



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA DE AISLAMIENTOS DE ESCHERICHIA COLI  
Y KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORAS DE  
B-LACTAMASA AMPC CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA A  
CEFOXITINA EN UN HOSPITAL NACIONAL DURANTE EL 2019,  
LIMA-PERÚ**

**PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL  
RESISTANCE OF B-LACTAMASE AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA  
COLI AND KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATES WITH  
DECREASED SUSCEPTIBILITY TO CEFOXITIN IN A NATIONAL  
HOSPITAL DURING 2019, LIMA-PERU**

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR  
EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN  
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**

**AUTOR:**

ANGELA MARIA JULCA VILCA

**ASESOR:**

STEEV LOYOLA SOSA

**LIMA – PERÚ**

**2021**

**ASESORES DE TRABAJO ACADÉMICO**

**ASESOR**

Magíster en Epidemiología/Steev Orlando Loyola Sosa

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-5455-2423

## **DEDICATORIA:**

Este trabajo va dedicado a mi familia, a mi esposo y a mis hijos que han sido motivadores para el cumplimiento, por su paciencia y comprensión en todo momento.

Al Magister Steev Orlando Loyola Sosa, por su guía y orientación impulsándome siempre a seguir adelante, gracias por todo su apoyo, ánimo, tiempo y paciencia brindada en el desarrollo del trabajo.

Al Magister Edgar Gonzales Escalante, por su gran apoyo incondicional e impulsarme en el campo de la investigación.

A todo el personal del hospital Alberto Sabogal del Callao, sobre todo a los pacientes por ser el gran motivo de este trabajo.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

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

## **DECLARACIÓN DEL AUTOR**

Este proyecto es original y para su planteamiento se han seguido los lineamientos respectivos,

Respetando la ética en investigación. Este proyecto será presentado para obtener un Título de Segunda Especialidad de Tecnología Médica en Microbiología clínica en la Universidad Cayetano Heredia.

## RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA DE AISLAMIENTOS DE ESCHERICHIA COLI Y  
KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORAS DE B-LACTAMASA  
AMPC CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA A CEFOXITINA EN UN

### INFORME DE ORIGINALIDAD



### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia</b> Trabajo del estudiante	<b>4%</b>
<b>2</b>	<b>docplayer.es</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>www.liofilchem.net</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>4</b>	<b>1library.co</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>scielo.isciii.es</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>www.slideshare.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>pesquisa.bvsalud.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>

[coli.usal.es](http://coli.usal.es)

## **TABLA DE CONTENIDOS**

RESUMEN

ABSTRACT

1	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 Justificación	4
2	OBJETIVO E HIPÓTESIS	6
	2.1 Objetivo general	6
	2.2 Objetivos secundarios	6
3	MATERIAL Y MÉTODO	7
	3.1 Diseño del estudio	7
	3.2 Lugar de estudio y población	7
	3.2.1 Criterios de inclusión	7
	3.2.2 Criterios de exclusión	8
	3.3 Muestra	8
	3.4 Definición operacional de variables	9
	3.5 Procedimientos y técnicas	15
	3.6 Aspectos éticos	19
	3.7 Plan de análisis	20
4	PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO	21
5	CRONOGRAMA	22
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

## RESUMEN

**Introducción:** La resistencia antimicrobiana (RAM) es un problema de salud pública que afecta a nivel global, y que se asocia a elevados costos médicos, mayor número de atenciones médicas, mayor estancia hospitalaria y aumento de mortalidad. La caracterización de bacterias genera información epidemiológica útil para el control de la RAM a nivel comunitario y nosocomial. **Objetivo:** Caracterizar fenotípicamente la resistencia antimicrobiana de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a cefoxitina en un hospital nacional durante el periodo 2019, Lima-Perú. Explorar diferencias de la resistencia de acuerdo con características de los pacientes, servicio de referencia y el periodo de aislamiento. **Material y método:** Durante el 2019, se identificaron un total de 136 *E. coli* y 57 *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a Cefoxitina. La caracterización de AmpC será realizada mediante el método de Hodge tridimensional, método de potenciación de AmpC, método de Ácido Fenil Borónico, y método fenotípico simple para diferenciar entre AmpC cromosómico y plasmídico. La caracterización de la RAM será realizada mediante un método automatizado que determinará la concentración mínima inhibitoria para antimicrobianos usados en la práctica clínica. Se explorará asociación bivariadas previa evaluación de supuestos. Se reportará intervalos de confianza al 95% y se considerará un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

**Palabras clave:** Resistencia betalactámica, AmpC B-lactamasa, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*

## **ABSTRACT**

Antimicrobial resistance (AMR) is a global public health problem associated with high medical costs, increased medical care, longer hospital stays and increased mortality. Bacterial characterisation generates epidemiological information useful for the control of AMR at community and nosocomial levels.

**Objective:** To characterise phenotypically the antimicrobial resistance of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates with decreased sensitivity to cefoxitin in a national hospital during the period 2019, Lima-Peru. To explore differences in resistance according to patient characteristics, referral service and isolation period. **Methods:** During 2019, a total of 136 *E. coli* and 57 *K. pneumoniae* with decreased sensitivity to Cefoxitin were identified. AmpC characterisation will be performed using the three-dimensional Hodge method, AmpC potentiation method, Phenyl Boronic Acid method, and simple phenotypic method to differentiate between chromosomal and plasmid AmpC. AMR characterisation will be performed using an automated method that will determine the minimum inhibitory concentration for antimicrobials used in clinical practice. Bivariate associations will be explored after assessment of assumptions. 95% confidence intervals will be reported and a value of  $p < 0.05$  will be considered statistically significant.

**Keywords:** Beta-lactam resistance, AmpC B-lactamase, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*

## INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se asocia al uso desregulado de antimicrobianos en la comunidad y en el ámbito hospitalario (1)(2). El uso poco controlado y libre disposición de antimicrobianos en la comunidad, en la crianza de los animales y en la agricultura favorece la emergencia de la resistencia bacteriana(3).

Los microorganismos utilizan diversos mecanismos para eludir antimicrobianos; cambio del sitio blanco, pérdida de porina, impermeabilidad, producción de enzimas, cambios genéticos o la combinación de más de dos mecanismos(4)(5)(6). La producción de enzimas es el mecanismo de resistencia más frecuente en las Enterobacterias(7)(8). Los mecanismos enzimáticos más frecuentes se fundamentan en la hidrólisis de anillos betalactámicos y está mediado por enzimas denominadas B-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y B-lactamasa AmpC, siendo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* frecuentes portadores de dichos mecanismos en centros hospitalarios y en la comunidad (1).

La detección y la diferenciación de B-lactamasa AmpC son un desafío y una prueba para los laboratorios clínicos, a la fecha no hay métodos prácticos para la identificación, la falta de una guía estándar no permite conocer la real incidencia a nivel mundial.

Las B-lactamasas AmpC pertenecen al grupo uno de la clasificación Bush-Jacoby-Medeiros y a la clase C de la clasificación de Ambler(9). Las B-lactamasa AmpC plasmídicas se clasifican en 6 familias: CIT (CMY, LAT), DHA, ACC, FOX, MOX (EBC, ACT, MIR) y CFE(1). Las B-lactamasas también



pueden encontrarse de forma cromosomal en algunas Enterobacterias como *Afinia alvei*, *Citrobacter freundie*, *Enterobacter spp*, *Aeromona spp*, especies de *Proteus* indol positivo y algunos no fermentadores como *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (1). En *Escherichia coli* y *Shigella spp* pueden encontrarse de forma intrínsecamente constitutiva y expresarse de forma continua, pero a bajos niveles (10). La dispersión B-lactamasas puede estar mediada por plásmidos o integrones, los cuales son elementos genéticos móviles que se encuentran en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y en menor frecuencia en especies de *Salmonella* y *Shigella* (11).

Las B-lactamasas AmpC son enzimas que hidrolizan penicilina, oximinocefalosporinas (ceftriazone, cefotaxima, ceftazidima), cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) y monobactan (aztreonam)(10). No obstante, muestran escasa o nula actividad frente a cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpirone) y carbapenemicos(12). Las B-lactamasas AmpC tienen o no tienen actividad frente a un determinado sustrato o en su defecto son inhibidos o no por el sustrato, pero activos por cloxacilina, ácido fenil borónico y aztreonam (1) (12). La co-resistencia entre AmpC y otros mecanismos ha sido previamente descrita. La producción de B-lactamasas de espectro extendido (BLEE), resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR), enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs) y pérdida de porinas, generalmente favorece la emergencia de resistencia a los carbapenémicos(9)(11).

La prevalencia de AmpC hasta el 2010 en los Estados Unidos, Asia y China ha sido baja en comparación a BLEEs. No obstante, la capacidad que tiene AmpC de acoplarse a otros genes y diseminarse por plásmidos favoreció el

incremento en la prevalencia de dicho mecanismo, siendo los genes de tipo AmpC blaCMY-2 (*E. coli*) y blaDHA-1 (*K. pneumoniae*) los más frecuentes en el Sudeste Asiático (~12%) y Europa (~10%), respectivamente (4).

Los estudios de caracterización de B-lactamasa tipo AmpC plasmídico son poco frecuentes en la literatura científica, y los estimados sobre prevalencia o incidencia varían de acuerdo al lugar de estudio. Pitout y colaboradores desarrollaron un estudio en Canadá durante el periodo 2000-2003, y sugirieron que la tasa de incidencia anual de aislamiento aumentó significativamente desde el 2000 hasta el 2003, alcanzando una tasa anual de 15 casos por cada 100,000 habitantes por año, siendo el gen CMY-2 el más predominante(13). Denisuik et al y colaboradores evaluaron la prevalencia de AmpC plasmídico en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, y reportaron para el 2007 una prevalencia de 0.7% y de 2.9% para el 2011, identificando además que dicho aumento estuvo correlacionado con una aumentada tasa de incidencia de BLEE(14). En Pakistán, durante el 2015, Lahone y colaboradores reportaron que el 21.5% de los aislamientos de *K. pneumoniae* fueron portadores de AmpC plasmídico(12). Para el mismo año, Alima y colaboradores reportaron que, de todas las *E. coli* y *K. pneumoniae*, el 1.7% eran productoras de AmpC, de las cuales 14 *E. coli* portaban el gen CMY-4 y una *K. pneumoniae* el gen DHA. Del mismo modo, todas co-expresaban BLEE y poseían un genotipo de virulencia del grupo D y B(15). Durante el 2017, en Arabia Saudita se reportó la frecuente co-expresión de AmpC plasmídico y genes PMQR, con predominio de CMY-2(11), y en la India co-expresión con genes DHA y CIT en *K. pneumoniae* y MOX y ACC en *E. coli*(16). Recientemente, en Irán se reportó una prevalencia de 9.2% en *E. coli* y

20.0% en *K. pneumoniae* productoras de AmpC plasmídico(17), y en Barcelona España un 1.1% de prevalencia de AmpC en *E. coli*(18).

A nivel regional, el estudio y caracterización es aún más escaso. Jure y colaboradores ejecutaron un estudio en Argentina durante el 2005, encontrando una prevalencia de 0.5% de *E. coli* productoras de AmpC, donde el gen CMY-2 fue el más frecuente(19). En Perú, durante el 2015 Gutierrez y colaboradores reportaron la ausencia de Enterobacterias productoras de AmpC en un Hospital Provincial Docente Belén de Lambayeque(20). No obstante, para el 2018, Cruz y colaboradores reportaron un 1.4% de AmpC en *K. pneumoniae* y 0.8% en *E. coli*(21).

## **1.1 Justificación**

La emergencia y rápida dispersión de la resistencia antimicrobiana se asocia de forma significativa a elevados costos médicos y de atención, así como mayor tiempo de estancia hospitalaria, y aumento de la tasa de mortalidad, principalmente(11)(22)(23). La correcta caracterización de los patógenos circulantes, integrada con información epidemiológica permite tomar decisiones basadas en evidencia no solo para evaluar si el tratamiento empírico sigue siendo adecuado, sino también para tomar decisiones en la vigilancia y control de la resistencia antimicrobiana.

El estudio de AmpC plasmídico a nivel global es limitado, y a nivel regional es bastante escaso. No obstante, la emergencia de este mecanismo y su asociación con diversos mecanismos conllevan a que su estudio y caracterización en patógenos de interés público sea de gran relevancia. En tal sentido, este

proyecto de investigación ha sido diseñado para caracterizar los aislamientos *de E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de AmpC con sensibilidad disminuida a cefoxitina en un hospital nacional durante el 2019.

La información generada podría ser utilizada como parte de una línea basal de vigilancia, así como para plantear medidas de control y uso racional de los antibióticos.

## **2 OBJETIVO E HIPÓTESIS**

### **2.1 Objetivo general**

- Caracterizar fenotípicamente la resistencia antimicrobiana de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productora de betalactamasa AmpC con sensibilidad disminuida a cefoxitina en un hospital nacional durante el periodo 2019, Lima-Perú

### **2.2 Objetivos secundarios**

- Explorar diferencias en el perfil de resistencia antimicrobiano de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de betalactamasa AmpC con sensibilidad disminuida a cefoxitina de acuerdo al sexo, edad y tipo de muestra.
- Explorar diferencias de resistencia antimicrobiana de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de betalactamasa AmpC con sensibilidad disminuida a cefoxitina de acuerdo al servicio de referencia.
- Explorar diferencias en el perfil de resistencia antimicrobiano de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de betalactamasa con sensibilidad disminuida a cefoxitina de acuerdo al mes de aislamiento.

### **3 MATERIAL Y MÉTODO**

#### **3.1 Diseño del estudio**

Este estudio transversal descriptivo y de periodo; enero a diciembre del 2019. Este es un análisis secundario de datos debido a que las cepas se encuentran almacenadas en un cepario del Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren.

#### **3.2 Lugar de estudio y población**

El Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren es una institución nacional de nivel IV que se encuentra ubicado en la provincia constitucional del Callao. Es además un hospital de alta complejidad que representa la Red Sabogal ESALUD del Cono Norte de Lima.

La población está conformada por la totalidad de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, que se caracterizan por expresar sensibilidad disminuida a Cefoxitina (>8 mg/l). La información de todos los aislamientos se encuentra disponible en los registros del sistema automatizado MicroScans WalkAway (Siemens). Los aislamientos bacterianos provienen de muestras de orina, esputo, heridas, líquidos biológicos, sangre, secreciones bronquiales, traqueales y tejidos, incluyendo aislamientos de pacientes hospitalizados y comunitarios, de ambos sexos y de todas las edades.

##### **3.2.1 Criterios de inclusión**

- Aislamiento de *E. coli* o *K. pneumoniae* obtenido de una muestra humana durante el 2019
- *E. coli* o *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a cefoxitina, amoxicilina/ácido clavulánico y al menos a dos oxycetalosporinas.

- *E. coli* o *K. pneumoniae* viable

### 3.2.2 Criterios de exclusión

- El no cumplimiento de al menos un criterio de inclusión será motivo de exclusión.

### 3.3 Muestra

El total de aislamientos bacterianos para el 2019 fue de 6941, de los cuales, 4098 fueron *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Luego de revisar los resultados y disponibilidad de los aislamientos, un total de 136 *Escherichia coli* y 57 *Klebsiella pneumoniae* cumplieron con los criterios propuestos en este proyecto. Por tanto, el total de población para el estudio será de 193 aislamientos bacterianos. Las cepas almacenadas se encuentran en caldo tripticasa de soya con 20% de glicerol a -50°C.

Debido a la naturaleza del estudio, y al potencial sesgo de perder patrones infrecuentes en cepas no seleccionadas, este estudio propone trabajar con el total de la población identificada. En tal sentido, los 193 aislamientos no serán sometidos a muestreo. La unidad de análisis será el aislamiento bacteriano.

### 3.4 Definición operacional de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo y escala de medición
Sexo	Condición biológica y orgánica que define a un ser humano de acuerdo a su sexo	Condición biológica registrada en los documentos del laboratorio de microbiología	Femenino Masculino	Categorico nominal
Edad	Tiempo cronológico transcurrido desde el nacimiento hasta el momento en que la muestra biológica ha sido recepcionada en el laboratorio clínico	Diferencia del tiempo dado entre la fecha de recepción de la muestra y la de nacimiento	Años	Numérico intervalo
Tipo de muestra	Naturaleza de la muestra humana frecuentemente recolectada para hacer diagnóstico clínico	Tipos de muestra recolectada y registrada en los documentos del laboratorio de microbiología	Orina herida esputo secreción sangre líquidos biológicos	Categorico nominal
Producción de AmpC por Hodge	Mecanismo de resistencia codificado a nivel plasmídico en contra de las B-lactamasa	Mecanismo de resistencia detectado por el Método Hodge tridimensional interpretada por la presencia de distorsión	Positivo negativo	Categorico nominal
Producción de AmpC por potenciación	Mecanismo de resistencia codificado a nivel cromosómico o plasmídico contra las B-lactamasas	Mecanismo de resistencia detectado por el Método de potenciación de doble disco interpretada con lectura de halos $\geq 5$	Positivo negativo	Categorico nominal
Producción de AmpC por doble disco	Mecanismo de resistencia codificado a nivel cromosómico o plasmídico contra las B-lactamasas	Mecanismo de resistencia detectado por el método de potenciación de doble disco e interpretada de acuerdo a la diferencia de halos entre CTX, CTX-CA, y CTX-CA-AFB	BLEE AmpC BLEE + AmpC	Categorico nominal
Producción de AmpC plasmídico por AFB	Mecanismo de resistencia codificado a nivel plasmídico en contra de B-lactamasa	Mecanismo de resistencia detectado por la técnica con AFB en caso de coexistencia de BLEE – AmpC interpretada con	Positivo, negativo	Categorico nominal



		Presencia de colonias dispersas dentro del halo		
Evaluación de susceptibilidad para ampicilina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para Ampicilina/sulbactan	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para Amoxicilina/ac. clavulánico	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para Ácido nalidixico	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal

Evaluación de susceptibilidad para aztreonam	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para amikacina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para Cefalotina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para Cefuroxima	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para Ceftazidima	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal

	diferentes concentraciones	diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología		
Evaluación de susceptibilidad para cefotaxima	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para cefepima	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para ciprofloxacina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para colistina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a	Sensible Intermedio Resistente	Categorico ordinal

		la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología		
Evaluación de susceptibilidad para ertapenem	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para fosfomicina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para imipenem	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para meropenem	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal

Evaluación de susceptibilidad para nitrofurantoina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para norfloxacina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para tigeciclina	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal
Evaluación de susceptibilidad para Trimetropin sulfametoazol	Mecanismo de resistencia que codifica resistencia al antimicrobiano en diferentes concentraciones	La resistencia será determinada usando la técnica de microdilución usando concentraciones diversas para el antimicrobiano. Los resultados serán interpretados de acuerdo a la CLSI, registrados en los documentos del laboratorio de microbiología	Sensible Intermedio Resistente	Catagórico ordinal

La evaluación de susceptibilidad para cada antimicrobiano será realizada utilizando los criterios establecidos por CLSI(24).

### **3.5 Procedimientos y técnicas**

Todos los resultados de sensibilidad a antimicrobianos se encuentran disponible en los registros del laboratorio. Los datos relacionados al sexo, edad y tipo de muestra es información que será obtenida desde los registros del laboratorio. En tal sentido, este estudio propone recolectar la información disponible de los registros, y completar la caracterización de los aislamientos bacterianos que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión propuestos en este protocolo. A la fecha, se han desarrollado e introducido varios métodos para la detección de AmpC en *E. coli* y *K. pneumoniae* con o sin producción de otros mecanismos de resistencia. Debido a que no existe una metodología con adecuado rendimiento, este estudio propone utilizar diversas aproximaciones para optimizar el sistema de detección.

- **Test tridimensional para AmpC**

Adaptación del test modificado de Hodge, y recomendado por primera vez en el 2009 por la CLSI como test fenotípico de confirmación para detectar carbapenemasas(24). La prueba según Coudron et al(25) consiste en preparar de la cepa en estudio, una suspensión bacteriana a escala de McFarland tubo 5 ( $1.5 \times 10^9$ ). Luego preparar una suspensión con *E. coli* ATCC 25922 a escala 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$ ). Utilizar un hisopo de algodón estéril y extender la suspensión de *Escherichia coli* sobre la superficie de una placa de Mueller Hinton

según el método estandarizado CLSI (24). Colocar en el centro un disco de cefoxitina de 30 ug, a una distancia de 3 mm del borde del disco, realizar con un bisturí cortes sobre el agar de manera que se haga una rendija hacia el exterior en dirección radial. De la cepa preparada, con una pipeta depositar 30 uL y deslizarlo en toda la ranura hasta que el líquido se absorba. Incubar 18-24 horas a 35°C. La aparición de distorsión será considerada como positivo.

- **Método de potenciación de doble disco**

En los casos de *E. coli* productoras de AmpC plasmídica constitutivas o hiperproductoras, es necesario utilizar metodologías con inhibidores, como ácido Fenil Borónico (AFB). Beesley y colaboradores determinaron que el AFB es un inhibidor competitivo reversible de las B-lactamasa AmpC(26)(27). Tomando en cuenta dicha característica se propone utilizar la metodología de Condrón:

Preparación disco con ácido Fenil Borónico (AFB): Se disolverá 120 mg de AFB en 3 mL de dimetilsulfóxido, y luego se agregará 3 mL de agua destilada estéril. Preparado el reactivo, se dispensará 20 uL en un disco de cefotetan 30 µg (BBL, Oxoid, Bioanalysis). La concentración final de AFB es de 400 ug. El disco preparado se dejará secar durante 30 minutos para luego ser usado o ser almacenado en viales herméticos con desecante a 4°C o -70°C para almacenamiento prolongado(28)(27).

La técnica consiste en preparar una suspensión bacteriana de la muestra problema a 0.5 de McFarland. Utilizando un hisopo de algodón estéril, extender la suspensión sobre la superficie de una placa de Mueller Hinton. Colocar sobre la placa un disco de cefotetan de 30 ug y otro de cefotetan 30ug + AFB. Incubar de

18-24 horas a 35°C. Determinar si existe diferencia de halos. Una diferencia de los halos  $\geq 5$  mm sugiere positividad, y una diferencia  $< 5$  mm sugiere negatividad.

- **Técnica de Ácido Fenil Borónico (AFB), en casos de coexistencia de BLEE-AmpC**

Esta técnica será usada en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de B-lactamasa de espectro extendido con sospecha de producción de AmpC(10)(29), siendo esta, una técnica recomendada por CLSI en casos de co-expresión de ambos mecanismos de resistencia(24). Utilizando este fundamento se realizará la búsqueda de AmpC asociado a B-lactamasa de espectro extendido. Los discos de Cefotaxima, y Cefotaxima + ácido clavulánico se encuentran disponibles comercialmente (BBL, Oxoid, Bioanalyse). Los controles de calidad de la prueba, se realizará con la cepa ATCC de *K. pneumoniae* 700603 BLEE+ y AmpC – y la cepa R154 BLEE – y AmpC +. Los siguientes pasos incluyen modificaciones a la técnica estándar con AFB(29)(30)(31) y están basados en la descripción realizada por Song y colaboradores; para preparar el disco se disolverá 120 mg de AFB en 3 mL de dimetilsulfóxido, y luego se agregará 3 mL de agua destilada estéril. Preparado el reactivo, se dispensará 20 uL en disco de Cefotaxima 30 ug, Cefotaxima/Acido clavulánico 30/10  $\mu$ g (BBL, Oxoid, Bioanalysis). La concentración final de AFB es de 400 ug. El disco preparado se dejará secar durante 30 minutos para luego ser usado o se almacenado en viales herméticos con desecante a 4°C o a -70°C(29).

La técnica consiste en preparar una suspensión bacteriana equivalente a 0.5 McFarland a partir de colonias frescas. Utilizando un hisopo de algodón estéril



extender la suspensión sobre la superficie de una placa de Mueller Hinton según el método estandarizado(24). Aplicar los discos de Cefotaxima 30 ug, Cefotaxima 30 ug + AFB de 400 ug, y cefotaxima /ácido clavulánico + AFB 400 ug, en la placa inoculada, asegurándose de que haya suficiente espacio entre los discos para poder leer correctamente las zonas de inhibición. Incubar a 35°C durante 18-24 horas. Medir los halos de inhibición con una regla milimetrada e interpretar de acuerdo a la siguiente tabla (10)(29):

DISCOS	Cefotaxima (CTX)	Cefotaxima + ácido clavulánico (CTX+CA)	Cefotaxima + Ácido fenil borónico (CTX+AFB)	Resultado
CTX+ CA o CTX+CA+AFB	≥ 5 mm	No aplica	No aplica	BLEE
	No aplica	No aplica	≥ 3 mm	
CTX+AFB o CTX+CA+AFB	≥ 5 mm	No aplica	No aplica	AmpC
	No aplica	≥ 5 mm	No aplica	
CTX+CA+AFB	No aplica	No aplica	≥ 3 mm	BLEE+ AmpC
	No aplica	≥ 5 mm	No aplica	

- ***Método fenotípico simple para diferenciación entre AmpC cromosómico y plasmídica***

Los métodos fenotípicos mencionados anteriormente no permiten diferenciar entre AmpC cromosómicas o plasmídicas adquiridas(10). Mirelis y colaboradores propusieron un método visual para diferencias entre ambos mecanismos. El método se fundamenta en la presencia de colonias dispersas localizadas en la proximidad del borde de los halos de inhibición de los discos de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, que solamente se encontraría en cepas productoras de enzimas plasmídicas(32). El patrón fenotípico de presencia de

colonias dispersas dentro del halo de inhibición presenta una sensibilidad y especificidad de 100% para la detección de AmpC plasmídica.

- **Control de calidad**

Las cepas elegidas de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión serán reactivadas. Se verificará su pureza mediante pruebas de microbiología basadas en cultivo y reacciones enzimáticas. Los medios de cultivo serán controlados para evaluar contaminación, así como para asegurar la concentración adecuada de timina, timidina e iones metálicos, así como el nivel de pH. Los discos de antibióticos y los reactivos serán controlados utilizando cepas ATCC de *E. coli* 25922 y 35218, *P. aeruginosa* 27853, *K. pneumoniae* 700603, *E. faecalis* 29212 y *S. aureus* 25923. Para evaluar la producción AmpC se utilizarán cepas de *Enterobacter cloacae* ATCC BAA 1143 (AmpC positivo) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (control negativo).

### **3.6 Aspectos éticos**

Este protocolo será enviado a registro y revisión ante la Facultad de Medicina. Posteriormente, será sometido a evaluación por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH). Finalmente, será sometido a revisión y aprobación ante las oficinas que regulan la investigación en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren.

Este estudio propone únicamente trabajar con aislamientos bacterianos y no con pacientes de forma directa. La información derivada de pacientes será codificada para mantener el anonimato. No obstante, este proyecto no propone recolectar

datos que permitan la identificación de sujetos. 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**

Las variables categóricas y numéricas serán resumidas usando medidas que se ajusten a la naturaleza de sus datos. Las variables numéricas serán resumidas usando una medida de tendencia central y dispersión que refleje la distribución de los datos. Se explorará asociación bivariadas entre variables categóricas mediante la prueba de chi cuadrado, y la asociación entre numéricas y categóricas usando pruebas paramétricas. En caso los supuestos de las pruebas paramétricas no sean cumplidos, se optará por usar pruebas no paramétricas. Se reportará intervalos de confianza al 95% y se considerará un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. El análisis de datos será ejecutado en Stata v15.

## 4 PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO

Fuente de financiamiento: Autofinanciado

### BIENES

Cantidad	Unidad de Medida	Descripción	Costo Unitario	Costo Total (S/.)
1	500 gr	Agar Muller Hinton	S/. 350.00	S/. 350.00
1	100 gr	Caldo tripticasa de soya	S/. 63.00	S/. 63.00
8	tubo x 50	Disco cefotetan 30ug	S/. 30.00	S/. 240.00
1	1 gr	Acido benceno borónico	S/. 60.00	S/. 60.00
4	tubo x 50	Disco cefoxitina 30 ug	S/. 13.00	S/. 52.00
8	tubo x 50	Disco cefotaxima 30 ug	S/. 13.00	S/. 104.00
4	tubo x 50	Disco cefotaxima/ac. Clavulanico 30/10 ug	S/. 13.00	S/. 52.00
5	caja x 100	Hisopos estériles	S/. 8.00	S/. 40.00
1	50 unid	Hojas de bisturí estéril	S/. 30.00	S/. 30.00
1	caja x 100	Guantes estéril descartables	S/. 6.00	S/. 6.00
10	unid	Mandilones descartables	S/. 3.00	S/. 30.00
5	unid	Mascarillas 3M	S/. 3.00	S/. 15.00
60	bolsa x 10	Placas petri descartable de 100x 15 mm	S/. 6.00	S/. 360.00
			<b>Subtotal</b>	S/. 1,402.00

### SERVICIOS

Cantidad	Unidad de Medida	Descripción	Costo Unitario	Costo Total (S/.)
1	Unid	Incubadora	S/. 0.00	S/. 0.00
1	Unid	Congeladora a -70C	S/. 0.00	S/. 0.00
1	Unid	Refrigeradora a 4C	S/. 0.00	S/. 0.00
			<b>Subtotal</b>	S/. 0.00

**5 CRONOGRAMA**

Actividades	Tiempo (meses)	Año 2020											
		Ene	Feb	Mar	Abr	Ma y	Ju n	Jul	Ago	Se t	Oc t	Nov	Di c
Evaluación por Facultad de Medicina y comité de Ética	2	X	X										
Capacitación de evaluadores	1			X									
Recolección de datos de datos	3				X	X	X						
Monitoreo y procesamiento de base de datos	6				X	X	X	X	X	X			
Análisis de datos	2									X	X		
Redacción de informe final	2										X	X	X

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seral C, Castillo FJ. Emergencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas ( pAmpC ó cefamicinasas ): origen , importancia , detección y alternativas terapéuticas. 2014;(June).
2. Frieri M, Kumar K, Boutin A. ARTICLE IN PRESS Antibiotic resistance. *J Infect Public Heal J Infect Public Heal* [Internet]. 2016;10(4):369–78. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034116301277%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
3. Uso AYMAL, Grado TF De. Uso, abuso y mal uso de los antibióticos. *Rev Enfermería CyL*. 2019;11(1):181–8.
4. La B, Del E. Artículo de revisión betalactamasas: la evolución del problema. 2018;2(2):42–9.
5. Ghanavati R, Darban-Sarokhalil D, Navab-Moghadam F, Kazemian H, Irajian G, Razavi S. First report of coexistence of AmpC beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from burn patients. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2017;64(4):455–62.
6. Rensing KL, Abdallah HM, Koek A, Elmowalid GA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Al Naiemi N, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC in *Enterobacteriaceae* isolated from humans and from retail meat in Zagazig, Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):1–8.
7. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161–82.
8. Veeraraghavan B, Walia K. Antimicrobial susceptibility profile &

resistance mechanisms of Global Antimicrobial Resistance Surveillance System ( GLASS ) priority pathogens from India. 2019;(February):87–96.

9. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.

10. Martínez D. Artículo de revisión Betalactamasas tipo AmpC :generalidades y métodos para detección fenotípica. *Rev la Soc Venez Microbiol*. 2009;78–83.

11. Abdalhamid B, Alunayan S, Shaikh A, Elhadi N, Aljindan R. Prevalence study of plasmid-mediated AMPC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible ampC from Saudi hospitals. *J Med Microbiol*. 2017;66(9):1286–90.

12. Younas S, Ejaz H, Zafar A, Ejaz A, Saleem R, Javed H. AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: An emerging threat to the paediatric patients. *J Pak Med Assoc*. 2018;68(6):893–7.

13. Pitout JDD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for AmpC  $\beta$ -lactamase- producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(3):443–8.

14. Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PRS, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Taylor F, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-, AmpC  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68 Suppl 1:57–65.

15. Gharout-Sait A, Touati A, Guillard T, Brasme L, de Champs C. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized

- and non-hospitalized patients in Algeria: Description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* iso. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2015;19(2):187–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.12.001>
16. Mohamudha PR, Harish BN, Parija SC. Molecular description of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases among nosocomial isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* from six different hospitals in India. *Indian J Med Res*. 2012;135(1):114–9.
  17. Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Ghafourian S, Yazdani F, Sadeghifard N, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates. *Med Princ Pract*. 2019;
  18. Alonso Louro N. THESIS: Caracterización molecular de los genes bla AmpC cromosómicos y adquiridos en aislados clínicos de *Escherichia coli* en el área de Barcelona. 2014;
  19. Jure MA, Presti C, Cudmani NM, Grellet LM, López C, Musa EH, et al.  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas tipo CMY-2 emergentes en Tucumán, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43(1):24–7.
  20. Biológicas FDEC. Bach. Andrés Galindo Céspedes Bach. Leydi Roxana Gutierrez Armijos. 2015;
  21. Margen DELA, Del I. Universidad nacional de piura facultad de economia “. 2009;1–135.
  22. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC Disk Test for Detection of Plasmid-Mediated AmpC<sub>NL</sub>-Lactamases in Enterobacteriaceae Lacking Chromosomal AmpC<sub>NL</sub>-Lactamases. 2005;43(7):3110–3.



23. Ángel M, Valdés S. CIENCIAS EPIDEMIOLOGICAS Y SALUBRISTAS  
La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento  
y aplicación en la política antimicrobiana Microbial resistance in the current  
context and the importance of knowledge and applicati. 2017;402–19.
24. Clinical laboratory Standard Institute. 2018.  
Preformance standards for antimicrobial disk susceptibily  
tests. M02 standard, 13<sup>th</sup> 233 edition. Clinical and laboratory  
Standards Institute, Wayne, PA
25. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC  
beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus*  
*mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1791–  
6.
26. Beesley T, Gascoyne N, Knott-hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurint  
B, et al. gmmrene.PDF. 1983;209:229–33.
27. Lee W, Jung B, Hong SG, Song W, Jeong SH, Lee K, et al. *Escherichia coli*,  
*Klebsiella pneumoniae* Korean Source *Proteus mirabilis* Korean Source AmpC  $\beta$ -  
lactamase Korean Source 3 Korean Source. *Korean J Lab Med*. 2009;29(5):448–  
54.
28. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated  
AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J*  
*Clin Microbiol*. 2005;43(8):4163–7.
29. Song W, Il KB, Lee YN, Lee CH, Sang HL, Seok HJ. Detection of extended-  
spectrum  $\beta$ -lactamases by using boronic acid as an AmpC  $\beta$ -lactamase

inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1180–4.

30. Nayar R. Antibiotic impregnated tablets for screening ESBL and AmpC beta lactamases. *IOSR J Pharm*. 2012;2(2):207–9.

31. Derbyshire H, Kay G, Evans K, Vaughan C, Kavuri U, Winstanley T. A simple disc diffusion method for detecting AmpC and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(3):497–501.

32. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2006;24(6):370–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1157/13089690>