Med Hered*. 2016.
 19. Protocolo de PCR-Multiplex para la detección de carbapenemasas | antimicrobianos.com.ar [Internet]. [cited 2022 Jan 26]. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/2019/10/protocolo-de-pcr-multiplex-para-la-deteccion-de-carbapenemasas/>
 20. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4178–82.
 21. Cheng F, Li Z, Lan S, Liu W, Li X, Zhou Z, et al. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* associated with cattle infections in southwest China using multi-locus sequence typing (MLST), antibiotic resistance and virulence-associated gene profile analysis. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2018;49:93–100. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.004>

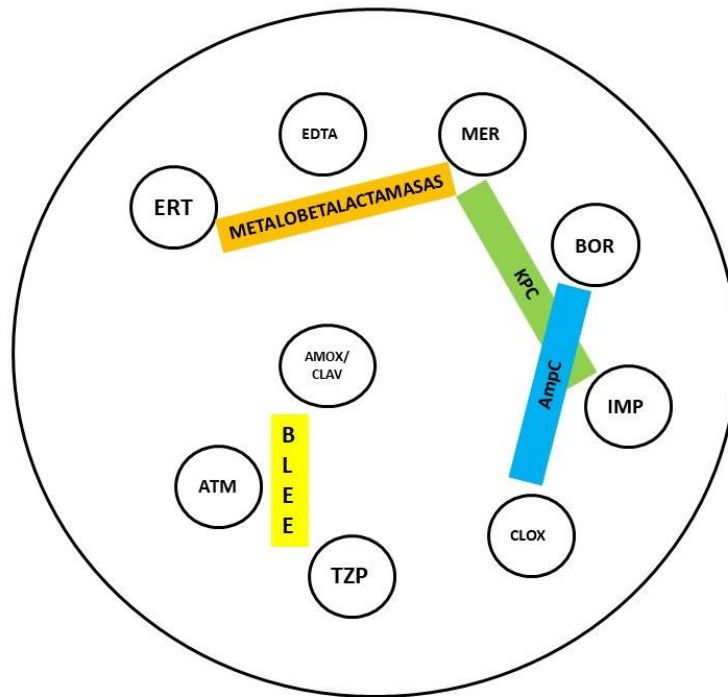
22. Cárdenas M, Fernández De Henestrosa AR, Campoy S, Perez De Rozas AM, Barbé J, Badiola I, et al. Virulence of *Pasteurella multocida* recA mutants. *Vet Microbiol.* 2001;80(1):53–61.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1: Flujograma para el procesamiento de aislados bacterianos.



7.2 Anexo 2: Plantilla para Sinergia de Discos



Adaptado del Protocolo para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas del Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos INEI- ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Web: [Algoritmos | antimicrobianos.com.ar](http://algoritmos.antimicrobianos.com.ar)

7.3 Anexo 3: Protocolo de conjugación bacteriana

Procedimiento de conjugación adaptado de Cárdenas y colaboradores. (22) Las cepas donadoras corresponden a las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas y como cepa receptora se utilizará una *Escherichia coli* MC1061 AziR.

- Reconstituir cepas donadoras y receptoras en Agar nutritivo. Incubar a 37°C durante 18 horas.
- Cultivar células donadoras y receptoras en 5 ml de Caldo MH. En matraces de 10mL
- Llevar a un OD 600=0,6 a 37°C en agitación. Hacer una mezcla de las células donadoras y receptoras 1:1, en un volumen final de 1mL. 2min en mix suave.
- 100µL de la mezcla se colocan sobre agar Mueller Hinton, el cual se incuba por 18h a 37°C.
- Colocar sobre la placa de agar MH 1ml de caldo MH para resuspender las colonias bacterianas y transferirla a un criovial.
- Se toman 100µL de la resuspensión y se siembra sobre agar MH con 0.5 mg/l de meropenem + 100 mg/l de azida de sodio. Se esparce con asa Driglasky.
- Preservar cepas con plásmidos conjugativos en CTS en glicerol al 20%.