

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la metodología
en placa con agar cromogénico contra amplificación por PCR, para
la detección de carbapenemasas en muestras de heces humanas en
Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Laura Sofia Yantuche Menchú

para optar al grado académico de

Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la metodología
en placa con agar cromogénico contra amplificación por PCR, para
la detección de carbapenemasas en muestras de heces humanas en
Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Laura Sofia Yantuche Menchú

para optar al grado académico de

Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2023

Vo. Bo.:



(f) _____


Dalia Lau-Bonilla, PhD.

Tribunal examinador:




(f) _____

Dalia Lau-Bonilla, PhD.



(f) _____

Brooke Ramay, PhD.



(f) _____

Lic. Christa Contreras

Fecha de aprobación del examen de graduación: Guatemala, 4 de diciembre de 2023

PREFACIO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones involucradas en este trabajo de graduación. En especial, quiero mencionar a:

A mi familia, por todo el cariño y apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A la doctora Dalia Lau Bonilla, asesora de este trabajo de graduación, por todo el apoyo, guía y acompañamiento desde el inicio del proyecto. Agradezco cada una de sus enseñanzas. Sus valiosos aportes y consejos enriquecieron enormemente este trabajo de graduación.

A la doctora Brooke Ramay, por su apoyo constante en conjunto con el Centro de Estudios en Salud. Especialmente quiero agradecerles por permitir y facilitar el acceso a las muestras y a los Wright Grants que hicieron posible la realización de este proyecto.

Al doctor Douglas Call y a la Universidad Estatal de Washington por la generosa donación de insumos y reactivos que permitieron el desarrollo y ejecución de este trabajo de graduación.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	vii
LISTADO DE CUADROS	viii
LISTADO DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	3
A. Objetivo general.....	3
B. Objetivos específicos	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
A. Antibióticos.....	5
1. Mecanismos de acción de los antibióticos	5
B. Resistencia a antibióticos	7
1. Causas de la diseminación de resistencia a carbapenémicos	7
2. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos	8
C. Carbapenemasas	9
1. Clasificación de carbapenemasas.....	10
2. Transmisión de las carbapenemasas	10
3. Carbapenemasas con mayor importancia para la salud pública.....	10
D. Métodos de detección de carbapenemasas	13
1. Métodos no moleculares	14
2. Métodos moleculares	15
3. Comparación de los métodos de detección	16
E. Incidencia de infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas.....	18
1. Infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas en Guatemala	19
2. Implicaciones clínicas y de salud pública de bacterias resistentes a carbapenémicos	20
V. ANTECEDENTES.....	21

A. Origen de las muestras	21
B. Análisis de las muestras con CHROMagar mSuperCARBA	21
C. Evaluación de CHROMagar mSuperCARBA	21
VI. METODOLOGÍA.....	23
A. Diseño, enfoque y tipo de investigación	23
B. Población y muestra	23
C. Criterios de inclusión y exclusión	23
D. Variables	23
E. Hipótesis.....	23
F. Metodología.....	25
1. Extracción de ADN de muestras de heces humanas	25
2. Detección de genes codificantes de carbapenemasas por PCR de punto final.....	25
3. Detección del gen 16S rRNA por PCR de punto final como control interno de amplificación.....	25
4. Determinación de la sensibilidad, especificidad, VPP, y VPN.....	26
VII. RESULTADOS	28
A. Extracción de ADN.....	28
B. Detección de genes de carbapenemasas por PCR	28
C. Validación de los resultados de la detección de genes de carbapenemasas por PCR	29
D. Distribución y frecuencia de genes de carbapenemasas.....	30
E. Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de CHROMagar TM mSuperCARBA TM	31
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
A. Extracción de ADN.....	33
B. Detección de genes de carbapenemasas por PCR	34
C. Validación de los resultados de la detección de genes de carbapenemasas por PCR	35
D. Distribución y frecuencia de genes de carbapenemasas.....	36
E. Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de CHROMagar mSuperCARBA.....	39
IX. CONCLUSIONES	43
X. RECOMENDACIONES.....	44
XI. BIBLIOGRAFÍA	45

XII. ANEXOS..... 59

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de la estructura de los β -lactámicos.....	6
Figura 2. Estructura de los carbapenémicos.....	6
Figura 3. Clasificación de carbapenemasas.....	11
Figura 4. Distribución global de enterobacterias productoras de carbapenemasas.....	18
Figura 5. Detección de genes de carbapenemasas.....	29
Figura 6. Amplificación del gen 16S rRNA.....	30
Figura 7. Primer ejemplo de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas.....	82
Figura 8. Segundo ejemplo de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas.....	82
Figura 9. Primer ejemplo de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA.....	83
Figura 10. Segundo ejemplo de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA.....	83

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de variables.....	24
Cuadro 2. Cebadores para genes de carbapenemasas y 16S rRNA	26
Cuadro 3. Concentración y pureza del extracto de ADN de las muestras positivas y negativas.....	28
Cuadro 4. Resumen de resultados válidos.....	30
Cuadro 5. Genes de carbapenemasas detectados en muestras de heces.....	31
Cuadro 6. Clasificación de resultados en CHROMagar mSuperCARBA para la detección de carbapenemasas.....	31
Cuadro 7. Evaluación de CHROMagar mSuperCARBA para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas.....	32
Cuadro 8. Resultados de las muestras de heces positivas según CHROMagar CARBA.....	74
Cuadro 9. Resultados de las muestras de heces negativas según CHROMagar CARBA.....	78

LISTADO DE ABREVIATURAS

16S rRNA: ARN ribosomal 16S

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

bla: β -lactamasa

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

EPC: enterobacterias productoras de carbapenemasas

ERC: enterobacterias resistentes a carbapenémicos

ESBL: β -lactamasas de espectro extendido

IMP: Imipenemasa

KPC: Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*

MSPAS: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

NDM: Metallo- β -lactamasa de Nueva Delhi

OXA: β -lactamasa hidrolizantes de oxacilina

PBP: Proteínas de Unión a Penicilinas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

spp.: especies

VIM: Metallo- β -lactamasa de Verona codificada por integrón

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

RESUMEN

Las carbapenemasas son enzimas que proporcionan resistencia a los carbapenémicos, los antibióticos de más amplio espectro en la actualidad, utilizados frecuentemente para tratar infecciones por bacterias multirresistentes. La detección de carbapenemasas utilizando métodos accesibles es fundamental para combatir la diseminación de la resistencia a carbapenémicos en Guatemala. Por lo tanto, este estudio se realizó con el objetivo de determinar la sensibilidad, especificidad, VPN, y VPP de la metodología en agar cromogénico para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas utilizando el método de detección molecular por PCR como estándar de referencia. Con base en este objetivo, se determinó una sensibilidad de 97.7% y especificidad de 64.9%, además de un VPN de 45.3% y VPP de 99.0% para CHROMagar mSuperCARBA. Asimismo, se planteó el objetivo de estimar la distribución de los genes *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} en muestras de heces humanas recolectadas el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango, Guatemala. Se determinó que las muestras analizadas presentan genes de carbapenemasas con una frecuencia de 17.7% para *bla*_{NDM}, 3.6% para *bla*_{IMP}, 0.5% para las combinaciones *bla*_{NDM} + *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} + *bla*_{IMP}, y *bla*_{NDM} + *bla*_{OXA48-like} y 0% para *bla*_{KPC}. Además, se concluyó que la comparación de resultados entre el método de detección por PCR y el método en placa en CHROMagar mSuperCARBA identificó múltiples falsos positivos y un falso negativo, específicamente para la detección de bacterias con resistencia a carbapenémicos mediada por la producción de carbapenemasas. Con base en los resultados obtenidos, se recomienda implementar y fortalecer sistemas de vigilancia de resistencia a carbapenémicos y genes de carbapenemasas a nivel local y regional en Guatemala. Asimismo, se recomienda sugerir la implementación del uso de CHROMagar mSuperCARBA para la detección inicial de resistencia a carbapenémicos en muestras fecales en combinación con la detección de genes de carbapenemasas por PCR para obtener información de interés epidemiológico.

I. INTRODUCCIÓN

Las carbapenemasas son enzimas que proporcionan resistencia a tratamientos con carbapenémicos, los antibióticos de más amplio espectro y efectividad para eliminar infecciones por bacterias multirresistentes. La resistencia a carbapenémicos a causa de la producción de carbapenemasas implica una carga grave para los sistemas de salud a nivel mundial. El problema es aún mayor para países en vías de desarrollo en vista de que el acceso a antibióticos más efectivos es limitado. Además, los sistemas de salud suelen carecer de una buena estructura y financiamiento que dificulta el tratamiento de todo tipo de pacientes. La resistencia a antibióticos puede llegar a causar millones de muertes y pérdidas económicas a nivel global.

En Guatemala, el escaso monitoreo y detección de bacterias resistentes a carbapenémicos genera un vacío de conocimientos que dificulta el establecimiento de medidas de control y sistemas de vigilancia. Al no implementar las medidas adecuadas para contener la diseminación de resistencia a antibióticos, el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes puede dificultarse. La resistencia a carbapenémicos es una amenaza para el sistema de salud en Guatemala, especialmente en instituciones públicas en las que los recursos tienden a ser limitados.

Considerando la relevancia de las carbapenemasas, la evaluación de métodos para detectar bacterias resistentes a carbapenémicos de forma efectiva y con la menor cantidad de recursos posible es de suma importancia. Entre los métodos más accesibles se incluye a aquellos basados en medios de cultivo. Asimismo, el monitoreo de genes de carbapenemasas es fundamental para contribuir al conocimiento de las variantes presentes en una región, especialmente aquellas con mayor prevalencia en el mundo como NDM, OXA-48-like, KPC, VIM e IMP.

Con este trabajo se busca evaluar la metodología en placa en agar cromogénico CHROMagar mSuperCARBA para la detección de enzimas carbapenemasas utilizando el método de detección molecular por PCR como estándar de referencia. Esta evaluación es de suma importancia debido a que los métodos basados en medios de cultivo son útiles en situaciones con recursos limitados al requerir de menos gastos y menor entrenamiento para el personal de laboratorio. Asimismo, se busca generar información relevante sobre la distribución de los genes *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} en muestras hospitalarias de heces humanas recolectadas en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango, Guatemala. Para cumplir con estos objetivos se realizó la extracción de ADN de muestras fecales. El extracto de ADN se utilizó para la detección de genes de carbapenemasas por PCR. Los resultados se validaron mediante la detección del gen 16S rRNA como control interno de amplificación. Finalmente, se compararon los resultados de la detección molecular de carbapenemasas con los resultados obtenidos con CHROMagar mSuperCARBA, en una investigación previa, para calcular la sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de la metodología por sembrado en placa en agar cromogénico.

Se determinó que la metodología en placa en agar cromogénico presentó una sensibilidad de 97.7%, especificidad de 64.9%, valor predictivo positivo de 45.3% y valor predictivo negativo de 99.0% para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas en muestras fecales. Se determinó que, en las muestras analizadas, los genes de carbapenemasas se presentan con una frecuencia de 17.7% para bla_{NDM}, 3.6% para bla_{IMP}, 0.5% para las combinaciones bla_{NDM} + bla_{VIM}, bla_{NDM} + bla_{IMP}, y bla_{NDM} + bla_{OXA48-like} y 0% para bla_{KPC}.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la sensibilidad y especificidad de la metodología en placa en agar cromogénico para la detección de enzimas carbapenemasas utilizando el método de detección molecular por PCR como estándar de referencia.

B. Objetivos específicos

1. Evaluar la posibilidad de falsos positivos y falsos negativos de la metodología en placa en CHROMagar mSuperCARBA al comparar los resultados con el método de detección molecular por PCR como estándar de referencia.
2. Determinar el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la metodología en placa CHROMagar mSuperCARBA con base en la identificación de los verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos, y falsos negativos mediante la detección molecular por PCR como estándar de referencia.
3. Estimar la prevalencia y distribución de los genes *bla_{NDM}*, *bla_{OXA48-like}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}* en muestras de heces humanas recolectadas en Guatemala previamente determinadas por CHROMagar mSuperCARBA para evaluar la posible propagación de la resistencia a antibióticos mediada por carbapenemasas.

III. JUSTIFICACIÓN

El cultivo en agar selectivo para bacterias resistentes a carbapenémicos es de suma importancia para la detección fenotípica y estudio de estos microorganismos. Estos medios de cultivo permiten el aislamiento de colonias a partir de muestras clínicas facilitando la detección de organismos productores de carbapenemasas (Viau *et al* 2016). Sin embargo, la sensibilidad de estos medios de cultivo puede variar dependiendo del tipo de carbapenemasa y el fabricante del agar (Soria Segarra *et al*, 2018). Por lo tanto, es importante evaluar la sensibilidad y especificidad de la detección de bacterias resistentes a carbapenémicos por cultivo en agar cromogénico CHROMagar mSuperCARBA. Esta evaluación permitirá validar los resultados obtenidos por medio de esta metodología de forma en que sea útil para el monitoreo de carbapenemasas y la determinación de tratamientos a seguir.

La detección de bacterias resistentes a carbapenémicos por el método de cultivo en CHROMagar mSuperCARBA en Guatemala es importante por su bajo costo y fácil implementación. Este método es una alternativa para los métodos de detección molecular que requieren de más recursos y capacitación en el personal de salud (Tamma y Simner, 2018). Por lo tanto, la evaluación de esta metodología, utilizado como referencia la detección de genes de carbapenemasas por PCR, es fundamental para garantizar la fiabilidad de la detección fenotípica y orientar las intervenciones sanitarias adecuadas para afrontar la resistencia a los antibióticos utilizando el medio CHROMagar mSuperCARBA para la detección de bacterias resistentes a carbapenémicos en ambientes con baja disponibilidad de recursos.

Con esta investigación también se espera aumentar el conocimiento sobre la presencia de los genes *bla_{NDM}* y *bla_{OXA48}*-like en Guatemala desde el último reporte en los años 2017 y 2021 respectivamente (Velásquez Porta y Lau Bonilla, 2017; MSPAS, 2021). Asimismo, se espera determinar si los genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{KPC}* se han diseminado en Guatemala luego de que no fueron detectados en los últimos estudios que buscaron estos genes en los años 2018 para *bla_{VIM}* y *bla_{IMP}*, y 2017 para *bla_{KPC}* (Rosales Hidalgo y Velásquez Porta, 2018; Velásquez Porta y Lau Bonilla, 2017). Además, se espera determinar si las muestras presentan múltiples carbapenemasas debido a que las combinaciones de estas enzimas pueden reducir la disponibilidad de tratamientos efectivos y representan un riesgo importante para los sistemas de salud (Meletis *et al*, 2015). La importancia de la detección de estos genes de resistencia a antibióticos se basa en que su vigilancia permite orientar las medidas de control que deben tomar los organismos de salud en el país para evitar la diseminación de estos mecanismos de resistencia a carbapenémicos. Además, permite estimar la diseminación de la resistencia a carbapenémicos en el país.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Antibióticos

Los antibióticos fueron definidos por primera vez en 1942 por Selman Waksman como una sustancia química de origen microbiano que inhibe el crecimiento o la actividad metabólica de bacterias y otros microorganismos (Waksman, 1947). En la actualidad, esta definición se ha ampliado a sustancias químicas orgánicas que pueden ser de origen natural o sintético y generalmente se utiliza para referirse a compuestos que inhiben el crecimiento o causan la muerte de bacterias (Mohr, 2016). Los antibióticos son utilizados principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias. Estos compuestos también se utilizan como profilaxis para reducir el riesgo de infecciones bacterianas después de procedimientos como cirugías, trasplante de órganos y tratamientos contra el cáncer (Hutchings *et al*, 2019).

1. Mecanismos de acción de los antibióticos

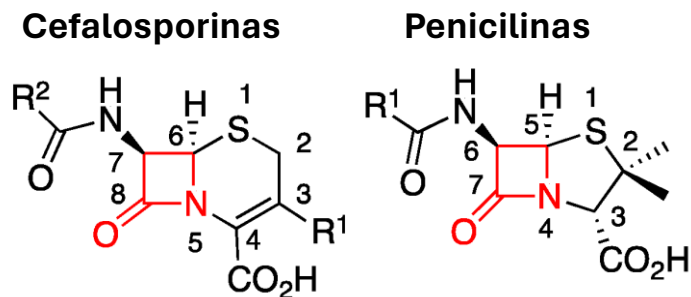
Los antibióticos se diferencian según el efecto que tienen sobre las bacterias *in vitro* y se pueden clasificar como bactericidas o bacteriostáticos (Calhoun *et al*, 2022). Los antibióticos bactericidas matan a las bacterias mientras que los bacteriostáticos inhiben el crecimiento bacteriano (Nemeth *et al*, 2014). Entre los antibióticos bacteriostáticos se incluyen las tetraciclinas, gliciliclinas, lincosamidas, macrólidos, oxazolidinonas, estreptograminas, sulfonamidas. En los antibióticos bactericidas se incluye a los aminoglucósidos, fluoroquinolonas, glicopéptidos, lipopéptidos cíclicos, nitroimidazoles y nitrofuranos, y β -lactámicos. Dentro de esta división general, los antibióticos pueden clasificarse en subdivisiones con base en su estructura química (Calhoun *et al*, 2022; Nemeth *et al*, 2014).

a. β -lactámicos

Los β -lactámicos son los antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas en vista de que presentan una actividad bactericida efectiva con baja toxicidad para la mayoría de los pacientes (Balsabore *et al*, 2019). Los β -lactámicos toman su nombre de su estructura química caracterizada por la presencia de un anillo β -lactámico, es decir, una amida cíclica altamente reactiva (Fernandes *et al*, 2013). El mecanismo de acción de estos antibióticos se basa en la formación de un enlace covalente con Proteínas de Unión a Penicilinas (PBP) dentro de las bacterias para inhibir su actividad. Estas proteínas están involucradas en la síntesis de peptidoglicano, el componente principal de la pared celular bacteriana y otras moléculas (Bush y Bradford, 2016). Por lo tanto, los β -lactámicos interrumpen la formación de la pared celular causando la muerte bacteriana.

En la Figura 1 se presenta como ejemplo la estructura general de 2 tipos de β -lactámicos siendo estas las cefalosporinas y penicilinas. En esta figura se incluye la numeración de los átomos que componen a estas moléculas. Asimismo, en color rojo, se resalta el anillo β -lactámico característico de estos antibióticos (Palacios *et al*, 2020).

Figura 1. Ejemplos de la estructura de los β -lactámicos



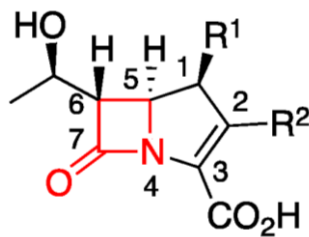
Fuente: Modificado de Palacios *et al* (2020)

1) Carbapenémicos

Los carbapenémicos son una subclase de antibióticos β -lactámicos caracterizados por un anillo β -lactámico con un grupo metileno en la posición 1 como se observa en la Figura 2. Esta estructura diferencia a los carbapenémicos del resto de antibióticos β -lactámicos que tienen un átomo de azufre en esta posición como se observa en la Figura 1 (Lima *et al*, 2020; Papp-Wallace *et al*, 2011). Esta diferencia en la estructura de los carbapenémicos contribuye a su eficacia contra infecciones bacterianas y a su resistencia contra la mayoría de las enzimas producidas por bacterias que pueden inactivar a otros antibióticos β -lactámicos (Elshamy y Aboshanab, 2020). En la Figura 2 se presenta la estructura general de los carbapenémicos. En esta figura se incluye la numeración de los átomos de estas moléculas. Asimismo, se resalta el anillo β -lactámico de color rojo (Palacios *et al*, 2020).

Al igual que el resto de β -lactámicos, el mecanismo de acción de los carbapenémicos se basa en su interacción con las PBP para inhibir la síntesis de la pared bacteriana (Codjoe y Donkor, 2017). La alta eficacia de los carbapenémicos es causada por su habilidad para unirse a múltiples PBP (Papp-Wallace *et al*, 2011). La afinidad por estas proteínas puede variar entre distintas especies y entre bacterias Gram positivo y Gram negativo. Específicamente en las bacterias Gram negativo, se debe considerar que la entrada de los carbapenémicos depende de las porinas en la membrana externa debido a que su permeabilidad es limitada (Armstrong *et al*, 2021).

Figura 2. Estructura de los carbapenémicos



Fuente: Modificado de Palacios *et al* (2020)

Los carbapenémicos son los antibióticos de más amplio espectro y son altamente efectivos contra bacterias Gram positivo y Gram negativo. Una ventaja de los carbapenémicos es que este efecto bactericida es independiente de la concentración en la que se administre facilitando el tratamiento de múltiples infecciones (Codjoe y Donkor, 2017). Debido a su alta efectividad y amplio espectro de actividad, los carbapenémicos frecuentemente son utilizados como el último recurso para tratar infecciones causadas por bacterias multiresistentes (Papp-Wallace *et al*, 2011) para evitar el desarrollo y diseminación de resistencia a estos antibióticos.

B. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos comprende a los mecanismos codificados genéticamente que proporcionan la capacidad de sobrevivir a la exposición a antibióticos (Yelin y Kishony, 2018). La resistencia a antibióticos se basa en mecanismos fisiológicos y bioquímicos que pueden impedir la entrada, acción, acumulación o unión al objetivo de los antibióticos en las bacterias (Yelin y Kishony, 2018; Aslam *et al*, 2018). Los mecanismos de resistencia pueden ser naturales intrínsecos de forma en que siempre se expresan. Asimismo, la resistencia puede ser natural inducida y expresarse únicamente ante la exposición a un antibiótico. La resistencia a antibióticos puede ser adquirida mediante transferencia horizontal de genes por todas las rutas en las que las bacterias pueden obtener material genético como transformación, transposición, y conjugación (Reygaert, 2018).

El aumento acelerado de la resistencia a antibióticos es considerado como una amenaza para el desarrollo y la salud global por la Organización Mundial de la Salud (2021). Se estima que si no se toman las medidas adecuadas para contrarrestar la resistencia a antibióticos el mundo podría regresar a condiciones similares a la época previa al descubrimiento de antibióticos. Sin antibióticos efectivos, el tratamiento de infecciones bacterianas se dificultaría y el riesgo de procedimiento importantes como trasplante de órganos, terapia contra el cáncer, y cirugías en general, aumentaría drásticamente por el riesgo de infecciones que estos conllevan (Aslam *et al*, 2018). Asimismo, se estima que, para el año 2050, la resistencia a antibióticos causará 10 millones de muertes anuales y habrá generado pérdidas de aproximadamente 1 billón de dólares a nivel global (O'Neill, 2014).

1. Causas de la diseminación de resistencia a carbapenémicos

El aumento a la resistencia a antibióticos, incluyendo a los carbapenémicos, es causada por la combinación de múltiples factores. Entre las causas de esta diseminación se debe considerar el uso excesivo de antibióticos en animales para producción de alimentos, mala calidad de antibióticos, y mal uso de antibióticos en el ámbito clínico (Chokshi *et al*, 2019). En países en vías de desarrollo también se debe considerar que la diseminación de resistencia a carbapenémicos es aumentada por factores que aumentan la transmisión de bacterias en general como la falta de acceso a agua limpia y saneamiento (Collignon *et al*,

2018). Todos estos factores generan una presión selectiva que favorece a las bacterias que producen carbapenemasas aumentando su incidencia alrededor del mundo (Oteo *et al*, 2014).

2. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos

a. Resistencia en bacterias Gram positivo

La resistencia a carbapenémicos en bacterias Gram positivo se debe principalmente a mutaciones en las PBP o producción de PBP resistentes (Papp-Wallace *et al*, 2011). Las mutaciones en PBP modifican al objetivo de los carbapenémicos de forma en que los antibióticos ya no pueden unirse y ejercer su actividad inhibitoria. Las mutaciones también pueden reducir la afinidad de la PBP por los carbapenémicos causando una disminución en la actividad y efectividad de los antibióticos (Aurilio *et al*, 2022). Este mecanismo de resistencia también se observa en bacterias Gram negativo (Papp-Wallace *et al*, 2011).

b. Resistencia en bacterias Gram negativo

Las bacterias Gram negativo presentan diversos mecanismos de resistencia a carbapenémicos además de aquella mediada por modificaciones en las PBP como se mencionó anteriormente. Uno de estos mecanismos es la resistencia mediada por porinas. Este mecanismo está asociado principalmente a microorganismos Gram negativo debido a que la entrada de los carbapenémicos en estas bacterias depende de las porinas (Armstrong *et al*, 2021). La mutación o pérdida de expresión de las porinas pueden reducir la permeabilidad de la membrana lo cual dificulta la entrada de los carbapenémicos (Aslam *et al*, 2020) y proporciona resistencia a estos antibióticos. Se considera que este es un mecanismo de resistencia intrínseco (Codjoe y Donkor, 2017).

Otro mecanismo de resistencia en bacterias Gram negativo es la sobreexpresión de bombas de eflujo. Las bombas de eflujo son proteínas de transporte de la membrana citoplasmática bacteriana que permiten la expulsión de compuestos dentro de las bacterias hacia el ambiente (Dashtbani-Roozbehani y Brown, 2021). Específicamente, las bombas de resistencia a múltiples fármacos están relacionadas a la resistencia a carbapenémicos. Estas bombas de eflujo reconocen y expulsan distintos compuestos a pesar de que sus estructuras no sean similares por lo que pueden actuar sobre una amplia variedad de antibióticos (Dashtbani-Roozbehani y Brown, 2021; Aurilio *et al*, 2022). La sobreexpresión de bombas de eflujo aumenta la efectividad para remover carbapenémicos del interior de las bacterias y reducen la susceptibilidad ante estos compuestos (Armstrong *et al*, 2021).

Dentro de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos se incluye la combinación de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) con cefalosporinas AmpC (Codjoe y Donkor, 2017). Las ESBL son enzimas con mutaciones que alteran su sitio activo permitiendo la hidrólisis de una amplia gama de β -lactámicos (Paterson y Bonomo, 2005). Las β -lactamasas AmpC son cefalosporinas inducibles que proporcionan resistencia a distintos β -lactámicos (Jacoby, 2009). A pesar de que los carbapenémicos no tienden a ser

afectados por ESBL y que las AmpC no pueden hidrolizar carbapenémicos, cuando se combinan ambos tipos de β -lactamasas se puede inducir la resistencia a estos antibióticos (Halat *et al*, 2016; Aslam *et al*, 2020).

Finalmente, el mecanismo de resistencia a carbapenémicos más estudiado es la producción de carbapenemasas. Adicionalmente, la evidencia sugiere que las carbapenemasas son el mecanismo de resistencia más común ante los carbapenémicos (Papp-Wallace *et al*, 2011; Alizadeh *et al*, 2020). Las carbapenemasas se describirán a detalle en la próxima sección.

C. Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas clasificadas dentro del grupo de las β -lactamasas. Las β -lactamasas son enzimas producidas por bacterias que pueden hidrolizar enlaces amida en el anillo β -lactámico causando la pérdida de la función de antibióticos β -lactámicos (Tooke *et al*, 2019). La hidrólisis de enlaces se lleva a cabo por distintos mecanismos incluyendo el uso de serinas de sitio activo y el uso de átomos de zinc para la activación de las enzimas (Bush y Bradford, 2020). A diferencia de otras β -lactamasas, las carbapenemasas reconocen a casi todos los β -lactámicos hidrolizables por lo que su actividad también proporciona resistencia a carbapenémicos (Queenan y Bush, 2007).

La resistencia mediada por carbapenemasas pudo originarse debido a la presencia de compuestos que comparten su estructura con carbapenémicos identificados en muestras de suelos. Por lo tanto, es posible que organismos ambientales desarrollaran la capacidad de degradar estos compuestos para favorecer su supervivencia a causa de esta presión selectiva (Queenan y Bush, 2007). Inicialmente, los genes de enzimas que hidrolizan carbapenémicos se habrían encontrado en el cromosoma de las bacterias y luego se habrían transferido a elementos móviles como integrones o plásmidos. Los elementos móviles aceleran la transmisión de genes que codifican carbapenemasas entre bacterias siendo esto de gran beneficio para estos microorganismos ante la exposición a antibióticos carbapenémicos en la actualidad (Jacoby y Bush, 2005).

Las carbapenemasas se encuentran principalmente en bacterias Gram negativo, específicamente en enterobacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. y otras bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacter baumannii* (Khan *et al*, 2017). Estas enzimas de resistencia antibióticos se han diseminado por todo el mundo en los últimos años. La importancia de las carbapenemasas se debe a que estas enzimas presentan la mayor versatilidad de hidrólisis entre todas las β -lactamasas siendo capaces de hidrolizar a los carbapenémicos, además de otros antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, y monobactámicos (Queenan y Bush, 2007).

1. Clasificación de carbapenemasas

a. Clasificación de Ambler

Existen distintos métodos de clasificación de β -lactamasas que pueden basarse en su estructura o función. Una de las formas más simple para clasificar a las β -lactamasas es la Clasificación de Ambler establecida por primera vez en 1980. Esta clasificación se basa en los motivos de aminoácidos que conforman las estructuras de estas enzimas y las divide en las clases A (penicilinasas), B (metalo lactamasas), C (cefalosporinasas) y D (oxacilinasas) (Sawa *et al*, 2020; Bush y Bradford). En general, las β -lactamasas de las clases A, C y D utilizan al aminoácido serina como sitio activo mientras que aquellas de la clase B utilizan zinc metálico para esta función (Sawa *et al*, 2020). Específicamente, las carbapenemasas se clasifican dentro de las clases A, B y D con base en su estructura primaria.

b. Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros

Las β -lactamasas también se pueden clasificar en el esquema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros según sus propiedades hidrolíticas e inhibitorias (Bush y Jacoby, 2010). En esta clasificación las β -lactamasas se dividen en los grupos 1, 2 y 3. El grupo 1 incluye a las cefalosporinasas de la clase Ambler C. El grupo 2 incluye a todas las serina β -lactamasas distintas a las cefalosporinasas. En este grupo se incluye a β -lactamasas de las clases Ambler A y D. El grupo 3 incluye a las metalo lactamasas de la clase Ambler B (Sawa *et al*, 2020). Cada uno de estos grupos se divide en subgrupos según los sustratos que pueden hidrolizar, la tasa de hidrólisis relativa y la respuesta a agentes modificadores de proteínas que funcionan como inhibidores (Bush, 2018). Las carbapenemasas son clasificadas en distintos subgrupos de los grupos 2 y 3.

2. Transmisión de las carbapenemasas

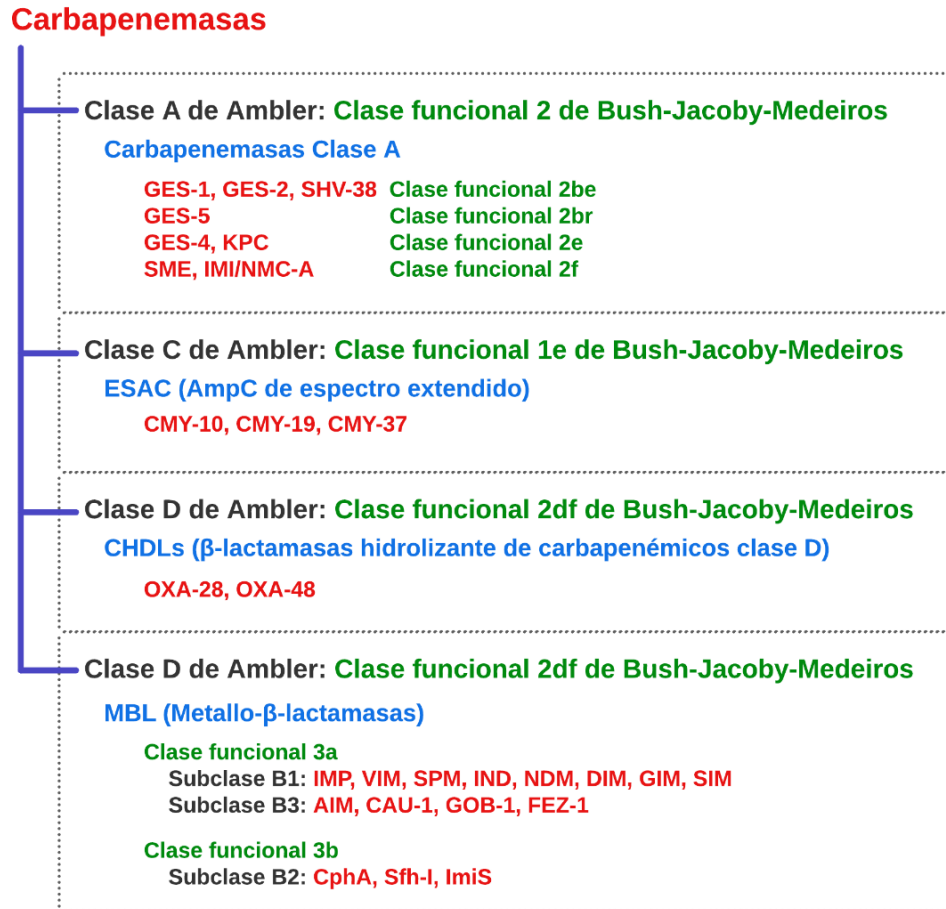
La transmisión de carbapenemasas entre bacterias ocurre principalmente por medio de elementos genéticos móviles que codifican estas enzimas (Abou-assy *et al*, 2023). Entre estos elementos se incluye a integrones, plásmidos, secuencias de inserción y transposones (Kopotsa *et al*, 2019). Estos elementos genéticos pueden transferirse por distintos procesos que permiten la movilización de estos elementos entre bacterias como transformación, transducción y conjugación o incluso pueden ser tomados del ambiente (Opal y Pop-Vicas, 2015). Los plásmidos son de mayor importancia para la transmisión de carbapenemasas en vista de que pueden contener múltiples genes de resistencia para distintos antibióticos que se transmiten en conjunto (Kopotsa *et al*, 2019).

3. Carbapenemasas con mayor importancia para la salud pública

Se ha detectado múltiples clases de carbapenemasas en enterobacterias y bacterias Gram negativo no fermentadoras alrededor del mundo. Sin embargo, las carbapenemasas más comunes en estas bacterias son las New Delhi metalo- β -lactamasa (NDM), β -lactamasas hidrolizantes de oxacilina 48 (OXA-48-like),

carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), Metallo- β -lactamasa de Verona codificada por integrón (VIM), e Imipenemasa (IMP) (Matsumura *et al*, 2017a). Por lo tanto, estas carbapenemasas presentan la mayor importancia e impacto en la salud pública alrededor del mundo. En la Figura 3 se presenta un esquema de la clasificación de estas carbapenemasas en conjunto con otros ejemplos de β -lactamasas.

Figura 3. Clasificación de carbapenemasas



Fuente: Modificado de Sawa, Kooguchi, y Moriyama (2020)

a. Metallo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM)

La metallo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM) son enzimas que pertenecen a la clase B de Ambler y al grupo 3a de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush, 2018). Las NDM son codificadas por el gen *bla*_{NDM} ubicado en plásmidos que contiene la secuencia para 296 aminoácidos y permite la hidrólisis de β -lactámicos incluyendo a carbapenémicos, penicilinas, y cefalosporinas (Charan *et al*, 2012). Estas enzimas pueden ser inhibidas por el quelante de iones metálicos EDTA (Bush, 2018).

La metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM) fue identificada por primera vez en Nueva Delhi, India en 2008 en un cultivo de *Klebsiella pneumoniae* de un paciente hospitalizado (Linciano *et al*, 2018). Desde el año en que se reportó por primera vez, estas carbapenemasas se han diseminado e identificado en todo el mundo, principalmente en India y el Sudeste Asiático. Adicionalmente se han identificado múltiples variantes desde NDM-1 hasta NDM-14 con mutaciones que pueden afectar al sitio activo de esta enzima y modificar su capacidad de hidrólisis, siendo NDM-1 la más común (Zmarlicka *et al*, 2015).

b. β -lactamasa hidrolizante de oxacilina 48 y sus variantes (OXA-48-like)

La oxacilinasas 48 y sus variantes son conocidas como OXA-48-like y presentan leve relación genética a otras oxacilinasas de la clase D de Ambler. Estas enzimas también se clasifican en el grupo 2df de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush, 2018). Las OXA-48-like están formadas por 261-265 aminoácidos codificados por los genes *bla*_{OXA48}-like ubicado en plásmidos (Pitout *et al*, 2019). Las diferencias entre estas enzimas varían entre sustituciones o deleciones de 1 a 5 aminoácidos (Boyd *et al*, 2022). Las enzimas OXA-48-like hidrolizan penicilinas con alta eficiencia mientras que la resistencia a carbapenémicos se observa principalmente en combinación con modificaciones en la permeabilidad de las bacterias debido a su baja capacidad para hidrolizar carbapenémicos (Poirel *et al*, 2012). Estas enzimas pueden ser inhibidas por avibactam (Bush, 2018).

OXA-48-like fue reportada por primera vez en Estambul, Turquía en 2001 y desde esta identificación se han reportado distintas variantes (Pitout *et al*, 2019). Se ha determinado que las enzimas OXA-48-like son endémicas en Turquía, Medio Oriente y África del Norte. Además, se ha observado que generan brotes nosocomiales al introducirse en regiones no endémicas de forma regular (Boyd *et al*, 2022). Entre los miembros más prevalentes de las enzimas OXA-48-like se incluye a OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162, entre otras (Boyd *et al*, 2022).

c. Carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC)

Las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) son carbapenemasas de clase A de Ambler y al grupo 2f codificadas por el gen *bla*_{KPC} ubicado en plásmidos (del Carmen y Aranaga, 2015). Las enzimas KPC presentan la capacidad para hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Sacha *et al*, 2009). Por otra parte, estas enzimas pueden ser inhibidas fuertemente por el ácido borónico y diazabicyclooctanos (Karaiskos *et al*, 2021).

Respecto a su distribución, las KPC presentan una alta prevalencia en Estados Unidos, Europa, China, y algunos países del Medio Oriente y América del Sur (Karaiskos *et al*, 2021). Además, las KPC se han detectado principalmente en *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, recientemente también se han detectado en otras enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores al igual que el resto de carbapenemasas (del Carmen y Aranaga, 2015).

d. Metalo- β -lactamasas de Verona codificadas por integrón (VIM)

Las metalo- β -lactamasas de Verona codificadas por integrón (VIM) son carbapenemasas de la Clase B de Ambler y el grupo 2df de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush, 2018). Las VIM se encuentran codificadas por el gen *bla*_{VIM} en integrones de clase 1 (Kohler *et al*, 2020). Los integrones son elementos genéticos contenidos que contienen casetes de genes que pueden ser movilizados a otros integrones o al genoma bacteriano y están contenidos en plásmidos o transposones. En específico, los integrones de clase 1 son aquellos que contienen genes de resistencia a antibióticos (Gillings *et al*, 2008). Las VIM presentan la capacidad para hidrolizar carbapenémicos, penicilinas, y cefalosporinas y pueden ser inhibidas por el quelante de iones metálicos EDTA (Bush, 2018).

La VIM-1 fue identificada por primera vez en 1997 en Italia. Desde esta detección inicial, se han generado distintas variantes que se han diseminado por el mundo (Matsumura *et al*, 2017a). Las VIM se han detectado principalmente en Europa, pero también se ha reportado su presencia en algunos países de Asia y África (Karaiskos *et al*, 2021). Su amplia diseminación se debe en gran parte a su ubicación en integrones que facilitan su transferencia entre distintas bacterias. Las VIM se han detectado principalmente en *P. aeruginosa* y se han detectado en menor proporción en enterobacterias como *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter* sp. (Kohler *et al*, 2020).

e. Imipenemasa (IMP)

Las imipenemasas (IMP) son carbapenemasas de la Clase B de Ambler y el grupo 2df de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush, 2018). Las IMP son codificadas por el gen *bla*_{IMP} que es transferido entre bacterias por medio de integrones de clase 1 o clase 3 (Pongchaikul y Mongkolsuk, 2022). Al igual que las VIM y NDM, las IMP también presentan la capacidad para hidrolizar penicilinas, y cefalosporinas y pueden ser inhibidas por el quelante de iones metálicos EDTA (Bush, 2018), siendo lo más importante su capacidad de hidrólisis de carbapenémicos, especialmente al Imipenem y Meropenem (Pongchaikul y Mongkolsuk, 2022).

La IMP-1 fue identificada por primera vez en Japón en 1991. Estas enzimas se han diseminado por el mundo debido a que se encuentran en integrones que facilitan su movilidad y transmisión entre bacterias de distintas especies (Matsumura *et al*, 2017b). Asimismo, se han generado múltiples variantes de imipenemasas, siendo IMP-1 la más común. Las IMP identificadas en enterobacterias son prevalentes en el Pacífico Sur y especialmente en Asia (Karaiskos *et al*, 2021).

D. Métodos de detección de carbapenemasas

La detección de carbapenemasas se puede llevar a cabo por medio de pruebas moleculares o no moleculares. Las pruebas moleculares se enfocan en la detección de los genes que codifican a las carbapenemasas (Beig *et al*, 2021). Por otra parte, las pruebas no moleculares se enfocan en características fenotípicas de aislamientos de bacterias como la susceptibilidad a antibióticos, capacidad de hidrólisis de

carbapenémicos y producción de enzimas (Tamma y Simner, 2018). Generalmente, la detección de carbapenemasas inicia con una detección preliminar mediante la evaluación de la susceptibilidad ante distintos carbapenémicos, seguida de pruebas de detección fenotípica, y por último se confirman los resultados mediante métodos moleculares (Hussaini *et al*, 2023).

1. Métodos no moleculares

Los principales métodos no moleculares para la detección de carbapenemasas se basan en la detección de las resistencias a carbapenémicos mediante el crecimiento de bacterias en distintos medios de cultivo. Uno de estos métodos es la evaluación de la susceptibilidad a carbapenémicos. En estas pruebas se evalúa la capacidad de un aislamiento bacteriano para crecer en presencia de un carbapenémico (Tamma y Simner, 2018). Las pruebas de susceptibilidad son útiles para la selección de una terapia adecuada y la determinación de la efectividad de nuevos antibióticos (Lutgring y Limbago, 2016).

Otros métodos se basan en el uso de medios selectivos. Estos medios inhiben el crecimiento de bacterias no resistentes a los carbapenémicos (Osei *et al*, 2015). Además, se pueden utilizar medios que contienen cromógenos para facilitar la identificación de bacterias específicas que presentan resistencia a carbapenémicos. Estos cromógenos son compuestos que generan distintos colores en las colonias bacterianas al ser degradados y con base en su color permiten identificar el género o especie que crecieron en el medio (Osei *et al*, 2015). Entre los medios cromogénicos se incluyen a CHROMagar KPC, Brilliance CRE, chromID CARBA, chromID OX-48, chromID CARBA SMART, y CHROMagar mSuperCARBA (García-Quintanilla *et al*, 2018), entre otros.

Además de la detección en medios de cultivo, existen otros métodos de detección no molecular como los inmunoensayos de flujo lateral. En estas pruebas se utilizan anticuerpos específicos para carbapenemasas que interactúan y permitan la detección de estas enzimas directamente (Tamma y Simner, 2018). Estas pruebas presentan una alta sensibilidad y especificidad, pero no pueden utilizarse para detectar distintas carbapenemasas simultáneamente (Boutal *et al*, 2018). Otras pruebas se enfocan en la detección de la capacidad de hidrólisis de colonias bacterianas y se basan en detectar los productos de la degradación de carbapenémicos (Tamma y Simner, 2018) que se generan por la actividad de las carbapenemasas. La detección de estos productos se puede realizar por medio de pruebas colorimétricas (Nordmann *et al*, 2012) o por medio de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (Hrabák *et al*, 2011).

a. CHROMagar mSuperCARBA

El medio de cultivo CHROMagar mSuperCARBA es un medio cromogénico utilizado para la detección cualitativa de Enterobacterias Resistentes a Carbapenémicos (ERC) en muestras de heces e hisopados rectales (CHROMagar, 2022). Se ha reportado que este medio cromogénico es eficiente para detectar enterobacterias

productoras de KPC, NDM, VIM, IMP y OXA (Garcia-Quintanilla *et al*, 2018; CHROMagar, 2022). CHROMagar mSuperCARBA inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivo y bacterias no resistentes a los carbapenémicos. Este medio también permite diferenciar microorganismos específicos como *E. coli*, coliformes, y *Pseudomonas* sp., entre otros, según la apariencia de las colonias (CHROMagar, 2022).

2. Métodos moleculares

Los métodos de detección moleculares se basan en la detección de la información genética que codifica a las carbapenemasas. Usualmente los métodos moleculares son utilizados como confirmación de los resultados fenotípicos obtenidos con otras pruebas (Hussaini *et al*, 2023). Entre los métodos moleculares se encuentra la secuenciación de genoma completo, chips de ADN, y PCR (Probst *et al*, 2021; Hammoudi *et al*, 2014; Zhou *et al*, 2018). Algunos métodos como PCR se enfocan en la detección de genes objetivo de secuencias conocidas. Otros métodos como la secuenciación de genoma completo proporcionan más información sobre la relación genética, resistoma, y pueden ser utilizados para identificar nuevos genes de resistencia (Probst *et al*, 2021).

Los métodos de detección molecular son útiles para la vigilancia epidemiológica de la resistencia a carbapenémicos en vista de que proporcionan datos de alta resolución (Probst *et al*, 2021) e indican el mecanismo de resistencia específico. Se considera que los métodos moleculares son el estándar de referencia para la detección de carbapenemasas. Sin embargo, su uso en escenarios clínicos es limitado debido a su alto costo y requerimiento de personal capacitado (Zhou *et al*, 2018). Además, se debe considerar que algunos de estos métodos están limitados a detectar secuencias específicas conocidas (Probst *et al*, 2021) por lo que no pueden detectar genes desconocidos o emergentes (Zhou *et al*, 2018).

a. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la síntesis de múltiples copias de secuencias de interés para permitir su detección (Hammoudi *et al*, 2014). En este proceso se utilizan cebadores, es decir cadenas cortas de nucleótidos que identifican y se unen a la secuencia de interés. Luego, los cebadores son utilizados como punto de inicio para sintetizar nuevas cadenas de ADN según la secuencia de interés. El proceso de síntesis se repite múltiples veces de forma cíclica aumentando exponencialmente la cantidad de ADN (Jalali *et al*, 2017). Estas pruebas presentan una alta sensibilidad y especificidad por lo que generalmente se utilizan como método de referencia (Hammoudi *et al*, 2014).

La detección de genes de carbapenemasas puede realizarse por medio de PCR de punto final para obtener datos cualitativos. Este método permite la detección de la presencia o ausencia de uno o varios genes de carbapenemasas (Gazin *et al*, 2012). Después de la PCR el producto de amplificación se visualiza por medio de electroforesis en gel, un procedimiento que separa los fragmentos de ADN según su tamaño para determinar el gen específico amplificado (Jalali *et al*, 2017).

La detección de genes de carbapenemasas también puede realizarse mediante PCR en tiempo real para obtener resultados cuantitativos (Gazin *et al*, 2012). En este tipo de PCR se detectan y cuantifican los genes de interés mientras ocurre la reacción en tiempo real. En este método se utilizan colorantes fluorescentes que se unen al ADN generando una fluorescencia con intensidad proporcional a la concentración del producto amplificado (Jalali *et al*, 2017).

1) Control interno de amplificación

La amplificación por PCR puede generar falsos negativos en los que la ausencia de detección del gen de interés se debe a inhibidores de la reacción, fallas en los reactivos o fallas en el programa de PCR (Lee *et al*, 2009). Para descartar la posibilidad de que un resultado negativo sea falso se pueden incluir controles internos de amplificación. Los controles internos son secuencias que deben amplificar en todas las muestras analizadas para comprobar que las condiciones de amplificación fueron apropiadas (Sachadyn y Kur, 1998). En caso de que exista algún tipo de inhibición no se observará amplificación del control interno (Moldovan y Moldovan, 2020) y permitirá identificar el resultado como falso negativo.

Un control interno de amplificación puede ser exógeno o endógeno. Los controles exógenos se agregan directamente a las muestras previo a la amplificación por PCR mientras que los endógenos son secuencias que naturalmente se encuentran en las muestras (Lee *et al*, 2009). Generalmente los controles internos endógenos son genes constitutivos que se expresan en todas las células de un mismo organismo. La expresión de estos genes es constante debido a que cumplen funciones basales en todas las células (Moldovan y Moldovan, 2020; Lee *et al*, 2009).

3. Comparación de los métodos de detección

Los métodos moleculares son considerados como el estándar de referencia para la detección de carbapenemasas debido a su alta sensibilidad y especificidad siendo esta la principal ventaja ante otros métodos (Beig *et al*, 2021). Como desventajas de los métodos moleculares se incluye que los costos para su aplicación son más elevados y se requiere de más equipo y entrenamiento en los técnicos de laboratorio para realizarlas exitosamente (Amladi *et al*, 2019). Tomando esto en cuenta, la ventaja de utilizar métodos no moleculares es su fácil implementación, especialmente en lugares con recursos y entrenamiento del personal limitado. Por lo tanto, la validación de estos métodos no moleculares es de suma importancia para asegurar que los resultados son confiables.

a. Evaluación de métodos de detección de carbapenemasas

La evaluación de métodos de detección de carbapenemasas se puede realizar con base en la comparación de resultados con un método estándar de referencia. El método de referencia presenta resultados conocidos

y altamente confiables (Cardoso *et al*, 2014). La sensibilidad y la especificidad son dos factores relevantes para evaluar la capacidad de detectar correctamente a los casos positivos y negativos y son indicadores de la precisión de una prueba (Shreffler y Huecker, 2023). La sensibilidad y especificidad están inversamente relacionadas por lo que al aumentar uno de estos factores el otro tiende a disminuir. Por lo tanto, es importante considerar ambos factores al evaluar métodos de detección (Shreffler y Huecker, 2023). Los métodos de detección de carbapenemasas también se pueden evaluar según el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo. Estos valores predictivos describen la probabilidad de que el diagnóstico sea correcto cuando se obtienen los resultados para un sujeto o muestra (Safari *et al*, 2015).

1). Sensibilidad

La sensibilidad de una prueba determina la capacidad para detectar correctamente los casos que presentan la condición evaluada como positivos (Trevethan, 2017). Una prueba con alta sensibilidad incluye en sus resultados positivos a una alta proporción de verdaderos positivos y pocos falsos negativos (Shreffler y Huecker, 2023). Los verdaderos positivos son aquellas muestras que presentan una condición y son detectadas como positivas mientras que los falsos negativos son aquellas muestras que presentan la condición y son detectadas erróneamente como negativas (Swift *et al*, 2019).

2). Especificidad

La especificidad determina la capacidad que tiene una prueba para detectar los casos que no presentan una condición a evaluar como negativos (Trevethan, 2017). Los resultados de una prueba altamente específica incluyen una alta proporción de verdaderos negativos y presenta una baja proporción de falsos positivos (Shreffler y Huecker, 2023). Los verdaderos negativos son aquellas muestras que no presentan la condición evaluada y presentan resultados negativos. Los falsos positivos son las muestras que no presentan la condición y son detectadas erróneamente como positivas (Swift *et al*, 2019).

3). Valor predictivo negativo

El valor predictivo negativo determina la probabilidad de que una muestra sea realmente negativa cuando el método de detección proporciona un resultado negativo (Monaghan *et al*, 2021). Este valor es una proporción entre las muestras identificadas correctamente como negativas y el conjunto de todas las muestras negativas incluyendo aquellas que se identificaron incorrectamente, es decir falsos negativos y verdaderos negativos (Safari *et al*, 2015; Monaghan *et al*, 2021).

4). Valor predictivo positivo

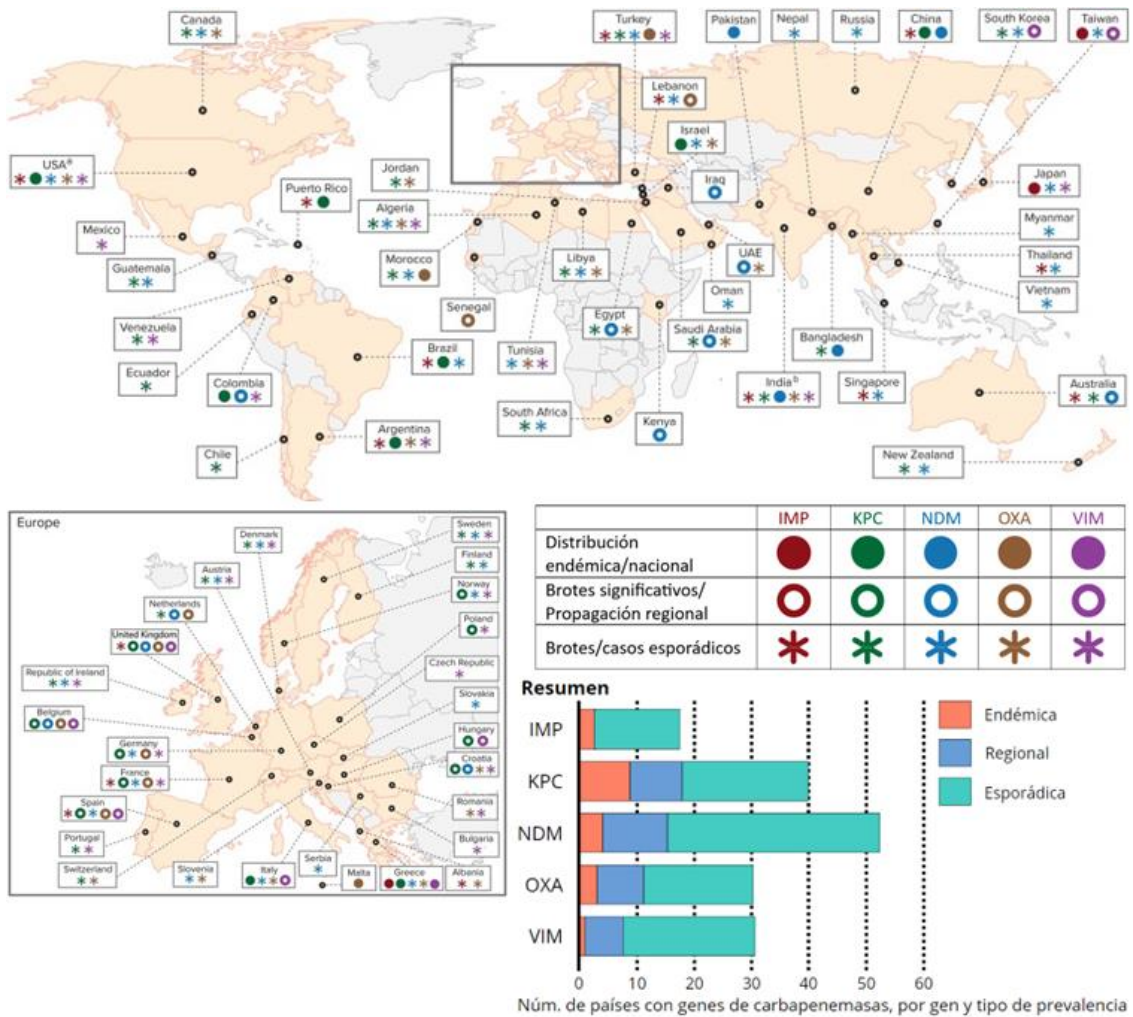
El valor predictivo positivo determina la probabilidad de que una muestra sea realmente positiva en caso de que el método de detección proporcione un resultado positivo (Monaghan *et al*, 2021). Este valor es una proporción entre las muestras identificadas correctamente como positivas y el conjunto de todas las muestras

positivas incluyendo aquellas que se identificaron incorrectamente, es decir falsos positivos y verdaderos positivos (Safari *et al*, 2015; Monaghan *et al*, 2021).

E. Incidencia de infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas

Las carbapenemasas individuales se originaron y detectaron en ubicaciones específicas en distintos años. Sin embargo, en la actualidad estas enzimas se han distribuido por todo el mundo lo cual se debe principalmente a la transferencia de genes de carbapenemasas contenidos en plásmidos (Hussein *et al*, 2022). La distribución de bacterias productoras de carbapenemasas puede variar de un país o región a otra como se mencionó en las secciones anteriores que describen la prevalencia de las carbapenemasas NDM, OXA-48-like, KPC, VIM e IMP. Estas variaciones son dependientes de múltiples factores como el uso de antibióticos, régimen de dosificación y políticas internas de los hospitales para el tratamiento y aislamiento de pacientes con infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Queenan y Bush, 2007).

Figura 4. Distribución global de enterobacterias productoras de carbapenemasas



Fuente: Modificado de Logan y Weinstein (2017)

En la Figura 4 se presenta la distribución global de enterobacterias productoras de las principales carbapenemasas según Logan y Weinstein (2017). La figura presenta las cinco carbapenemasas más prevalentes en el mundo y se especifica si estas son endémicas, brotes significativos o brotes esporádicos (Logan y Weinstein, 2017). En específico, se observa que en Guatemala se han reportado brotes esporádicos de enterobacterias productoras de KPC y NDM y no se han reportado brotes significativos o diseminación regional ni una distribución endémica.

1. Infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas en Guatemala

En 2010 se detectó el primer aislamiento de bacterias productoras de carbapenemasas en Guatemala. Desde ese año se ha observado un aumento en la detección de estas bacterias en el país, especialmente después de la pandemia de COVID-19 posiblemente por el uso de antibióticos para el tratamiento de cuadros severos de esta enfermedad (MSPAS, 2022). Las bacterias productoras de una o más carbapenemasas se han detectado en múltiples hospitales de la red nacional siendo NDM y KPC las más prevalentes (MSPAS, 2022, Guerra Carías *et al*, 2020). Además, se ha detectado la producción de OXA48-like, IMP y VIM en menor proporción (MSPAS, 2022). De la misma forma, se han detectado casos particulares con combinaciones de NDM + KPC, KPC + VIM, y NDM + KPC + VIM (MSPAS, 2022; MSPAS, 2023).

En Guatemala no se ha fortalecido el sistema de vigilancia a nivel nacional o regional para las infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas. En general, las infecciones se detectan a nivel local en cada hospital para determinar el tratamiento que se debe administrar a cada paciente. Se han detectado principalmente bacterias productoras de metalo β -lactamasas, específicamente NDM y KPC, en enterobacterias como *Klebsiella sp.* y *E. coli* (Garrido, 2014; Velásquez Porta y Lau Bonilla, 2017). Los datos reportados provienen de aislamientos obtenidos de muestras clínicas como sangre y orina en distintas unidades de hospitales públicos, principalmente en el Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala (Guerra Carías *et al*, 2020).

Sobre el protocolo utilizado para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas, se conoce que, en el Hospital General San Juan de Dios de la Ciudad de Guatemala, la detección se realiza en el área de bacteriología del hospital mediante perfiles de resistencia a carbapenémicos. Luego, en caso de que sea necesario, se refiere al Laboratorio Nacional de Salud para confirmación por pruebas fenotípicas (Guerra Carías *et al*, 2020). Es posible que se utilice el mismo protocolo en otros hospitales del sistema público de salud.

a. Detección de genes de carbapenemasas en Guatemala

La detección de genes de carbapenemasas en Guatemala es escasa. En el país no se realiza un monitoreo constante de la presencia de estos genes en muestras clínicas ni en muestras ambientales. Por lo tanto, se desconoce la distribución y frecuencia de los genes de carbapenemasas en todo el país.

Se han realizado pocos estudios para la detección de genes de carbapenemasas. En 2013 se reportó la detección de carbapenemasas NDM-1 y KPC-2 en enterobacterias obtenidas de cultivo en el Laboratorio Nacional de Salud por medios fenotípicos. Los resultados se confirmaron por PCR y se detectaron los genes *bla*_{NDM-1} en el 19% (22/118) de las muestras y *bla*_{KPC-2} en 16% (19/118 muestras) (Chinchilla *et al*, 2013). En 2017 se reportó la presencia del gen *bla*_{NDM} en 90.7% (49/54) aislamientos de *K. pneumoniae* en el Hospital General San Juan de Dios de la Ciudad de Guatemala. En este mismo estudio se buscó detectar la presencia del gen *bla*_{KPC}, sin embargo, se obtuvo un resultado negativo (Velásquez Porta y Lau Bonilla, 2017). En 2021 el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2021) reportó la detección del gen *bla*_{OXA48-like} en 4 aislamientos de *K. pneumoniae* y 1 de *E. coli* de distintos hospitales nacionales. En 2018, se publicó un estudio que buscó detectar los genes *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} en el que se obtuvo un resultado negativo para ambos genes (Rosales Hidalgo y Velásquez Porta, 2018).

2. Implicaciones clínicas y de salud pública de bacterias resistentes a carbapenémicos

La incidencia de infecciones por bacterias resistentes a antibióticos de amplio espectro es cada vez mayor alrededor del mundo. Por lo tanto, muchas veces la administración de carbapenémicos se convierte en la única opción de tratamiento para estas infecciones de alto riesgo (de Man *et al*, 2021). Las carbapenemasas son una amenaza importante contra el tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes en vista de que proporcionan resistencia ante los carbapenémicos. Al afectar la actividad de estos compuestos que son los antibióticos de más amplio espectro, las carbapenemasas limitan los tratamientos efectivos disponibles (Walther-Rasmussen y Høiby, 2007).

Las infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas tienen un alto costo humano. Para el 2016, la resistencia a antimicrobianos, incluyendo la producción de carbapenemasas, causaba 700,000 muertes al año y se estimó que esta cantidad puede aumentar hasta 10 millones para el año 2050 (O'Neill, 2016). Además, las infecciones por estas bacterias multirresistentes tienden a presentar alta morbilidad afectando la efectividad y eficiencia de los sistemas de salud (Pongchaikul y Mongkolsuk, 2022; Serra-Burriel *et al*, 2020).

Estas infecciones también generan grandes costos económicos al aumentar el tiempo de estadía en hospitales y el uso de insumos y medicamentos para el tratamiento de pacientes (Serra-Burriel *et al*, 2020). El impacto económico es mayor en países en vías de desarrollo como Guatemala en vista de que el acceso a antibióticos más efectivos e insumos es limitado. Además, los sistemas de salud tienden a tener estructura y financiamiento deficientes que dificultan el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas (Laxminarayan, y Heymann, 2012).

V. ANTECEDENTES

A. Origen de las muestras

Las muestras de heces se recolectaron previamente en un estudio realizado por Ramay *et al* (2023) enfocado en el análisis de la colonización con bacterias resistentes a antibióticos en un hospital y las comunidades asociadas a este. La recolección de las muestras se realizó en el departamento de Quetzaltenango, en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios entre marzo y septiembre de 2021 durante la pandemia de COVID-19 en Quetzaltenango, Guatemala. Se seleccionaron al azar individuos de todas las edades de distintas salas del hospital. Las muestras se recolectaron dentro de las 24 horas siguientes al inicio de la hospitalización (Ramay *et al*, 2023).

B. Análisis de las muestras con CHROMagar mSuperCARBA

Las muestras de heces humanas se sembraron en CHROMagar mSuperCARBA. Este es un tipo de agar cromogénico selectivo y diferencial para detectar la colonización gastrointestinal con ERC a partir de frotis rectales o heces (CHROMagar, 2022). Es decir, en este medio solamente crecen bacterias que presenten mecanismos de resistencia a carbapenémicos, siendo el principal mecanismo la producción de carbapenemasas. CHROMagar mSuperCARBA también inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivo. Este medio permite diferenciar distintos microorganismos como *E. coli*, coliformes, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., y otros organismos Gram negativo según el color de las colonias que presentan crecimiento (CHROMagar, 2022).

En las limitaciones del medio CHROMagar mSuperCARBA se debe considerar que algunas cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos o que presentan una permeabilidad de membrana disminuida también pueden crecer en este medio (CHROMagar, 2022) a pesar de que los mecanismos de resistencia no sean mediados por la producción de carbapenemasas. Asimismo, algunas cepas con bajo nivel de resistencia a carbapenémicos pueden presentar crecimiento irregular o escaso (CHROMagar, 2022) a pesar de que cuenten con los mecanismos de resistencia. Finalmente, se debe considerar que la ausencia de crecimiento en CHROMagar mSuperCARBA no excluye la presencia de ERC en las muestras (CHROMagar, 2022) por lo que existe la posibilidad de obtener falsos negativos.

C. Evaluación de CHROMagar mSuperCARBA

Para CHROMagar mSuperCARBA, el fabricante reporta una sensibilidad de 100% y especificidad de 71% para datos analíticos según los resultados de Dos Santos *et al* (2017). Asimismo, el fabricante reporta una sensibilidad de 100% y especificidad de 100% para datos clínicos de un estudio realizado por García-Fernández *et al* (2017).

En un estudio realizado por Soria Segarra *et al* (2018) se evaluó el desempeño de CHROMagar mSuperCARBA en comparación con el protocolo de Landman para la detección de colonización intestinal de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas recomendado por CDC en muestras de hisopados perineales en pacientes adultos de unidades de cuidados intensivos en Guayaquil, Ecuador. En este estudio se utilizó la detección por PCR múltiple de los genes más prevalentes de carbapenemasas (*bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA48}, y *bla*_{NDM}) como método de confirmación de falsos negativos. Los falsos negativos se identificaron como aquellas muestras que presentaban un resultado negativo en alguno de los métodos mientras el otro detectaba *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas y su presencia se confirmaba por PCR (Soria Segarra *et al*, 2018). Se reportó una sensibilidad de 93.05%, especificidad de 96.21%, VPP de 92.4%, y VPN de 96.5% para la detección de EPC en entornos hospitalarios (Soria Segarra *et al*, 2018).

García-Quintanilla *et al* (2018) realizaron un estudio en el que se comparó el desempeño de CHROMagar mSuperCARBA con SUPERCARBA, otro medio selectivo para enterobacterias productoras de carbapenemasas que no incluye cromógenos. En este estudio se utilizaron cepas clínicas de *Enterobacteriaceae* previamente se analizaron mediante métodos moleculares para caracterizar el contenido de β -lactamasas. CHROMagar mSuperCARBA presentó una sensibilidad y especificidad de 100% para la detección de bacterias productoras de KPC, OXA-48-like, NDM, VIM e IMP (García-Quintanilla *et al*, 2018).

Amar *et al* (2017) reportaron una sensibilidad de 81% y especificidad de 44% para CHROMagar mSuperCARBA en un estudio que comparó el desempeño de este medio con los medios ChromKPC y MAC/IMI. La sensibilidad y especificidad se calculó de acuerdo con la capacidad para detectar *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas versus *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos no productoras de carbapenemasas (Amar *et al*, 2017). Para el análisis se utilizaron muestras previamente caracterizadas con las pruebas Carba NP y el método MHT y confirmadas por la detección de genes de carbapenemasas por PCR por Lifshitz *et al* (2016).

VI. METODOLOGÍA

A. Diseño, enfoque y tipo de investigación

La investigación tiene un diseño no experimental con un enfoque cualitativo.

B. Población y muestra

La población son 641 muestras de heces humanas obtenidas del Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios entre marzo y septiembre de 2021 durante la pandemia de COVID-19 en Quetzaltenango, Guatemala. Estas muestras fueron evaluadas para detectar la presencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos por medio de la metodología de cultivo en placa en agar cromogénico CHROMagar mSuperCARBA (Ramay *et al*, 2023).

Para la muestra se seleccionaron aleatoriamente 100 muestras de heces humanas consideradas como positivas para la presencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos y 100 muestras consideradas como negativas con base en los resultados obtenidos por la metodología de siembra en CHROMagar mSuperCARBA.

C. Criterios de inclusión y exclusión

En el muestreo inicial se excluyeron las muestras de pacientes ambulatorios, con neutropenia grave, hemorragia intestinal, o COVID-19 (Ramay *et al*, 2023). La muestra para la detección de genes de carbapenemasas únicamente incluyó muestras de heces de adultos (Mayores a 18 años).

D. Variables

Las variables involucradas en esta investigación se describen en el Cuadro 1.

E. Hipótesis

Hipótesis nula: La comparación de resultados con el método de detección por PCR descarta la posibilidad de falsos positivos o falsos negativos de la metodología en placa en CHROMagar mSuperCARBA.

Hipótesis alternativa: La comparación de resultados con el método de detección por PCR no descarta la posibilidad de falsos positivos o falsos negativos de la metodología en placa en CHROMagar mSuperCARBA.

Cuadro 1. Descripción de variables

Nombre	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidad de medición
Presencia de bacterias resistentes a carbapenémicos	Presencia de bacterias resistentes a carbapenémicos en muestras analizadas en CHROMagar mSuperCARBA.	Cualitativa	Independiente	Positiva/ Negativa
Presencia de genes de carbapenemasas	Presencia de los genes de carbapenemasas <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA48-like} , y <i>bla</i> _{NDM} en muestras analizadas por PCR de punto final.	Cualitativa	Independiente	Positiva/ Negativa
Sensibilidad	Capacidad para detectar correctamente las muestras que presentan bacterias productoras de carbapenemasas como positivas.	Cuantitativa	Dependiente	%
Especificidad	Capacidad para detectar las muestras que no presentan bacterias productoras de carbapenemasas como negativos.	Cuantitativa	Dependiente	%
Valor predictivo negativo	Probabilidad de que una muestra no presente bacterias productoras de carbapenemasas al obtener un resultado negativo.	Cuantitativa	Dependiente	%
Valor predictivo positivo	Probabilidad de que una muestra presente bacterias productoras de carbapenemasas al obtener un resultado positivo.	Cuantitativa	Dependiente	%

F. Metodología

1. Extracción de ADN de muestras de heces humanas

Las muestras se inactivaron con calor en un baño de agua a 100 °C durante 15 minutos. Luego se utilizó el kit comercial QIAamp PowerFecal Pro-DNA Kit para extraer ADN de las muestras de heces humanas siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen, 2020). Se agregó un paso adicional de calentamiento de las muestras en un baño de agua a 80-100 °C durante 10 minutos antes de cada extracción. Luego de la extracción, se midió la concentración de ADN con un espectrofotómetro UV-Visible NanoDrop con el programa específico para la cuantificación de ácidos nucleicos. Además, se determinó la pureza del extracto según la razón de las mediciones A260/280 en las que valores de ~1.8 son considerados como indicadores de buena pureza para estimar la calidad del extracto. El procedimiento se describe a detalle en el POE I.

2. Detección de genes codificantes de carbapenemasas por PCR de punto final

Se realizó la amplificación de los genes *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA48-like}*, y *bla_{NDM}* mediante una PCR de punto final a partir del extracto de ADN de muestras de heces humanas. Se utilizaron cebadores específicos para cada uno de estos genes tomados de Servicio Antimicrobianos (2019) como se describe en el Cuadro 2. Luego, los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa para separar los fragmentos de ADN por electroforesis. Utilizando una estándar molecular de ADN se comparó el tamaño de cada fragmento amplificado en pares de bases y se determinó a qué genes corresponden para confirmar la presencia de estos en cada muestra. Con base en estos resultados se determinó la presencia o ausencia de cada gen. El procedimiento se describe a detalle en el POE II.

La detección de uno o varios de los genes de carbapenemasas indicó la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas en las muestras por lo que se clasificaron como positivas según PCR. Por otra parte, las muestras que no presentaron algún gen de carbapenemasas se clasificaron como negativas.

3. Detección del gen 16S rRNA por PCR de punto final como control interno de amplificación

Se amplificó el gen 16S rRNA con los cebadores universales 27F y 1492R (Lane, 1991). La secuencia de estos cebadores se presenta en el Cuadro 2. El gen 16S rRNA se utilizó como control interno para verificar que la extracción de ADN se realizó correctamente y que estos extractos no contenían inhibidores de amplificación con el fin de descartar posibles falsos negativos. Por lo tanto, este procedimiento se realizó únicamente en las muestras negativas para genes codificantes de carbapenemasas para reducir el uso de reactivos y materiales. El procedimiento se describe a detalle en el POE III.

Cuadro 2. Cebadores para genes de carbapenemasas y 16S rRNA

Gen	Cebador hacia adelante	Cebador hacia atrás	Tamaño del fragmento (pb)
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F (5'- AGT GGT GAG TAT CCG ACA G -3')	VIM-R (5'- ATG AAA GTG CGT GGA GAC -3')	261
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-UF1 (5'- GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA -3')	IMP-UR1 (5'- GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT -3')	404
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F (5'- AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC -3')	NDM-R (5'- GGC GTA GTG CTC AGT GTC -3')	512
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F (5'- AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG -3')	KPC-R (5'- AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA -3')	916
<i>bla</i> _{OXA48-like}	OXA48-F (5'- ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG G -3')	OXA48-R2 (5'- TGA GCA CTT CTT TTG TGA TG -3')	763-775
16S rRNA	27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3')	1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3')	~1400

Fuente: Modificado de Servicio Antimicrobianos (2019) y Lane (1991)

4. Determinación de la sensibilidad, especificidad, VPP, y VPN

Para el análisis de datos se realizó una comparación entre los resultados obtenidos para cada muestra por ambas metodologías. Se utilizó el método de PCR como estándar de referencia para determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del método por sembrado en placa en CHROMagar mSuperCARBA para detectar la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas.

Se consideró como verdaderos positivos los resultados positivos en CHROMagar mSuperCARBA confirmados por un resultados positivos por el método de PCR. Asimismo, los verdaderos negativos son las muestras negativas en CHROMagar mSuperCARBA confirmadas como negativas por el método de PCR. Los falsos positivos comprenden las muestras positivas en CHROMagar mSuperCARBA que obtuvieron un resultado negativo por el método de PCR. Finalmente, se considera que los falsos negativos son aquellas muestras negativas en CHROMagar mSuperCARBA que obtuvieron un resultado positivo por PCR. A continuación, se presentan las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN.

Ecuación 1. Cálculo de la sensibilidad

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} * 100$$

Fuente: Monaghan *et al* (2021)

Ecuación 2. Cálculo de la especificidad

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} * 100$$

Fuente: Monaghan *et al* (2021)

Ecuación 3. Cálculo del VPP

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos positivos}} * 100$$

Fuente: Monaghan *et al* (2021)

Ecuación 4. Cálculo del VPN

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos negativos}} * 100$$

Fuente: Monaghan *et al* (2021)

VII. RESULTADOS

A. Extracción de ADN

Las muestras de heces se recolectaron de pacientes del Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango, Guatemala, entre marzo y septiembre de 2021. Estas muestras fueron evaluadas en agar cromogénico CHROMagar™ mSuperCARBA™ para detectar la presencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC). De forma aleatoria, se generó un listado de 100 muestras positivas y 100 muestras negativas, con base a los resultados del agar cromogénico para iniciar la evaluación de especificidad y sensibilidad. Con la metodología empleada, fue posible obtener ADN de 97 muestras positivas y 99 muestras negativas según CHROMagar™ mSuperCARBA™ para un total de 196.

Inicialmente, las muestras fueron inactivadas con calor para evitar los riesgos asociados al manejo de muestras biológicas que pueden contener microorganismos patógenos. Luego se realizó la extracción de ADN utilizando el kit comercial QIAamp® PowerFecal® Pro-DNA Kit de Qiagen, al que se agregó un paso inicial de calentamiento de las muestras. Finalmente, se cuantificó la concentración de ADN y la pureza del extracto por medio de espectrofotometría UV-Visible. La media, desviación estándar y valores mínimos y máximos de estos resultados se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración y pureza del extracto de ADN de las muestras positivas y negativas

Grupo de muestras	Concentración de ADN (ng/μL)				A260/280			
	Media	σ	Min	Max	Media	σ	Min	Max
Positivas agar	12.9	18.3	0.0	106.0	1.78	0.46	-0.31	3.33
Negativas agar	3.9	5.0	-0.9	34.5	2.33	3.36	-8.64	26.52
Total	8.4	14.0	-0.9	106.0	2.06	2.42	-8.64	26.52

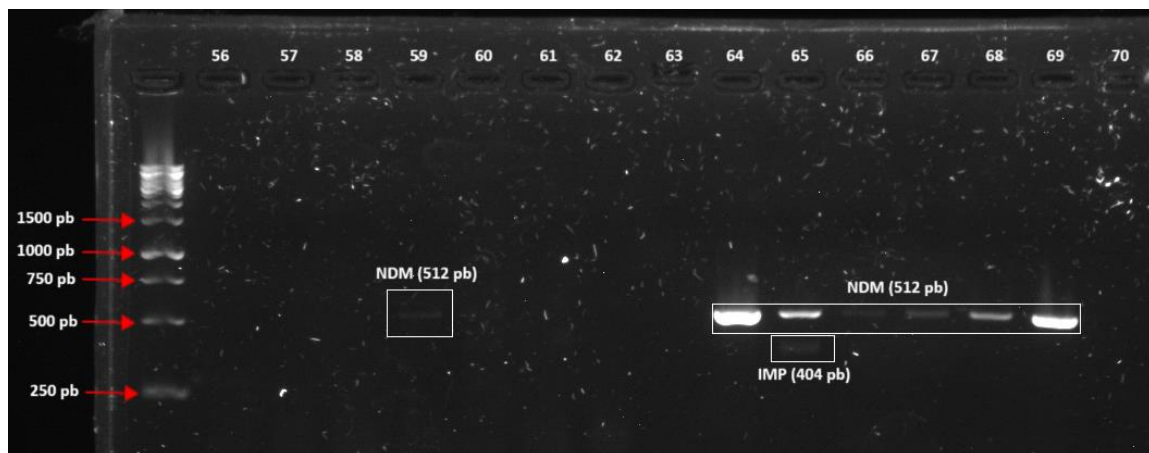
Leyenda del Cuadro 3. Concentración y pureza de los extractos de ADN obtenidos para cada grupo de muestras clasificadas según el resultado obtenido en CHROMagar™ mSuperCARBA™. A260/280 indica la razón de absorbancia a 260 nm y 280 nm como indicador de pureza. σ indica la desviación estándar de los datos. Min indica el valor mínimo obtenido en cada grupo de datos. Max indica el valor máximo en cada grupo de datos.

B. Detección de genes de carbapenemasas por PCR

Los extractos de ADN se utilizaron para detectar los genes codificantes de carbapenemasas *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA48-like}*, y *bla_{NDM}* por medio del método molecular de PCR de punto final. Los genes amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos de ADN e identificarlos según su tamaño. La detección de uno o varios de los genes de carbapenemasas indicó la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas en las muestras, que se clasificaron como positivas según PCR. Las muestras que no presentaron algún gen codificante de carbapenemasas se clasificaron como negativas según PCR para bacterias productoras de carbapenemasas.

Se obtuvieron 44 muestras positivas para genes de carbapenemasas, de las cuales 43 pertenecen al grupo positivo según CHROMagar™ mSuperCARBA™ y 1 al grupo negativo. No se detectaron genes de carbapenemasas en 52 muestras del grupo positivo, según CHROMagar™ mSuperCARBA™ y en 96 del grupo negativo. En la Figura 5 se presenta un ejemplo de la visualización de los resultados de la detección de genes de carbapenemasas en un gel de agarosa por electroforesis.

Figura 5. Detección de genes de carbapenemasas



Leyenda de la Figura 5. Ejemplo de los resultados de la detección de genes de carbapenemasas. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con 3 μ L de escalera GeneRuler 1 kb DNA y 6 μ L de cada muestra. En la parte superior de los pozos se indica el código de tubo asignado a cada muestra. Se señalan los genes *bla_{NDM}* y *bla_{IMP}* detectados en distintas muestras y se indica el tamaño de estos fragmentos. Se observan distintas intensidades en las diferentes bandas correspondientes a *bla_{NDM}*.

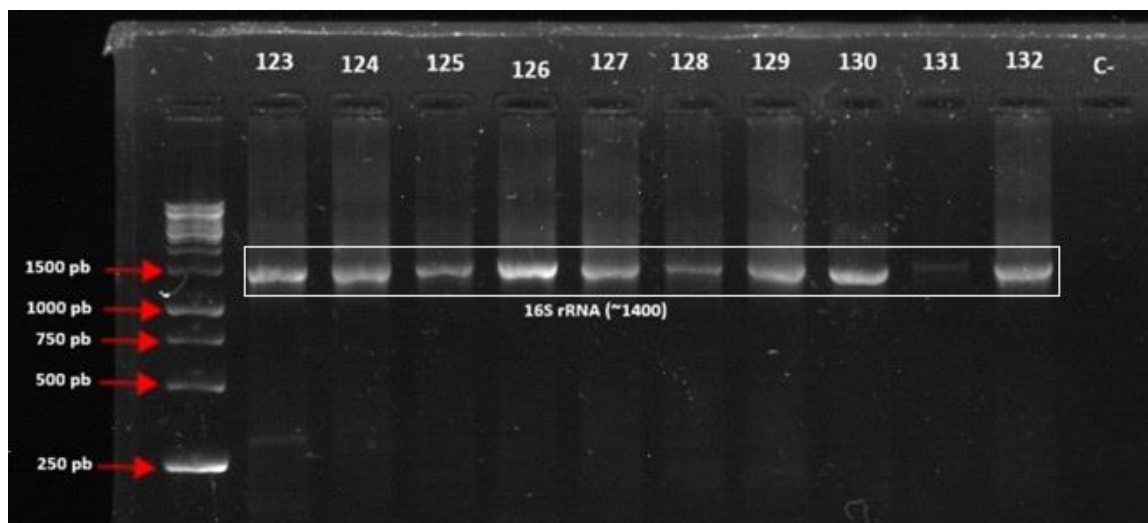
C. Validación de los resultados de la detección de genes de carbapenemasas por PCR

Previo a determinar la frecuencia de los genes de carbapenemasas y calcular la sensibilidad, especificidad, VPP, y VPN se determinó la cantidad de resultados válidos. Se consideró como resultado válido a los positivos para genes de carbapenemasas debido a que su detección indica que la presencia de ADN que puede ser amplificado en las muestras. Por otra parte, los resultados negativos para genes de carbapenemasas se validaron mediante la detección del gen 16S rRNA por PCR. Este procedimiento confirmó la presencia de ADN amplificable en las muestras y descartó falsos negativos. Las muestras negativas para genes de carbapenemasas que no presentaron amplificación del gen 16S rRNA se clasificaron como resultados inválidos.

La amplificación del gen 16S rRNA se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa al igual que los genes de carbapenemasas. En la Figura 6 se presenta un ejemplo de la visualización de los resultados de este procedimiento. En el Cuadro 4 se presentan los resultados validados por la amplificación de genes de carbapenemasas o 16S rRNA. De 196 muestras analizadas, se validaron 192 muestras en total, de las cuales

95 pertenecen al grupo positivo según CHROMagar™ mSuperCARBA™ y 97 al grupo negativo. La amplificación de 16S rRNA permitió detectar 4 muestras inválidas, en las que obtuvieron resultados negativos para genes de carbapenemasas y para este control interno.

Figura 6. Amplificación del gen 16S rRNA



Leyenda de la Figura 6. Ejemplo de los resultados de amplificación de 16S rRNA. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con 3 µL de escalera GeneRuler 1 kb DNA y 6 µL de cada muestra. En la parte superior de los pozos se indica el código de tubo asignado a cada muestra. Se señalan las muestras que presentaron amplificación de 16S rRNA y el tamaño de estos fragmentos. C- corresponde al control negativo que no presentó amplificación de este gen.

Cuadro 4. Resumen de resultados válidos

Grupo de muestras	Positivo PCR carbapenemasas	Positivo 16S rRNA	Total muestras válidas	Muestras inválidas
Positivas agar	43	52	95	2
Negativas agar	1	96	97	2
Total	44	148	192	4

Leyenda del Cuadro 4. Muestras validadas por amplificación de genes de carbapenemasas o 16S rRNA. En este cuadro se presenta la cantidad de resultados válidos para cada grupo de muestras según CHROMagar™ mSuperCARBA™. Asimismo, se presenta la cantidad de muestras que se validaron en cada procedimiento en el que positivo PCR carbapenemasas indica que presentó amplificación de uno o varios genes de carbapenemasas y positivo 16S rRNA indica que presentó amplificación del gen 16S rRNA. También se presentan las muestras inválidas que corresponden a aquellas que no presentaron amplificación de genes de carbapenemasas ni 16S rRNA

D. Distribución y frecuencia de genes de carbapenemasas

Se calculó la frecuencia de genes de carbapenemasas detectados en cada grupo de clasificación según CHROMagar™ mSuperCARBA™. Para este cálculo solamente se tomó en cuenta a las muestras válidas para amplificación por PCR. El resumen de la detección de genes codificantes de carbapenemasas se presenta

en el Cuadro 5. *bla*_{NDM} se detectó con mayor frecuencia, estando presente en 34/192 (17.7%) de las muestras. Además, este fue el único gen detectado en una sola muestra negativa según CHROMagar™ mSuperCARBA™. *bla*_{IMP} se detectó en 7/192 (3.6%) muestras. Las combinaciones de genes *bla*_{NDM} + *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} + *bla*_{IMP}, y *bla*_{NDM} + *bla*_{OXA48-like} se detectaron en 1/192 (0.5%) muestras cada una. El gen *bla*_{KPC} no se detectó en ninguna de las muestras analizadas.

Cuadro 5. Genes de carbapenemasas detectados en muestras de heces

Grupo de muestras	Positivas agar	Negativas agar	Total
Gen de carbapenemasa	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
<i>bla</i> _{NDM}	33 (34.7 %)	1 (1.0 %)	34 (17.7 %)
<i>bla</i> _{IMP}	7 (7.4 %)	0 (0 %)	7 (3.6 %)
<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{VIM}	1 (1.1 %)	0 (0 %)	1 (0.5 %)
<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{OXA48-like}	1 (1.1 %)	0 (0 %)	1 (0.5 %)
<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{IMP}	1 (1.1 %)	0 (0 %)	1 (0.5 %)
Total positivo gen carbapenemasas	43 (45.3 %)	1 (1.0 %)	44 (22.9 %)
Total negativo gen carbapenemasas	52 (54.7 %)	96 (99.0 %)	148 (77.1 %)

Leyenda del Cuadro 5. Frecuencia de los genes codificantes de carbapenemasas detectados en muestras de heces por PCR de punto final. En este cuadro se presenta la frecuencia de cada gen y combinaciones de genes clasificadas según el resultado obtenido en CHROMagar™ mSuperCARBA™. El porcentaje se calculó sobre el total de muestras para cada grupo siendo 95 para positivas en agar y 97 para negativas en agar. Asimismo, se presenta la frecuencia total en la última columna calculada con base en la totalidad de 192 muestras válidas.

E. Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de CHROMagar™ mSuperCARBA™

Se realizó una comparación de los datos obtenidos en la detección de carbapenemasas por PCR y el método en CHROMagar™ mSuperCARBA™ para clasificar los resultados como verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos, y falsos negativos. En esta comparación se utilizó el método de PCR como estándar de referencia. Se obtuvieron 43/192 verdaderos positivos y 96/192 verdaderos negativos. Asimismo, se obtuvieron 52/192 falsos positivos y 1/192 falso negativo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Clasificación de resultados en CHROMagar mSuperCARBA para la detección de carbapenemasas

Resultado	Frecuencia (%)
Verdaderos positivos	43 (22.4 %)
Falsos positivos	52 (27.1 %)
Verdaderos negativos	96 (50.0 %)
Falsos negativos	1 (0.5 %)

Leyenda del Cuadro 6. Clasificación de los resultados para la detección de carbapenemasas en CHROMagar™ mSuperCARBA™. En este cuadro se presenta la frecuencia de los verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos, y falsos negativos para este agar. El porcentaje se calculó sobre con base en el total de 192 muestras válidas.

Los resultados del Cuadro 6 se utilizaron para calcular la sensibilidad, especificidad, VPN, y VPP de CHROMagar™ mSuperCARBA™. Para obtener estos datos se utilizaron las ecuaciones 1, 2, 3 y 4 presentadas en la sección 4 de la metodología. Se obtuvo una sensibilidad de 97.7% y especificidad de 64.9%, además de un VPP de 45.3% y VPN de 99.0% para CHROMagar mSuperCARBA.

Cuadro 7. Evaluación de CHROMagar mSuperCARBA para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas

Método	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CHROMagar mSuperCARBA	97.7%	64.9%	45.3%	99.0%

Leyenda del Cuadro 7. Sensibilidad, especificidad, VPP, y VPN de CHROMagar mSuperCARBA para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el objetivo de obtener ADN purificado para realizar la detección de genes de carbapenemasas por PCR. En el Cuadro 3 se observa que la concentración de ADN es mayor en las muestras positivas que las muestras negativas según CHROMagar™ mSuperCARBA™. Estas diferencias pueden ser explicadas por las desviaciones estándar obtenidas para estos datos las cuales indican una alta dispersión de los datos alrededor de la media. La dispersión se refleja especialmente en el valor máximo de 106.0 ng/μL de las muestras positivas en agar que se encuentra alejado de la media de 12.9 ng/μL. Posiblemente, estos valores atípicos son la causa de una media más alta en la concentración de ADN de las muestras positivas en agar.

La relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm proporcionó una estimación de la pureza de los extractos de ADN. En el Cuadro 3 se observa que la media de las muestras positivas en agar se acerca a 1.8 indicando ADN de alta pureza (Thermo Scientific, 2012). Además, se observa que la desviación estándar es cercana a 0 indicando una baja dispersión de los datos. La media de las muestras negativas se encuentra más alejada del valor ideal de pureza. Se debe considerar que los datos presentan una alta dispersión como se observa en el valor mínimo y máximo y la desviación estándar. Estas medidas de A260/280 atípicas pueden ser causadas por inexactitud que se genera en muestras con concentraciones de ADN menores a 10 ng/μL y errores en la lectura del blanco (Thermo Scientific, 2012).

La composición de cada muestra también puede afectar la concentración de ADN y la calidad del extracto. Específicamente en muestras de heces, la variación en la composición de la microbiota intestinal, consistencia de las heces, y dieta pueden dificultar la extracción de ADN y afectar la pureza de los extractos (McOrist *et al*, 2002). Asimismo, se ha observado que la calidad del extracto de ADN varía con la cantidad de muestra agregada (Ariefdjohan *et al*, 2010) que puede contener distintos niveles de agua y heces. Las diferencias en la concentración de ADN y la calidad del extracto pueden deberse a estos factores que varían de una muestra a otra.

En este estudio, las concentraciones de ADN y relación A260/280 se consideraron como estimados y no como datos definitivos. Los extractos de ADN se utilizaron para las aplicaciones posteriores a pesar de obtener datos negativos o iguales a 0 en la concentración de ADN y con purezas consideradas como bajas. Estas muestras presentaron amplificación por PCR indicando que el ADN contenido presenta la calidad necesaria para realizar estos procedimientos a pesar de los datos obtenidos por espectrofotometría UV-Visible.

A pesar de que las muestras de heces se congelaron y se almacenaron por un periodo extendido previo a la extracción de ADN, no se considera que esta sea una variable que afectara la calidad del extracto. La criopreservación es un procedimiento estándar para el almacenamiento a largo plazo de muestras fecales (Vandeputte *et al*, 2017). Se ha demostrado que la calidad y cantidad de ADN de muestras de heces humanas criopreservadas es similar a muestras frescas y son aptas para procesos basados en amplificación de ADN (Kia *et al*, 2016).

B. Detección de genes de carbapenemasas por PCR

La detección de los genes de carbapenemasas *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA48-like}, y *bla*_{NDM} por PCR se realizó con el objetivo de identificar las muestras que presentaban enterobacterias productoras de carbapenemasas codificadas por estos genes. Se esperaba que las muestras positivas según CHROMagar™ mSuperCARBA™ presentaran uno o varios de estos genes. Sin embargo, no se detectaron genes de carbapenemasas en algunas de estas muestras.

La diferencia de resultados positivos en ambos métodos posiblemente se deba a la resistencia mediada por otros mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas. La amplificación por PCR detecta genes específicos que en este caso son los 5 genes más prevalentes de carbapenemasas a nivel mundial. Por lo tanto, la detección por PCR se enfoca específicamente en la detección de bacterias productoras de carbapenemasas. Por otra parte, el uso previsto para CHROMagar™ mSuperCARBA™ es la detección de bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos (Chromagar, 2022). Esto indica que CHROMagar™ mSuperCARBA™ presenta la capacidad de detectar enterobacterias resistentes a carbapenémicos, incluyendo tanto a aquellas que producen carbapenemasas como las que presentan otros mecanismos de resistencia que pudieron presentarse en las muestras analizadas.

Se debe considerar que las muestras provienen de pacientes hospitalarios y las bacterias que presentan expresión modulada o mutaciones en las porinas proliferan especialmente en ambientes hospitalarios (Codjoe y Donkor, 2017). Este podría ser uno de los mecanismos de resistencia que generó resultados positivos en CHROMagar™ mSuperCARBA™ a pesar de que las muestras no presentaran genes de carbapenemasas. También es posible que las muestras presenten combinaciones de ESBL y cefalosporinasas AmpC que, a pesar de no clasificarse como carbapenemasas, son β -lactamasas que al combinarse con otros mecanismos pueden generar resistencia a carbapenémicos (Aslam *et al*, 2020). Para detectar las ESBL y AmpC sería necesario incluir cebadores específicos para las secuencias correspondientes de estas enzimas.

Finalmente, se podría considerar que la resistencia de las muestras esté mediada por la producción de otros genes de carbapenemasas distintos a los 5 más prevalentes que se incluyeron en la detección por PCR. Sin embargo, debido a la distribución limitada de otras carbapenemasas en comparación a *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA48-like}, y *bla*_{NDM} es poco probable que estas se encuentren en las muestras analizadas. En una

revisión realizada por Diene y Rolain (2014), sobre el número de publicaciones para cada gen de carbapenemasas, se determinó que el resto de carbapenemasas se han reportado considerablemente menos que los 5 genes de interés en este estudio. Esto posiblemente se deba a un surgimiento reciente o a diferencias en la forma de codificación de esas enzimas. Por ejemplo, las carbapenemasas IMI (β -lactamasa hidrolizante de imipenem), SME (Enzima de *Serratia marcescens*), NMC (Carbapenemasa no metalo enzima) usualmente se encuentran codificadas en el cromosoma bacteriano (Queenan y Bush, 2007). Al no estar codificadas en un elemento móvil, como las 5 más prevalentes, la probabilidad de diseminación de estas carbapenemasas se reduce considerablemente (Diene y Rolain, 2014).

Respecto a las muestras negativas en CHROMagar™ mSuperCARBA™ se esperaba que ninguna de estas muestras presentara genes de carbapenemasas. Este resultado se observó en la todas las muestras de este grupo a excepción de una. Se ha observado que algunos bacilos Gram negativo puede presentar genes de carbapenemasas silenciosos, por lo que son fenotípicamente susceptibles a carbapenémicos a pesar de presentar las secuencias necesarias para producir carbapenemasas (Emira *et al*, 2020). Es posible que el gen de carbapenemasa detectado en esa muestra negativa según CHROMagar™ mSuperCARBA™ presente una expresión baja o nula causando la susceptibilidad a carbapenémicos. Para confirmar los niveles de expresión se debe cuantificar el ARNm correspondiente al gen de carbapenemasa detectado mediante ensayos como hibridación northern, microarray, qPCR, o secuenciación del ARN (Singh *et al*, 2018).

La presencia de estos genes silenciosos resalta la importancia del monitoreo de genes de carbapenemasas por PCR y otros métodos moleculares. Los genes silenciosos contribuyen a la diseminación de la resistencia a carbapenémicos debido a que las bacterias que los presentan no son detectadas por las pruebas fenotípicas y, por lo tanto, no se administra el tratamiento correspondiente. Esta diseminación es de especial importancia en ambientes hospitalarios en los que las concentraciones mínimas inhibitorias de carbapenémicos se mantienen bajas y las pruebas fenotípicas pueden generar resultados negativos (Meletis *et al*, 2015).

C. Validación de los resultados de la detección de genes de carbapenemasas por PCR

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó con el objetivo de confirmar los resultados negativos de la detección de genes de carbapenemasas por PCR y descartar falsos negativos. Se utilizó el gen 16S rRNA como control interno de amplificación debido a que este es un gen constitutivo en células procariotas que codifica la subunidad ribosomal 16S y se ha determinado que presenta una expresión estable (Carillo-Casas *et al*, 2008). La selección de un gen constitutivo en células procariotas como control interno es de importancia para este estudio, en vista de que los genes objetivos de carbapenemasas también se encuentran en las bacterias contenidas en las muestras de heces.

En el Cuadro 4 se observa que la mayoría de los resultados se validaron mediante la amplificación de genes de carbapenemasas o 16S rRNA. La amplificación de cualquiera de estos genes indicó que las muestras

presentaban ADN bacteriano que no era afectado por inhibidores de PCR. Por lo tanto, se confirmó que los resultados negativos para genes de carbapenemasas se deben a la ausencia específica de estos genes y no a la ausencia de ADN bacteriano en general o a la presencia de inhibidores de PCR en las muestras. Por otra parte, la amplificación de 16S rRNA permitió detectar 4 muestras inválidas debido a que presentaron resultados negativos para la detección de este gen indicando la ausencia de ADN bacteriano o la presencia de inhibidores de PCR.

Los inhibidores de PCR pueden introducirse durante el proceso de extracción. Por ejemplo, si no se utiliza una técnica aséptica, se pueden introducir nucleasas que pueden degradar el ADN de las muestras (Schrader *et al*, 2012). Los reactivos de extracción también pueden contener inhibidores como fenoles, cloruro de sodio, y detergentes que deben eliminarse durante el procesamiento de las muestras (Demeke y Jenkins, 2009; Schrader *et al*, 2012). En este caso, la extracción de ADN se realizó por lotes de 12 a 24 muestras por lo que se esperaría que múltiples muestras de un mismo lote presentaran los mismos resultados en caso de que este proceso fuese el origen de los inhibidores de PCR. Dado que la mayoría de las muestras presentaron resultados válidos, es posible que la ausencia de amplificación de 16S rRNA se deba a propiedades específicas de cada muestra y no al proceso de extracción de ADN.

Se debe considerar que las heces tienden a contener inhibidores de PCR con más frecuencia que otros tipos de muestras. Entre los inhibidores de PCR presentes en heces los más frecuentes son sales biliares, glicolípidos y polisacáridos complejos (Roperch *et al*, 2015; Monteiro *et al*, 1997). Se ha observado que la presencia de estos inhibidores no es constante en las heces y su concentración varía de un individuo a otro, e incluso puede variar entre muestras de un mismo individuo (Monteiro *et al*, 1997). Las variaciones en inhibidores pueden ser causadas por distintos factores como la microbiota intestinal, dieta, medio ambiente y estilo de vida (Srirungruang *et al*, 2022).

El kit de extracción de ADN que se utilizó contiene una solución para la eliminación de inhibidores que puede precipitar polisacáridos, restos celulares, y proteínas para separarlos del extracto de ADN (Qiagen, 2020). Sin embargo, es posible que estos materiales no se eliminen por completo si se presentan en altas concentraciones en las muestras de heces. Por lo tanto, es posible que las muestras identificadas como inválidas presentaran concentraciones altas de inhibidores a causa de factores específicos de cada individuo y que estos compuestos afectar la amplificación de genes de carbapenemasas y 16S rRNA.

D. Distribución y frecuencia de genes de carbapenemasas

Se calculó la frecuencia de genes de carbapenemasas en las muestras válidas con el objetivo de obtener información sobre los genes de carbapenemasas circulantes en Guatemala y realizar una comparación con los datos obtenidos en estudios previos. En el Cuadro 5 se presenta la frecuencia obtenida para cada gen y las combinaciones detectadas en las muestras de heces analizadas. Entre las 192 muestras válidas que se

analizaron, el 22.9% presentó uno o varios genes de carbapenemasas mientras que el 77.1% presentó un resultado negativo.

Se observa que el gen *bla_{NDM}* (17.7%) se presentó con mayor frecuencia en las muestras analizadas. Este gen fue el único en detectarse en el grupo de muestras negativas según CHROMagar mSuperCARBA y fue el único gen que se repitió en las combinaciones detectadas de *bla_{NDM} + bla_{VIM}*, *bla_{NDM} + bla_{OXA48-like}*, y *bla_{NDM} + bla_{IMP}*. Al igual que en este estudio, *bla_{NDM}* se ha detectado en Guatemala en mayor proporción que otros genes estando presente en el 19% de las muestras analizadas por Chinchilla *et al* (2013) y el 90.7% de las muestras analizadas por Velásquez Porta y Lau Bonilla (2017). Según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), *bla_{NDM}* es uno de los dos genes de carbapenemasas que se reportan con mayor frecuencia en Guatemala siendo *bla_{KPC}* el otro gen más común desde la primera detección de carbapenemasas en 2010 (MSPAS, 2022)

En este caso, el gen *bla_{KPC}* no se reportó en ninguna de las muestras analizadas. Estos resultados coinciden con los datos reportados por Velásquez Porta y Lau Bonilla (2017) que no detectaron ninguna muestra que presentara *bla_{KPC}*. Los tipos muestras utilizadas en ese estudio incluyeron principalmente orina, sangre, y secreciones varias, obtenidas de pacientes hospitalizados en distintos servicios del Hospital San Juan de Dios, en la Ciudad de Guatemala en el año 2014. Sin embargo, Chinchilla *et al* (2013) reportaron la presencia de *bla_{KPC-2}* en 16% de las muestras analizadas compuestas principalmente por muestras de orina y secreciones varias. Estas muestras fueron obtenidas de un grupo hospitalario privado de la Ciudad de Guatemala y el Laboratorio Nacional de Salud. Asimismo, en 2020 se reportó que de todas las carbapenemasas detectadas en el Hospital San Juan de Dios en 2015, 24% eran KPC. Nuevamente, las bacterias productoras de carbapenemasas se detectaron principalmente en muestras de orina y secreciones varias (Guerra Carías *et al*, 2020).

Es posible que la diferencia en los resultados se deba a la distribución local de genes de carbapenemasas en cada región del país. Los estudios mencionados anteriormente se enfocaron en el análisis de muestras obtenidas en distintos hospitales de la Ciudad de Guatemala mientras que las muestras analizadas en este estudio provienen de un hospital en Quetzaltenango. Se ha observado que la distribución de carbapenemasas puede variar a nivel continental, nacional, regional, e incluso entre centros de salud de una misma región (van Duin y Doi, 2017). Esto podría explicar la ausencia de detección de *bla_{KPC}* en las muestras analizadas a pesar de ser uno de los genes más reportados en Guatemala.

Por otra parte, se debe considerar que la diferencia de los resultados de este estudio con los datos reportados previamente puede deberse al tipo de muestra que se analizó. Este estudio se enfocó en muestras de heces mientras que los otros reportes se centraron en muestras de orina y secreciones varias. Se ha

reportado que existe una diferencia significativa en la prevalencia de distintas especies de bacterias y aislamientos resistentes a carbapenémicos en distintos tipos de muestras (Haji *et al*, 2021).

La presencia de bacterias productoras de carbapenemasas en heces es alarmante debido a que esta es un indicador de transporte intestinal de estos microorganismos. Estos reservorios pueden ser una vía importante de transmisión horizontal de la resistencia a carbapenémicos (Pan *et al*, Viau *et al*, 2016). Ramay *et al* (2023) reportaron la colonización por enterobacterias resistentes a carbapenémicos en las comunidades asociadas al Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, lo cual indica que el riesgo también se presenta fuera de ambientes hospitalarios. Se debe considerar que las medidas de higiene que pueden reducir la diseminación general de bacterias colonizadoras intestinales no se implementan correctamente en Guatemala. Esto se demuestra en los conocimientos y comportamientos sobre lavado de manos evaluados en estudiantes de edad escolar en Quetzaltenango, Guatemala (Pieters *et al*, 2023). En este estudio se reportó que solo el 31.2% de los participantes identifica que después de ir al baño es un momento crítico para lavarse las manos y solo el 51.2% utiliza una técnica correcta de lavado de manos (Pieters *et al*, 2023). Por lo tanto, es importante promover y reforzar las prácticas de higiene como el lavado de manos para evitar la diseminación de bacterias resistentes a carbapenémicos en comunidades de Guatemala.

*bla*_{IMP} presentó la segunda frecuencia más alta (3.6%) entre los genes de carbapenemasas detectados en las muestras analizadas. Inicialmente, Rosales Hidalgo y Velásquez Porta (2018) publicaron un estudio en el que se obtuvieron resultados negativos para la detección de *bla*_{IMP} en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas de pacientes de la Ciudad de Guatemala. Posteriormente, según la alerta epidemiológica emitida por el MSPAS (2022), *bla*_{IMP} se reportó por primera vez en Guatemala en aislamientos de hospitales del departamento de Guatemala en el primer semestre de 2022. Sin embargo, es importante señalar que las muestras analizadas en este estudio fueron recolectadas entre marzo y septiembre de 2021 en Quetzaltenango (Ramay *et al*, 2023), meses antes de la primera detección reportada de *bla*_{IMP}. Esta información sugiere que *bla*_{IMP} podría haberse diseminado en distintas regiones del país, sin ser detectado por un tiempo indefinido. La detección de *bla*_{IMP} en este estudio resalta que la detección y monitoreo de bacterias productoras de carbapenemasas son insuficientes en Guatemala lo cual representa un riesgo grave para el sistema de salud dadas las dificultades asociadas al tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias.

Las combinaciones *bla*_{NDM} + *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} + *bla*_{IMP}, y *bla*_{NDM} + *bla*_{OXA48-like} se detectaron en una sola muestra cada una (0.5%). Hasta la fecha, es la primera vez que se reportan estas combinaciones de carbapenemasas en Guatemala. El primer reporte de combinaciones de carbapenemasas en el país se realizó en 2021 y se reportó la coproducción de KPC + NDM en aislamientos provenientes del Hospital Nacional de San Marcos, San Marcos (MSPAS, 2021). En Guatemala también se ha reportado la combinación de carbapenemasas KPC + VIM en aislamientos del Hospital Regional de Quiché, Quiché (MSPAS, 2022) y la

combinación triple de NDM + KPC + VIM en el Hospital Nacional especializado de Villa Nueva, Guatemala (MSPAS, 2023).

Nuevamente los resultados sugieren que los protocolos actuales de vigilancia y detección de bacterias productoras de carbapenemasas y los genes asociados no son suficientes para estimar la diseminación real de la resistencia a carbapenémicos a nivel regional y nacional. Dada la escasa detección, es posible que otras combinaciones de carbapenemasas se encuentren circulando en el país sin ser detectadas. Según Meletis *et al* (2015) la producción de carbapenemasas combinadas en un mismo aislamiento amplía la capacidad para hidrolizar múltiples antibióticos y reduce la disponibilidad de tratamientos efectivos. Por lo tanto, la detección de combinaciones de carbapenemasas es de vital importancia en vista de que esta condición puede representar un carga grave para los sistemas de salud al reducir la efectividad de los tratamientos disponibles.

En conjunto, los genes de carbapenemasas detectados resaltan la importancia de la vigilancia regional en conjunto con la vigilancia a nivel nacional. Hasta la fecha, este es el primer reporte de genes de carbapenemasas detectados en muestras provenientes de Quetzaltenango y del Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios. Este hospital cuenta con una de las capacidades más altas en la red de hospitales públicos del país y atiende a pacientes de departamentos aledaños a Quetzaltenango como San Marcos, Totonicapán, Suchitepéquez, y Huehuetenango (Barrios, 2008). Tomando en cuenta la importancia del Hospital Regional de Occidente y el rango de pacientes que abarca, se debe considerar la implementación y fortalecimiento de un sistema de vigilancia de bacterias productoras de carbapenemasas en este centro de salud que permita obtener información epidemiológica relevante para el sistema de salud nacional.

E. Sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de CHROMagar mSuperCARBA

La determinación de la sensibilidad, especificidad, VPN, y VPP de CHROMagar™ mSuperCARBA™ se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad de este medio cromogénico para detectar enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de heces humanas. El cálculo de estos parámetros se realizó en base los resultados clasificados como verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos, y falsos negativos (Cuadro 6). Las similitudes y variaciones entre los resultados obtenidos por PCR y CHROMagar™ mSuperCARBA™ se explicaron anteriormente en la sección “B. Detección de genes de carbapenemasas por PCR”.

En el Cuadro 7 se observa que CHROMagar™ mSuperCARBA™ presenta una alta sensibilidad de 97.7%. Según la definición de sensibilidad de Trevethan (2017), este dato indica que el agar evaluado presenta una alta capacidad para detectar correctamente como positivas a las muestras que contienen enterobacterias productoras de carbapenemasas. Asimismo, se observa que el VPN de CHROMagar™ mSuperCARBA™ es alto (99.0%), indicando una alta probabilidad de que una muestra negativa no presente

bacterias productoras de carbapenemasas, según lo definido por (Monaghan *et al*, 2021). Ambos resultados indican que se reportarán pocos falsos negativos.

La sensibilidad detectada en este estudio para CHROMagar™ mSuperCARBA™ se acerca a la sensibilidad de 100% detectada por Dos Santos *et al* (2017); García-Fernández *et al* (2017); y García-Quintanilla *et al* (2018). Por otra parte, el VPN es similar al valor de 96.5% reportado por Soria Segarra *et al* (2018). Esta comparación confirma que CHROMagar™ mSuperCARBA™ es una herramienta útil y robusta para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas y resistentes a carbapenémicos, en vista de que el método tiende a generar pocos falsos negativos. Al utilizar una prueba que genera pocos falsos negativos se reduce la probabilidad de descartar incorrectamente a algún caso que requiera de alguna intervención para evitar la diseminación de carbapenemasas y resistencia a carbapenémicos.

Por otra parte, se observa que la especificidad (64.9%) y el VPP (45.3%) son más bajos que la sensibilidad y el VPN. Según la definición de especificidad (Trevethan, 2017), este resultado indica que CHROMagar™ mSuperCARBA™ presenta una capacidad menor para detectar correctamente como negativo a las muestras que no presentan bacterias productoras de carbapenemasas. De la misma forma, según la definición de VPP por Monaghan *et al* (2021), la probabilidad de que una muestra positiva presente bacterias productoras de carbapenemasas es menor.

Al analizar la especificidad y el VPP se debe recordar el propósito de CHROMagar™ mSuperCARBA™ y el método de PCR utilizado como estándar de referencia. El método de PCR se utilizó para detectar los genes más prevalentes de carbapenemasas y, por lo tanto, permitió detectar enterobacterias productoras de carbapenemasas. Por otra parte, CHROMagar™ mSuperCARBA™ permite la detección de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (Chromagar, 2022). Como se mencionó anteriormente en la sección B del análisis de resultados, CHROMagar™ mSuperCARBA™ puede detectar enterobacterias que producen carbapenemasas o que presentan otros mecanismos de resistencia que se encuentran fuera del alcance previsto para el método de detección por PCR. A pesar de estas diferencias, se seleccionó el método de PCR como referencia considerando que el objetivo de este estudio es la evaluación sobre la capacidad para detectar carbapenemasas y las técnicas basadas en PCR son consideradas como estándar de oro para este propósito (Emira *et al*, 2020). Para las siguientes comparaciones es fundamental tener presente la información presentada en este párrafo.

La especificidad obtenida es menor que aquella reportada en otros estudios con valores entre 71% y 100% (Soria Segarra *et al*, 2018; Dos Santos *et al*, 2017; García-Quintanilla *et al*, 2018). El VPP también es menor al reportado por Soria Segarra *et al* (2018) de 92.4%. Sin embargo, se debe considerar que algunos de estos estudios incluyeron únicamente las muestras con genes confirmados de β -lactamasas y carbapenemasas (García-Quintanilla *et al*, 2018) o se evaluó la capacidad para detectar resistencia a carbapenémicos en

general (Soria Segarra *et al*, 2018; Dos Santos *et al*, 2017). En estos casos, las diferencias en la especificidad y VPP reportado para CHROMagar™ mSuperCARBA™ se debe a que se evaluaron características distintas. La detección de bacterias que presentan otros mecanismos de resistencia reduce la especificidad y VPP de CHROMagar™ mSuperCARBA™ para la detección de bacterias que presentan resistencia mediada específicamente por la producción de carbapenemasas.

Por otra parte, Amar *et al* (2017) evaluaron la capacidad de CHROMagar™ mSuperCARBA™ para detectar bacterias productoras de carbapenemasas versus bacterias resistentes a carbapenémicos no productoras de carbapenemasas. En esa evaluación se reportó una especificidad de 44%, menor a la reportada en el presente estudio. De la misma forma, la diferencia en los resultados se debe a que se evaluaron características distintas sobre la capacidad de detección de este agar.

Se demostró que CHROMagar™ mSuperCARBA™ presenta una alta sensibilidad y VPN para detectar bacterias que presentan genes carbapenemasas y por lo tanto pueden producir estas enzimas que son consideradas como el mecanismo principal de resistencia carbapenémicos (Alizadeh *et al*, 2020). Además, este método detecta bacterias resistentes a carbapenémicos a pesar de que estas no produzcan carbapenemasas. Tomando en cuenta ambos factores, se debe considerar la implementación de CHROMagar™ mSuperCARBA™ para el tamizaje de resistencia a carbapenémicos en muestras fecales como parte de un sistema de vigilancia de resistencia a carbapenémicos. La implementación de este método podría facilitar la detección de bacterias resistentes a carbapenémicos para guiar las medidas necesarias que contribuyan a la prevención de la diseminación de este tipo de resistencia.

Adicionalmente, se deben tomar en cuenta distintos factores al considerar la implementación de CHROMagar™ mSuperCARBA™ en Guatemala con relación al costo y capacitación del personal de laboratorio para realizar las pruebas y eficiencia de su uso. Las pruebas basadas en PCR tienden a tener costos elevados y requieren de personal altamente capacitado mientras que los métodos basados en medios de cultivo tienden a ser más rentables y ampliamente aplicables (Caliskan-Aydogan y Alocilja, 2023; Tamma y Simner, 2018). Esto se confirma al calcular que el costo aproximado por muestra para CHROMagar™ mSuperCARBA™ es de Q20.00 mientras que para PCR de punto final es de Q90.00, incluyendo la extracción inicial de ADN. Además, se debe considerar que una PCR requiere de equipo como termocicladores, y micropipetas, que aumentan el costo total de su implementación. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que los métodos basados en medios de cultivo, como CHROMagar™ mSuperCARBA™, requieren de mayor mano de obra y se debe esperar más tiempo para obtener resultados en comparación con métodos moleculares (Caliskan-Aydogan y Alocilja, 2023).

En Guatemala, los centros de salud y hospitales públicos carecen severamente de fondos suficientes (Samuel *et al*, 2020). Por lo tanto, es fundamental priorizar la rentabilidad de un método de detección de

bacterias resistentes a carbapenémicos ante otros factores. A pesar de que CHROMagar™ mSuperCARBA™ requiere de mayor tiempo y mano de obra, su bajo costo es de beneficio en las condiciones actuales del sistema de salud público de Guatemala. Idealmente, se realizaría el tamizaje inicial con CHROMagar™ mSuperCARBA™ y en caso de obtener resultados positivos se realizaría monitoreo epidemiológico enfocado en los distintos mecanismos de resistencia a carbapenémicos mediante métodos moleculares de forma rutinaria. Sin embargo, la implementación del tamizaje rutinario con CHROMagar™ mSuperCARBA™ como paso inicial sería un avance importante para monitorear la diseminación la resistencia a carbapenémicos en Guatemala.

Es importante destacar que, aunque la detección por PCR es el estándar de referencia para la detección de carbapenemasas, este método puede ser limitado debido a la posible presencia de otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos. Para los objetivos específicos de este estudio, enfocado en la detección de carbapenemasas, el método de PCR proporcionó una referencia confiable. Sin embargo, para una comprensión detallada de la resistencia a carbapenémicos se recomienda realizar un análisis basado en secuenciación que podría ampliar los resultados obtenidos en este estudio. Asimismo, se debe considerar que este estudio se limitó a muestras fecales de pacientes adultos hospitalizados. Para tener una perspectiva más completa de la distribución y prevalencia de carbapenemasas y otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos, se recomienda ampliar el análisis a muestras de pacientes más jóvenes, muestras no hospitalarias, y muestras ambientales.

IX. CONCLUSIONES

1. Se determinó que la metodología en placa en agar cromogénico presentó una sensibilidad de 97.7% y especificidad de 64.9% para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas en muestras fecales.
2. La comparación de resultados entre el método de detección por PCR y el método en placa en CHROMagar™ mSuperCARBA™ identificó múltiples falsos positivos y un falso negativo, específicamente para la detección de bacterias con resistencia a carbapenémicos mediada por la producción de carbapenemasas.
3. La identificación de resultados positivos y negativos, verdaderos y falsos, permitió determinar que el método en placa en CHROMagar™ mSuperCARBA™ presenta un valor predictivo positivo de 45.3% y un valor predictivo negativo de 99.0% para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas en muestras fecales.
4. Se determinó que, en las muestras analizadas, los genes de carbapenemasas se presentan con una frecuencia de 17.7% para *bla*_{NDM}, 3.6% para *bla*_{IMP}, 0.5% para las combinaciones *bla*_{NDM} + *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} + *bla*_{IMP}, y *bla*_{NDM} + *bla*_{OXA48-like} y 0% para *bla*_{KPC}.

X. RECOMENDACIONES

1. Optimizar el proceso de extracción de ADN en cada muestra para mejorar la calidad del extracto de ADN a partir de muestras de heces.
2. Ampliar la detección molecular para incluir otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos además de la producción de carbapenemasas.
3. Implementar y fortalecer sistemas de vigilancia de resistencia a carbapenémicos y genes de carbapenemasas a nivel local y regional en Guatemala.
4. Sugerir la implementación del uso de CHROMagar™ mSuperCARBA™ para la detección de resistencia a carbapenémicos en muestras fecales en laboratorios clínicos microbiológicos de todo nivel.
5. Combinar la detección fenotípica de bacterias resistentes a carbapenémicos por medio de la metodología en agar cromogénico con la detección de genes de carbapenemasas por PCR para obtener información de interés epidemiológico.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alizadeh, N., Ahangarzadeh Rezaee, M., Samadi Kafil, H., Hasani, A., ..., y Ghotaslou, R. (2020). Evaluation of Resistance Mechanisms in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1377–1385. doi:10.2147/idr.s244357
- Amar, M., Shalom, O., y Adler, A. (2017). Comparative evaluation of a new commercial media, the CHROMagar™ mSuperCARBA™, for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(1), 20–22. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.0
- Amladi, A. U., Sudarsanam, T. D., Kandasamy, S., Kekre, N., Veeraraghavan, B., y Sahni, R. D. (2019). Evaluation of CHROMagar™mSuperCARBATM as a Phenotypic Test for Detection of Carbapenemase Producing Organisms. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 13(9), DC11-DC15. doi: 10.7860/JCDR/2019/41765/13119
- Ariefdjohan, M. W., Savaiano, D. A., y Nakatsu, C. H. (2010). Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutrition Journal*, 9(1). doi: 10.1186/1475-2891-9-23
- Armstrong, T., Fenn, S. J., y Hardie, K. (2021). JMM Profile: Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. *Journal of Medical Microbiology*, 70(12). doi: 10.1099/jmm.0.001462
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., ..., y Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, 11, 1645–1658. doi: 10.2147/IDR.S173867
- Aurilio, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L. G., Coppolino, F., Barbarisi, A., Passavanti, M. B., y Pace, M. C. (2022). Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*, 11(3), 421. doi: 10.3390/antibiotics11030421
- Balsalobre, L., Blanco, A., y Alarcón, T. (2019). *Beta-Lactams*. En J. Capelo-Martínez y G. Igrejas (Eds.), *Antibiotic Drug Resistance* (pp. 57–72). doi: 10.1002/9781119282549.ch3

- Barrios, J. (2008). *Informe Final Hospital Regional de Occidente "San Juan de Dios" Quetzaltenango*. Centro de Documentación y Biblioteca de Farmacia. <https://www.biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/EPSQB928.pdf>
- Beig, M., Taheri, M., y Arabestani, M. R. (2021). Comparison of Different Phenotypic Tests versus PCR in the Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Hamadan, Iran. *International Journal of Microbiology*, 1–8. doi: /10.1155/2021/5582615
- Boutal, H., Vogel, A., Bernabeu, S., Devilliers, K., ..., y Volland, H. (2018). A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(4), 909–915. doi: 10.1093/jac/dkx521
- Boyd, S., Holmes, A., Peck, R., Livermore, D., y Hope, W. (2022). OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(8), e00216-22. doi: 10.1128/aac.00216-22
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC.01076–18. doi:10.1128/aac.01076-18
- Bush, K., y Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. doi:10.1101/cshperspect.a025247
- Bush, K., y Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). doi:10.1128/cmr.00047-19
- Bush, K., y Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- Calhoun, C., Wermuth, H. R., y Hall, G. A. (2022). *Antibiotics*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535443/>
- Caliskan-Aydogan, O., y Alocilja, E. C. (2023). A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacterales and Its Detection Techniques. *Microorganisms*, 11(6), 1491. doi: 10.3390/microorganisms11061491

- Cardoso, J., Pereira, L., Iversen, M., y Ramos, A. (2014). What is gold standard and what is ground truth? *Dental Press Journal of Orthodontics*, 19(5):27-30. doi: 10.1590/2176-9451.19.5.027-030.ebo
- Charan, J., Mulla, S., Ryavanki, S., y Kantharia, N. (2012). New Delhi Metallo -- beta lactamase -- 1 containing Enterobacteriaceae: Origin, Diagnosis, Treatment and Public health concern. *Pan African Medical Journal*, 11 (22), 1–7.
- Chinchilla, A., Tomas, B. y Morales, R. (2013). *Detección de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC-2 en enterobacterias BLEE+: evaluación fenotípica con confirmación genotípica*. [Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Repositorio del Sistema Bibliotecario de la Universidad de San Carlos de Guatemala <https://biblioteca.medicina.usac.edu.gt/tesis/pre/2013/013.pdf>
- Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D., y Horng, H. (2019). Global Contributors to Antibiotic Resistance. *Journal of global infectious diseases*, 11(1), 36–42. doi: 10.4103/jgid.jgid_110_18
- CHROMagar. (2022). *CHROMagar mSuperCARBA Instructions for Use NT-EXT-089 Version 7.0*. <https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-mSuperCARBA/#documents-techniques>
- Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., y Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*, 2(9), e398–e405. doi:10.1016/s2542-5196(18)30186-4
- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical sciences*, 6(1), 1. doi: 10.3390/medsci6010001
- Dashtbani-Roozbehani, A., y Brown, M. H. (2021). Efflux Pump Mediated Antimicrobial Resistance by Staphylococci in Health-Related Environments: Challenges and the Quest for Inhibition. *Antibiotics*, 10(12), 1502. doi: 10.3390/antibiotics10121502
- De Man, T. J. B., Yaffee, A. Q., Zhu, W., Batra, D., Alyanak, E., Rowe, L. A., ... y Limbago, B. M. (2020). Multispecies Outbreak of Verona Integron-Encoded Metallo-β-Lactamase-Producing Multidrugresistant Bacteria Driven by a Promiscuous Incompatibility Group A/C2. *Clinical Infectious Diseases*, 72(3), 414-420. doi:10.1093/cid/ciaa049

- Demeke, T., y Jenkins, G. R. (2009). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 1977–1990. doi: 10.1007/s00216-009-3150-9
- del Carmen, A. D., y Aranaga, C. A. (2015). Resistencia a los antibióticos beta-lactámicos Carbapenems mediada por el gen *blaKPC* en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(2), 109–118. doi: 10.22490/21456453.1409
- Diene, S. M., y Rolain, J.-M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 831–838. doi: 10.1111/1469-0691.12655
- Dos Santos, S., Mereghetti, L., y Van Der Meet-Marquet, N. (2017). *Amélioration de la détection des Entérobactéries Productrices de Carbapénémase (EPC)*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse.
- El-Gamal, M. I., Brahim, I., Hisham, N., Aladdin, R., Mohammed, H., & Bahaaeldin, A. (2017). Recent updates of carbapenem antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 131, 185–195. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.022
- Elshamy, A. A., y Aboshanab, K. M. (2020). A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future science OA*, 6(3), FSO438. doi: 10.2144/fsoa-2019-0098
- Emira, A. S., El-Fattah Madkour, L. A., Seif, N. E., y Dwedar, R. A. (2020). Expressed and Silent Carbapenemase Genes Detected by Multiplex PCR in both Carbapenem-Resistant and Phenotypically-Susceptible Gram Negative Bacilli. *Alexandria Journal of Medicine*, 56(1), 181-188, doi: 10.1080/20905068.2020.1838749
- Fernandes, R., Amador, P., y Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7–17. doi:10.1097/mrm.0b013e3283587727
- García-Fernández, S., Hernández-García, M., Valverde, A., Ruiz-Garbajosa, P., Morosini, M. I., y Cantón, R. (2017). CHROMagar mSuperCARBA performance in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates characterized at molecular level and routine surveillance rectal swab specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(3), 207–209. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.014

- Garcia-Quintanilla, M., Poirel, L., y Nordmann, P. (2018). CHROMagar mSuperCARBA and RAPIDEC® Carba NP test for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(2), 77–80. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.
- Garrido, M. (2014). *Determinación de carbapenemasas en aislamientos de escherichia coli y klebsiella sp. aisladas en el hospital General San Juan de Dios*. [Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Repositorio del Sistema Bibliotecario de la Universidad de San Carlos de Guatemala. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/2121/>
- Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H., y Malhotra-Kumar, S. (2012). Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1140–1146. doi:10.1128/jcm.06852-11
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., y Stokes, H. W. (2008). The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 190(14), 5095–5100. doi: 10.1128/JB.00152-08
- Guerra Carías, E., Valenzuela Acevedo, L. y Velásquez Porta, T. (2020). Caracterización de carbapenemasas en enterobacterias de muestras de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala durante 2014 y 2015. *Revista Científica Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 29(2), 63–73. doi: 10.54495/rev.cientifica.v29i2.34
- Halat, D. H., Sarkis, D. K., y Moubareck, C. A. (2016). Carbapenem-Resistant, Gram-Negative Bacilli. *Antibiotic Resistance*, 93–119. doi: 10.1016/b978-0-12-803642-6.00005-8
- Haji, S. H., Aka, S. T. H., y Ali, F. A. (2021). Prevalence and characterisation of carbapenemase encoding genes in multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *PloS one*, 16(11), e0259005. doi: 10.1371/journal.pone.0259005
- Hammoudi, D., Ayoub Moubareck, C., y Karam Sarkis, D. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 106–118. doi: 10.1016/j.mimet.2014.09.009

- Hrabák, J., Walková, R., Studentová, V., Chudácková, E., y Bergerová, T. (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 49(9), 3222–3227. doi: 10.1128/JCM.00984-11
- Hussaini, I., Suleiman, A., Olonitola, O., y Oyi, R. (2023). Phenotypic and molecular detection of carbapenemase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbes and Infectious Diseases*, 4(1), 151-159. doi: 10.21608/mid.2022.124181.1251
- Hussein, K., Geffen, Y., Eluk, O., Warman, S., Aboalheja, W., Alon, T., Firan, I., y Paul, M. (2022). The Changing Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacterales. *Rambam Maimonides medical journal*, 13(1), e0004. doi: 10.5041/RMMJ.10461
- Hutchings, M., Truman, A., y Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008
- Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–182. doi: 10.1128/CMR.00036-08
- Jacoby, G. y Bush, K. (2005). *β-Lactam Resistance in the 21st Century*. En D. G. White, M. N. Aleksun, y P. F. McDermont (Eds.), *Frontiers in Antimicrobial Resistance: a Tribute to Stuart B. Levy* (pp. 53-65). ASM Press. doi: 10.1128/9781555817572.ch5
- Jalali, M., Zaborowska, J., y Jalali, M. (2017). The Polymerase Chain Reaction. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 1–18. doi: 10.1016/b978-0-12-803077-6.00001-1
- Karaiskos, I., Galani, I., Papoutsaki, V., Galani, L., y Giamarellou, H. (2021). Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*: implication on future therapeutic strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 1–17. doi: 10.1080/14787210.2021.1935237
- Khan, A.U., Maryam, L. y Zarrilli, R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*, 17, 101. doi: 10.1186/s12866-017-1012-8
- Kia, E., Wagner Mackenzie, B., Middleton, D., Lau, A., Waite, D. W., Lewis, G., Chan, Y. K., Silvestre, M., Cooper, G. J., Poppitt, S. D., y Taylor, M. W. (2016). Integrity of the Human Faecal Microbiota

- following Long-Term Sample Storage. *PloS one*, 11(10), e0163666. doi: 10.1371/journal.pone.0163666
- Kohler, P., Tijet, N., Kim, H.C, ..., Melano, R. (2020). Dissemination of Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase among clinical and environmental Enterobacteriaceae isolates in Ontario, Canada. *Scientific Reports*, 10, 18580. doi: 10.1038/s41598-020-75247-7
- Kopotsa, K., Osei Sekyere, J., y Mbelle, N. M. (2019). Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi: 10.1111/nyas.14223
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En E. Stackebrandt y M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115-175). John Wiley & Sons.
- Laxminarayan, R., y Heymann, D. L. (2012). Challenges of drug resistance in the developing world. *British Medical Journal*, 344, e1567–e1567. doi:10.1136/bmj.e1567
- Lee, M., Leslie, D., y Squirrell, D. (2009). Internal and External Controls for Reagent Validation. En J. Logan, K. Edwards, N. Saunders (Eds.), *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press.
- Lima, L. M., Monteiro da Silva, B. N., Barbosa, G., y Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829
- Linciano, P., Cendron, L., Gianquinto, E., Spyrakis, F., y Tondi, D. (2018). Ten years with NDM-1 metallo β -lactamase: from structural insights to inhibitor design. *ACS Infectious Diseases*. doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00247
- Logan, L. K., y Weinstein, R. A. (2017). The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl_1), S28–S36. doi: 10.1093/infdis/jiw282
- Lund, M., Petersen, M. B., Jørgensen, A. L., Paulmann, D., y Wang, M. (2018). Rapid real-time PCR for the detection of IMP, NDM, VIM, KPC and OXA-48 carbapenemase genes in isolates and spiked stool

- samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 92(1), 8–12. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.002
- Lutgring, J. D., y Limbago, B. M. (2016). The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 529–534. doi:10.1128/jcm.02771-15
- Matsumura, Y., Peirano, G., Devinney, R., Bradford, P. A., ..., y Pitout, J. D. D. (2017a). Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(8), 2249–2258. doi: 10.1093/jac/dkx148
- Matsumura, Y., Peirano, G., Motyl, M. R., Adams, M. D., Chen, L., Kreiswirth, B., DeVinney, R., y Pitout, J. D. (2017b). Global Molecular Epidemiology of IMP-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(4), e02729-16. doi: 10.1128/AAC.02729-16
- McOrist, A. L., Jackson, M., y Bird, A. R. (2002). A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 50(2), 131–139. doi: 10.1016/s0167-7012(02)00018-0
- Meletis, G., Chatzidimitriou, D., y Malisiovas, N. (2015). Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(8), 1487–1493. doi: 10.1007/s10096-015-2379-9
- Mohr, K. I. (2016). *History of Antibiotics Research. How to Overcome the Antibiotic Crisis*, 237–272. doi: 10.1007/82_2016_499
- Moldovan, E. y Moldovan, V. (2020). Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques. *Acta Marisiensis - Seria Medica*, 66(3), 79-82. doi: 10.2478/amma-2020-0025
- Monaghan, T. F., Rahman, S. N., Agudelo, C. W., Wein, A. J., Lazar, J. M., Everaert, K., y Dmochowski, R. R. (2021). Foundational Statistical Principles in Medical Research: Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, and Negative Predictive Value. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(5), 503. doi: 10.3390/medicina57050503

- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Verkis, A., Petry, K., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., y Mégraud, F. (1997). Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 995-998.
- MSPAS. (2021). *Circular Jefatura No. TLGG-27-2021. Actualización de alerta por aparecimiento de aislamientos productores de carbapenemasas oxa-48 like*. <http://portal.ins.gob.gt/media/attachments/2021/09/14/circular-no.-27-alerta-cabapenemasa-oxa-48-like.pdf>
- MSPAS. (2022). *Circular Jefatura No. TLGG-27-2022. Actualización alerta epidemiológica por emergencia de bacterias productoras de carbapenemasas de tipo IMP1, VIM, y de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Guatemala*. http://portal.ins.gob.gt/media/attachments/2023/03/15/301710500_1114955219106005_84232902_94309879302_n.pdf
- MSPAS. (2023). Circular No. TLGG-001-2023. *Alerta epidemiológica por Pseudomonas aeruginosa triple productora de carbapenemasas*. <http://portal.ins.gob.gt/media/attachments/2023/03/15/alerta-epid-pseudomonas-cir-no.001-23.pdf>
- Nemeth, J., Oesch, G., y Kuster, S. P. (2014). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 382–395. doi: 10.1093/jac/dku379
- Nordmann, P., Poirel, L., y Dortet, L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, 18(9), 1503–1507. Doi: 10.3201/eid1809.120355
- O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of the nations*. Review on Antimicrobial Resistance. https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
- Opal, S., y Pop-Vicas, A. (2015). *Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria*. En J. E. Bennett, R. Dolin, M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 235–251). doi: 10.1016/b978-1-4557-4801-3.00018-7

- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Antimicrobial resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Osei Sekyere, J., Govinden, U., y Essack, S. Y. (2015). Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5), 1219–1233. doi:10.1111/jam.12918
- Oteo, J., Miró, E., Pérez-Vázquez, M., y Navarro, F. (2014). Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 17–23. doi:10.1016/s0213-005x(14)70170-3
- Palacios, A. R., Rossi, M.-A., Mahler, G. S., y Vila, A. J. (2020). Metallo- β -Lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism. *Biomolecules*, 10(6), 854. Doi: 10.3390/biom10060854
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., y Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. Doi: 10.1128/AAC.00296-11
- Paterson, D. L., y Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K.-A., y Matsumura, Y. (2019). The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). doi:10.1128/cmr.00102-19
- Poirel, L., Potron, A., y Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1597–1606. doi:10.1093/jac/dks121
- Pongchaikul, P., y Mongkolsuk, P. (2022). Comprehensive Analysis of Imipenemase (IMP)-Type Metallo- β -Lactamase: A Global Distribution Threatening Asia. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 236. Doi: 10.3390/antibiotics11020236

- Probst, K., Nurjadi, D., Heeg, K., Frede, A. M., Dalpke, A. H., y Boutin, S. (2021). Molecular Detection of Carbapenemases in Enterobacterales: A Comparison of Real-Time Multiplex PCR and Whole-Genome Sequencing. *Antibiotics*, 10(6), 726. doi: 10.3390/antibiotics10060726
- Qiagen. (2020). *QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit Handbook*. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8896817a-253f-4952-b845-0aab796813ce&lang=en>
- Queenan, A. M., y Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440–458. Doi: 10.1128/CMR.00001-07
- Ramay, B. M., Castillo, C, Grajeda, L., ..., Call, D. (2023). Colonization with antibiotic-resistant bacteria in a hospital and associated communities in Guatemala: An Antibiotic Resistance in Communities and Hospitals (ARCH) Study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 77(Suppl 1), S82–S88. doi: 10.1093/cid/ciad222
- Reygaert W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482
- Roperch, J.P., Benzekri, K., Mansour, H. y Incitti, R. (2015). Improved amplification efficiency on stool samples by addition of spermidine and its use for non-invasive detection of colorectal cancer. *BMC Biotechnol* 15, 41. doi: 10.1186/s12896-015-0148-6
- Rosales Hidalgo, J. y Velásquez Porta, T. (2018). *Determinación de genes blaIMP-1 Y BLA_{vim-1} en cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos aisladas de pacientes con infección adquirida en la comunidad de la ciudad de Guatemala*. [Tesis Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas, Universidad de San Carlos de Guatemala. Repositorio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/library/index.php?title=12399&query=@title=Special:GSMSearchPage@process=@autor=VELASQUEZ,%20T.%20@mode=&recnum=43>
- Sacha, P., Ostas, A., Jaworowska, J., Wiczorek, P., Ojdana, D., Ratajczak, J., y Tryniszewska, E. (2009). The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47(4), 537-543. Doi: 10.2478/v10042-009-0079-y

- Sachadyn, P., y Kur, J. (1998). The construction and use of a PCR internal control. *Molecular and Cellular Probes*, 12(5), 259–262. doi: 10.1006/mcpr.1998.0170
- Safari, S., Baratloo, A., Elfil, M., y Negida, A. (2015). Evidence Based Emergency Medicine Part 2: Positive and negative predictive values of diagnostic tests. *Emergency (Tehran, Iran)*, 3(3), 87–88.
- Samuel, J., Flores, W. y Frisancho, A. (2020). Social exclusion and universal health coverage: health care rights and citizen-led accountability in Guatemala and Peru. *Int J Equity Health*, 19, 216. doi: 10.1186/s12939-020-01308-y
- Sawa, T., Kooguchi, K. y Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8 (13). Doi: 10.1186/s40560-020-0429-6
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Serra-Burriel, M., Keys, M., Campillo-Artero, C., Agodi, A., ..., y López-Casasnovas, G. (2020). Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 15(1), e0227139. doi: 10.1371/journal.pone.0227139
- Servicio Antimicrobianos. (2019). *Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes blaKPC, blaOXA-48-like, blaVIM, blaIMP y blaNDM en bacilos gram negativos*. <http://antimicrobianos.com.ar/2019/?cat=52>
- Shreffler, J., y Huecker, M. (2023). *Diagnostic Testing Accuracy: Sensitivity, Specificity, Predictive Values and Likelihood Ratios*. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557491/>
- Singh, K. P., Miaskowski, C., Dhruva, A. A., Flowers, E., y Kober, K. M. (2018). Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biological research for nursing*, 20(4), 369–382. doi: 10.1177/1099800418772161
- Soria Segarra, C., Larrea Vera, G., Berrezueta Jara, M., Arévalo Mendez, M., Cujilema, P., Serrano Lino, M., y Soria Segarra, C. (2018). Utility of CHROMagar mSuperCARBA for surveillance cultures of

- carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *New Microbes and New Infections*, 26, 42–48. doi: 10.1016/j.nmni.2018.08.005
- Srirungruang, S., Mahajindawong, B., Nimitpanya, P., Bunkasem, U., Ayuyoe, P., Nuchprayoon, S., y Sanprasert, V. (2022). Comparative Study of DNA Extraction Methods for the PCR Detection of Intestinal Parasites in Human Stool Samples. *Diagnostics*, 12(11), 2588. doi: 10.3390/diagnostics12112588
- Swift, A., Heale, R., y Twycross, A. (2019). What are sensitivity and specificity? *Evidence Based Nursing*, ebnurs–2019–103225. doi: 10.1136/ebnurs-2019-103225
- Tamma, P. D., y Simner, P. J. (2018). Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *Journal of clinical microbiology*, 56(11), e01140-18. Doi: 10.1128/JCM.01140-18
- Thermo Scientific. (2012). Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. T123 – TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Lite. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
- Thomson, K. S. (2010). Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1019–1025. doi:10.1128/jcm.00219-10
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., y Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472-3500. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002
- Trevethan, R. (2017). Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Frontiers in Public Health*, 5. doi:10.3389/fpubh.2017.00307
- Vandeputte, D., Tito, R. Y., Vanleeuwen, R., Falony, G., & Raes, J. (2017). Practical considerations for large-scale gut microbiome studies. *FEMS microbiology reviews*, 41(1), S154–S167. doi: 10.1093/femsre/fux027
- van Duin, D., y Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*, 8(4), 460–469. doi: 10.1080/21505594.2016.1222343

- Velásquez Porta, T. y Lau Bonilla, D. (2017). Detection of carbapenemases genes *blaKPC* and *blaNDM* in *Klebsiella pneumoniae* isolates from the San Juan de Dios General Hospital at Guatemala City, Guatemala. *Revista Científica Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas*, 26(2).
- Waksman, S. A. (1947). What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*, 39(5), 565. doi: 10.2307/3755196
- Walther-Rasmussen, J., y Høiby, N. (2007). Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 470–482. doi: 10.1093/jac/dkm226
- Yelin, I., y Kishony, R. (2018). Antibiotic Resistance. *Cell*, 172(5), 1136–1136.e1. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.018
- Zhou, M., Wang, D., Kudinha, T., Yang, Q., Yu, S., y Xu, Y. C. (2018). Comparative Evaluation of Four Phenotypic Methods for Detection of Class A and B Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in China. *Journal of clinical microbiology*, 56(8), e00395-18. doi: 10.1128/JCM.00395-18
- Zmarlicka, M., Nailor M., y Nicolau, D. (2015). Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics. *Infection and Drug Resistance*, 8, 297-309, doi: 10.2147/IDR.S39186

XII. ANEXOS

Anexo I:

POE I: Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces humanas

Procedimiento Operativo Estandarizado	POE I
	Páginas totales: 6
Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces humanas	Autores: Laura Yantuche

1. Propósito

El documento describe el procedimiento para extraer y aislar ADN genómico microbiano a partir de muestras de heces utilizando el kit QIAamp PowerFecal Pro. Este kit permite la lisis celular por métodos mecánicos y químicos para extraer ADN genómico. El ADN se captura en una membrana de sílice en una columna giratoria y luego se lava y eluye para aplicaciones posteriores.

2. Aplicación

El kit QIAamp PowerFecal Pro se utiliza para el aislamiento de ADN genómico microbiano a partir de muestras de heces para aplicaciones como amplificación por PCR. La aplicación de este procedimiento es eficaz para eliminar inhibidores de PCR.

3. Referencias

- 3.1. Qiagen. (2020). *QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit Handbook*. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8896817a-253f-4952-b845-0aab796813ce&lang=en>

4. Terminología

- 4.1. ADN: Ácido desoxirribonucleico que almacena información genética.
- 4.2. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

5. Documentos asociados

Qiagen. (2020). QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit Handbook.

6. Seguridad

6.1. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.1.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.1.2. Mantener la puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.1.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.1.4. Evitar la formación de salpicaduras y aerosoles.
- 6.1.5. Descontaminar superficies de trabajo antes y después de uso, y en caso de cualquier derrame.
- 6.1.6. Colocar los desechos del laboratorio en bolsa roja.
- 6.1.7. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de nitrilo sin polvo)

6.2. Precaución con el uso de reactivos

- 6.2.1. Las soluciones EA y C5 son inflamables
- 6.2.2. No se debe agregar cloro o soluciones ácidas directamente a los desechos de la preparación de muestras

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Micropipetas de 200 µL y 1000 µL
- 7.1.2. Vórtex
- 7.1.3. Microcentrífuga

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Puntas para micropipetas de 200 µL y 1000 µL
- 7.2.2. Tubos PowerBead Pro
- 7.2.3. Columnas de centrifugado MB
- 7.2.4. Tubos de 2 ml para microcentrífuga
- 7.2.5. Tubos de elución 1.5 mL
- 7.2.6. Tubos de recolección 2 mL

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Solución CD1
- 7.3.2. Solución CD2
- 7.3.3. Solución CD3
- 7.3.4. Solución EA
- 7.3.5. Solución C5
- 7.3.6. Solución C6

7.4. Material biológico

- 7.4.1. Muestras de heces

8. Procedimiento

- 8.1. Calentar las muestras a 80-100 °C durante 10 minutos antes de iniciar la extracción de ADN.
- 8.2. Girar el tubo PowerBead Pro brevemente para asegurar que las perlas se hayan asentado en el fondo. Añadir hasta 250 mg (o 400 µL) de heces y 800 µl de Solución CD1. Agitar en vórtex brevemente para mezclar.
- 8.3. Fijar el tubo PowerBead Pro de forma horizontal en un adaptador para vórtex para tubos de 1.5 a 2 mL. Agitar en vórtex a máxima velocidad durante 10 min.
 - 8.3.1. Si se utiliza el adaptador para vórtex para más de 12 preparaciones simultáneamente se debe aumentar el tiempo de agitación entre 5 y 10 min.
- 8.4. Centrifugar el tubo PowerBead Pro a 15000 x g durante 1 min.
- 8.5. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 mL.
 - 8.5.1. Se esperan entre 500–600 µl de sobrenadante. Este aún puede contener algunas partículas de heces.
- 8.6. Agregar 200 µl de Solución CD2 y agitar en vórtex durante 5 s.
- 8.7. Centrifugar a 15000 x g durante 1 min. Evitando el sedimento, transferir hasta 700 µl de sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 mL.
 - 8.7.1. Se esperan 500–600 µl de sobrenadante.
- 8.8. Agregar 600 µl de Solución CD3 y agitar en vórtex durante 5 s.
- 8.9. Agregar 650 µl del lisado en una columna de centrifugado MB y centrifugar a 15000 x g durante 1 min.
- 8.10. Desechar el flujo continuo y repetir el paso 8.8 para asegurar que todo el lisado haya pasado a través de la columna de centrifugado MB.

- 8.11. Colocar con cuidado la columna de centrifugado MB en un tubo de recolección limpio de 2 ml.
Evitar salpicar cualquier flujo en la columna de centrifugado MB.
- 8.12. Agregar 500 µl de solución EA a la columna de centrifugado MB. Centrifugar a 15000 x g durante 1 min.
- 8.13. Desechar el flujo continuo y volver a colocar la columna de centrifugado MB en el mismo tubo de recolección de 2 ml.
- 8.14. Agregar 500 µl de solución C5 a la columna de centrifugado MB. Centrifugar a 15000 x g durante 1 min.
- 8.15. Desechar el flujo continuo y colocar la columna de centrifugado MB en un nuevo tubo de recolección de 2 ml.
- 8.16. Centrifugar hasta 16000 x g durante 2 min. Colocar con cuidado la columna de centrifugado MB en un tubo de elución nuevo de 1.5 ml.
- 8.16.1. Para evitar esto residuos de la solución C5 en la muestra final se debe evitar transferir el líquido al fondo del filtro de la columna de centrifugado MB.
- 8.17. Agregar 50–100 µl de Solución C6 al centro de la membrana del filtro blanco.
- 8.18. Centrifugar a 15000 x g durante 1 min. Desechar la columna de centrifugado MB. El volumen final de ADN eluido será de 50 a 100 µl.
- 8.19. Almacenar el ADN en un congelador (–30 °C a –15 °C o –90 °C a –65 °C) hasta su uso. Se debe congelar ya que la Solución C6 no contiene EDTA.

9. Esterilización de material

No aplica

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

- 11.1. Determinar la concentración de ADN por medio de espectrofotometría UV-Visible para confirmar la presencia de ácidos nucleicos en el extracto.

12. Resolución de problemas

12.1. Procesamiento de muestras de heces

- 12.1.1. Si la muestra presenta alto contenido de agua previo a iniciar el procedimiento:

- 12.1.1.1. Extraer las perlas del tubo PowerBead Pro y transferirlas a otro tubo de microcentrífuga estéril.
- 12.1.1.2. Agregar la muestra de heces al tubo PowerBead Pro y centrifugar a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 30 segundos a 10000 x g.
- 12.1.1.3. Retirar la mayor cantidad de líquido posible con una punta de pipeta.
- 12.1.1.4. Volver a agregar perlas al tubo PowerBead Pro y reanudar el protocolo desde el paso 8.2.

12.2. Procesamiento de ADN

12.2.1. Si el ADN no amplifica:

- 12.2.1.1. Verificar los rendimientos de ADN mediante electroforesis en gel o lectura de espectrofotómetro. Una cantidad excesiva de ADN inhibirá una reacción de PCR.
- 12.2.1.2. No debería ser necesario diluir el ADN molde con el ADN aislado con el kit de ADN QIAamp PowerFecal Pro. Sin embargo, debe intentarse si se obtiene una cantidad excesiva de ADN.
- 12.2.1.3. Si el ADN aún no se amplifica después de probar los pasos anteriores, es posible que se necesite una optimización de PCR.

12.2.2. Si el ADN eluido es de color café:

- 12.2.2.1. Contactar a servicio técnico de Qiagen

12.2.3. Para aumentar la concentración de ADN:

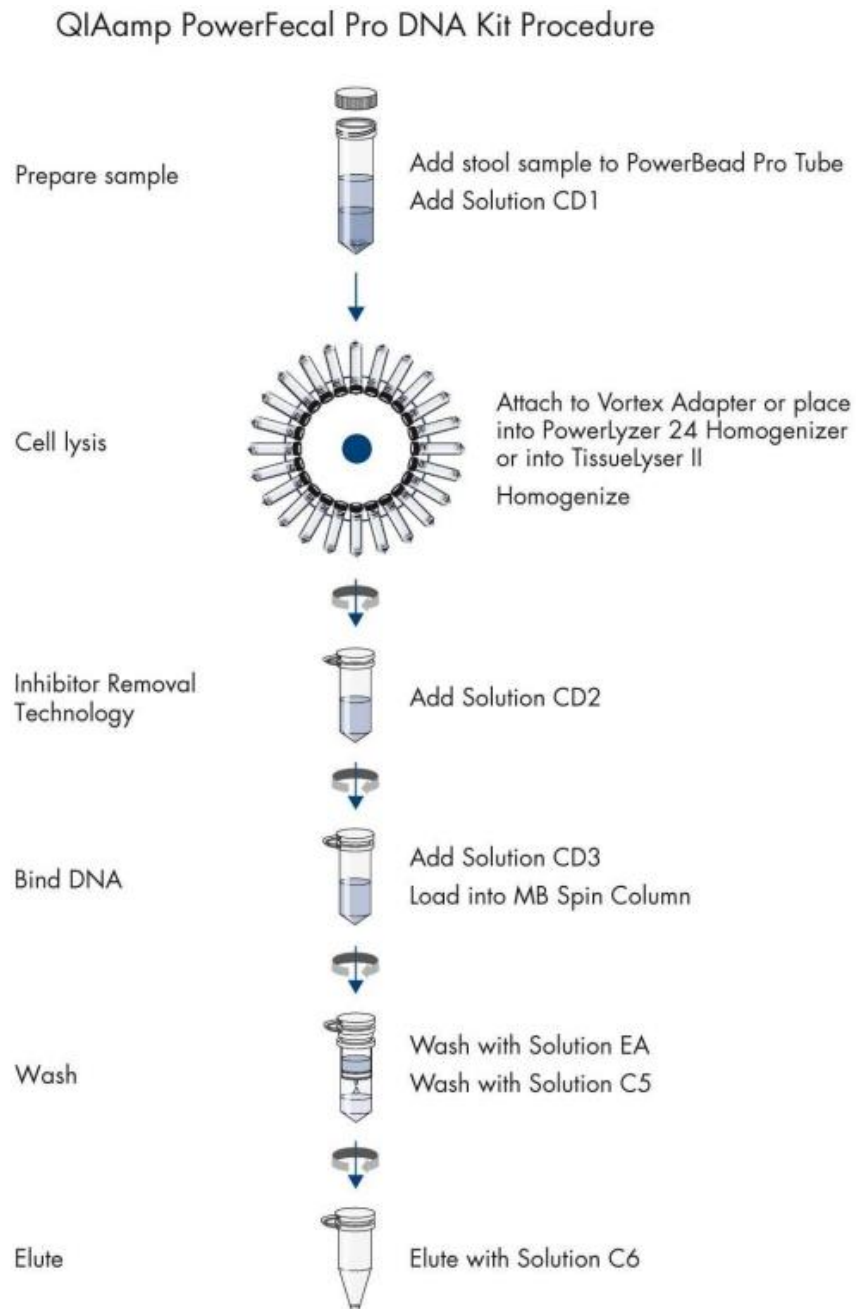
- 12.2.3.1. Agregar 5–10 µl de NaCl 3 M e invirtiendo 3–5 veces para mezclar.
- 12.2.3.2. Agregar 100 µl de etanol frío al 100 % e invertir de 3 a 5 veces para mezclar.
- 12.2.3.3. Incubar a –30 °C a –15 °C durante 30 minutos y centrifugar a 10000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 12.2.3.4. Decantar todo el líquido.
- 12.2.3.5. Secar brevemente el etanol residual al aire ambiente. Se debe evitar secar demasiado el sedimento para facilitar la resuspensión.
- 12.2.3.6. Volver a suspender el ADN precipitado en el volumen deseado de Tris 10 mM (Solución C6).

12.2.4. Si el ADN flota al cargarlo en el gel de agarosa para electroforesis:

- 12.2.4.1. Esto puede ocurrir cuando la solución C5 residual permanece en la muestra final. La precipitación con etanol detallada en 12.2.3 es la mejor forma de eliminar la Solución C5 residual.

13. Anexos

Figura 1. Procedimiento para extracción de ADN con QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit



Fuente: Qiagen (2020)

Anexo II:

POE II: Detección de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}* por PCR múltiple

Procedimiento Operativo Estandarizado	POE II
	Páginas totales: 5
Detección de los genes <i>bla_{KPC}</i>, <i>bla_{OXA-48-like}</i>, <i>bla_{VIM}</i>, <i>bla_{IMP}</i> y <i>bla_{NDM}</i> por PCR múltiple	Autores: Laura Yantuche

1. Propósito

El documento describe el procedimiento para detectar, por medio de PCR múltiple, la presencia de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}* que codifican carbapenemasas asociadas a la resistencia a antibióticos en bacterias, específicamente a los carbapenémicos

2. Aplicación

La PCR múltiple permite la amplificación de múltiples genes en la misma reacción. En este caso, permite la identificación de bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos presentes en muestras de heces humanas a través de la amplificación de los genes que codifican a las enzimas carbapenemasas que proporcionan esta resistencia. Los genes que permite identificar esta PCR múltiple son *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}*.

3. Referencias

- 3.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*. https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012702_DreamTaq_K1071_UG.pdf
- 3.2 Servicio Antimicrobianos. (2019). *Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}* en bacilos gram negativos*. <http://antimicrobianos.com.ar/2019/?cat=52>

4. Terminología

- 4.1 ADN: Ácido desoxirribonucleico
- 4.2 *bla_{KPC}*: Gen que codifica a las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*

- 4.3 *bla*_{OXA-48}-like: Gen que codifica a la β -lactamasa hidrolizante de oxacilina 48 y sus variantes
- 4.4 *bla*_{VIM}: Gen que codifica a las metalo- β -lactamasas de Verona codificadas por integrón
- 4.5 *bla*_{IMP}: Gen que codifica a las imipenemasas
- 4.6 *bla*_{NDM}: Gen que codifica las metalo- β -lactamasas de Nueva Delhi
- 4.7 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

5. Documentos asociados

- 5.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*.
- 5.2 POE I: Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces humanas

6. Seguridad

6.1 Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.1.1 Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.1.2 Mantener la puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.1.3 Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.1.4 Evitar la formación de salpicaduras y aerosoles.
- 6.1.5 Descontaminar superficies de trabajo antes y después de uso, y en caso de cualquier derrame.
- 6.1.6 Colocar los desechos del laboratorio en bolsa roja.
- 6.1.7 Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de nitrilo sin polvo).
- 6.1.8 Realizar el procedimiento dentro de una campana de flujo laminar.

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1 Equipo

- 7.1.1 Micropipetas de 10 y 200 μ L
- 7.1.2 Termociclador
- 7.1.3 Cámara de electrophoresis
- 7.1.4 Transiluminador UV

7.2 Materiales/ Cristalería

- 7.2.1 Puntas para micropipetas de 10 y 200 μ L
- 7.2.2 Tubos para PCR de 0.2 mL
- 7.2.3 Tubos de microcentrífuga 1.5 mL

7.2.4 Hielo

7.3 Reactivos

7.3.1 DreamTaq™ PCR Master Mix (2X)

7.3.2 Cebadores:

7.3.2.1 VIMF (5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3') (10 μM)

7.3.2.2 VIMR (5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3') (10 μM)

7.3.2.3 IMP-UF1 (5'-GGYGTWTGTTTCATACWTCKTTYGA-3') (10 μM)

7.3.2.4 IMP-UR1 (5'-GGYARCCAAACCACTASGTTATCT-3') (10 μM)

7.3.2.5 NDM-F (5'-AGCACACTTCCTATCTCGAC-3') (10 μM)

7.3.2.6 NDM-R (5'-GGCGTAGTGCTCAGTGTC-3') (10 μM)

7.3.2.7 KPC-F (5'-AACAAGGAATATCGTTGATG-3') (10 μM)

7.3.2.8 KPC-R (5'-AGATGATTTTCAGAGCCTTA-3') (10 μM)

7.3.2.9 OXA48-F (5'-ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG-3') (10 μM)

7.3.2.10 OXA48R2 (5'-TGAGCACTTCTTTTGTGATG-3') (10 μM)

7.3.3 Agarosa

7.3.4 Buffer TBE 1X

7.3.5 DNA Loading Dye 6X

7.3.6 Colorante de ADN

7.3.7 Estándar de peso molecular de ADN 1 kb

7.3.8 Agua libre de nucleasas

7.4 Material biológico

7.4.1 Extracto de ADN

8 Procedimiento

8.1 Preparar en hielo el máster mix en un tubo de 1.5 mL según la cantidad de reacciones necesarias para un volumen final de 50 μL por reacción (Cuadro 1). Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de utilizarlo.

Cuadro 1. Máster mix para PCR múltiplex de 15 µL por reacción

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
DreamTaq™ PCR Master Mix	2X	1X	7.5
Cebador VIMF	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador VIMR	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador NDM-F	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador NDM-R	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador OXA48F	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador OXA48R	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador KPC-F	10 µM	0.4 µM	0.6
Cebador KPC-R	10 µM	0.4 µM	0.6
Cebador IMP-UF1	10 µM	0.48 µM	0.72
Cebador IMP-UR1	10 µM	0.48 µM	0.72
Agua libre de nucleasas	NA	NA	1.56
ADN muestra	NA	NA	1.5

- 8.2 En tubos para PCR de 0.2 mL, para cada muestra agregar 13.5 µL de máster mix y 1.5 µL de ADN.
- 8.3 Como control negativo dejar un tubo con 13.5 µL de máster mix sin ADN de muestra.
- 8.4 Colocar los tubos con las muestras y máster mix en el termociclador y correr el programa para la PCR múltiple (Cuadro 2).

Cuadro 2. Programa de ciclado para PCR múltiple

Paso	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Amplificación			
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	35
Annealing	57 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	60 segundos	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1
Hold	10 °C	Indefinido	

- 8.5 Preparar gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X y colorante de ADN. Colocarlo en la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X.
- 8.6 Cargar 3 µL de estándar de peso molecular de ADN 1 kb en el gel.
- 8.7 Mezclar 5 µL de cada producto de PCR con 1 µL de loading dye y cargar en el gel.
- 8.8 Correr la electroforesis a 100 V por 30 minutos.

9 Esterilización de material

No aplica

10 Cálculos

Cálculo 1. Volumen de reactivos según el número de reacciones

$$\text{Volumen de reacción} * x = \text{Volumen total para } x \text{ reacciones}$$

En donde:

x = número de reacciones requeridas

11 Control de calidad

- 11.1 Se esperan productos de amplificación de 261 pb para *blaVIM*, 404 pb para *blaIMP*, 512 pb para *blaNDM*, y 916 pb para *blaKPC*.
- 11.2 Para los genes *blaOXA-48-like* se espera una banda de 763 pb para *blaOXA-163*. Este gen tiene una deleción de 12 nucleótidos respecto a *blaOXA-48* dentro de la región amplificada, Por lo tanto, se espera un producto de amplificación de 775 pb para el gen *blaOXA-48*.
- 11.3 No se debe observar un producto de amplificación en el control negativo.

12 Resolución de problemas

- 12.1 En caso de bajo rendimiento o rendimiento nulo de la amplificación por PCR se puede:
 - 12.1.1 Reducir el volumen de ADN de las muestras o diluirlo antes de agregarlo al *máster mix* con el fin de minimizar el efecto de inhibidores de la amplificación que pueden resultar del aislamiento de ADN. Para mejorar los resultados, las muestras se pueden diluir hasta 1:10,000 dependiendo de la concentración inicial.
 - 12.1.2 Incluir un paso adicional de precipitación y lavado con etanol antes de la amplificación para eliminar inhibidores que se pueden copurificar con el ADN y aumentar la pureza del ADN.
 - 12.1.3 Agregar agentes potenciadores de la PCR como DMSO o betaína
 - 12.1.4 Agregar estabilizadores generales como BSA al 0.16 mg/mL
 - 12.1.5 Ver 12.2 de POE I: Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces humanas.

Anexo III:

POE III: Amplificación del gen 16s rRNA por PCR

Procedimiento Operativo Estandarizado	POE III
	Páginas totales: 4
Amplificación del gen 16s rRNA por PCR	Autores: Laura Yantuche

1. Propósito

El documento describe el procedimiento para la amplificación del gen 16s por medio de PCR como control interno de para descartar falsos negativos en la detección de genes de carbapenemasas por inhibidores de amplificación.

2. Aplicación

La amplificación por PCR del gen 16s rRNA se utilizará como control interno de amplificación en extractos de ADN obtenidos de muestras de heces humanas. Si la amplificación de este gen es exitosa, se puede suponer que la extracción de ADN fue eficiente y no cuenta con inhibidores de amplificación.

3. Referencias

- 3.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*.
https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012702_DreamTaq_K1071_UG.pdf

4. Terminología

- 4.1 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- 4.2 Control interno de amplificación: Procedimiento para confirmar la presencia de ADN amplificable y la ausencia de sustancias inhibitorias de amplificación
- 4.3 Gen 16s rRNA: Gen que codifica el ARN ribosómico de subunidad pequeña de los ribosomas en células procariotas.

5. Documentos asociados

- 5.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*.
- 5.2 POE I: Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces humanas

6. Seguridad

6.1 Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.1.1 Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.1.2 Mantener la puerta cerrada mientras se trabaja
- 6.1.3 Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.1.4 Evitar la formación de salpicaduras y aerosoles.
- 6.1.5 Descontaminar superficies de trabajo antes y después de uso, y en caso de cualquier derrame.
- 6.1.6 Colocar los desechos del laboratorio en bolsa roja.
- 6.1.7 Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de nitrilo sin polvo)
- 6.1.8 Realizar el procedimiento dentro de una campana de flujo laminar.

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1 Equipo

- 7.1.1 Micropipetas de 10 y 200 μ L
- 7.1.2 Termociclador
- 7.1.3 Cámara de electrophoresis
- 7.1.4 Transiluminador UV

7.2 Materiales/ Cristalería

- 7.2.1 Puntas para micropipetas de 10 y 200 μ L
- 7.2.2 Tubos para PCR de 0.2 mL
- 7.2.3 Tubos de microcentrífuga 1.5 mL
- 7.2.4 Hielo

7.3 Reactivos

- 7.3.1 DreamTaq™ PCR Master Mix
- 7.3.2 Cebadores:
- 7.3.3 27F (10 μ M) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- 7.3.4 1492R (10 μ M): 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

- 7.3.5 Agarosa
- 7.3.6 Buffer TBE 1X
- 7.3.7 DNA Loading Dye 6X
- 7.3.8 Colorante de ADN
- 7.3.9 Estándar de peso molecular de ADN 1 kb
- 7.3.10 Agua libre de nucleasas

7.4 Material biológico

- 7.4.1 Extracto de ADN

8 Procedimiento

- 8.1 Preparar en hielo el máster mix en un tubo eppendorf de 1.5 mL según la cantidad de reacciones necesarias para un volumen final de 15 μ L por reacción (Cuadro 1). Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de utilizarlo.

Cuadro 1. Máster mix para PCR de 15 μ L por reacción

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (μ L)
DreamTaq™ PCR Master Mix	2X	1X	7.5
Cebador 27f	10 μ M	1 μ M	1.5
Cebador 1492r	10 μ M	1 μ M	1.5
Agua libre de nucleasas	NA	NA	1.5
ADN muestra	NA	NA	3

- 8.2 En tubos para PCR de 0.2 mL, para cada muestra agregar 12 μ L de máster mix y 3 μ L de ADN.
- 8.3 Como control negativo dejar un tubo con 12 μ L de máster mix sin ADN de muestra.
- 8.4 Colocar los tubos en el termociclador y correr el programa para PCR (Cuadro 2).
- 8.5 Preparar gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X y colorante de ADN. Colocarlo en la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X.
- 8.6 Cargar 3 μ L de estándar de peso molecular de ADN 1 kb en el gel.
- 8.7 Mezclar 5 μ L de cada producto de PCR con 1 μ L de loading dye y cargar en el gel.
- 8.8 Correr la electroforesis a 100 V por 30 minutos.

Cuadro 2. Programa de ciclado para PCR múltiple

Paso	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94 °C	3 minutos	1
Amplificación			
Desnaturalización	94 °C	45 segundos	35
Annealing	57 °C	1 minuto	
Extensión	72 °C	1 min 30 s	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1
Hold	10 °C	Indefinido	

9 Esterilización de material

No aplica

10 Cálculos

Cálculo 1. Volumen de reactivos según el número de reacciones

$$\text{Volumen de reacción} * x = \text{Volumen total para } x \text{ reacciones}$$

En donde:

x = número de reacciones requeridas

11 Control de calidad

11.1 Se espera un producto de amplificación de ~1400 pb.

11.2 El control negativo no debe presentar bandas de amplificación.

12 Resolución de problemas

12.1 En caso de bajo rendimiento o rendimiento nulo de la amplificación por PCR se puede:

- 12.1.1 Reducir el volumen de ADN de las muestras o diluirlo antes de agregarlo al master mix con el fin de minimizar el efecto de inhibidores de la amplificación que pueden resultar del aislamiento de ADN. Para mejorar los resultados, las muestras se pueden diluir hasta 1:10,000 dependiendo de la concentración inicial.
- 12.1.2 Incluir un paso adicional de precipitación y lavado con etanol antes de la amplificación para eliminar inhibidores que se pueden copurificar con el ADN y aumentar la pureza del ADN.
- 12.1.3 Agregar agentes potenciadores de la PCR como DMSO o betaína
- 12.1.4 Agregar estabilizadores generales como BSA al 0.16 mg/mL
- 12.1.5 Ver 12.2 de POE I: Extracción de ADN microbiano a partir de muestras de heces humanas

Anexo IV:

Cuadro 8. Resultados de las muestras de heces positivas según CHROMagar CARBA

Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0002	1	11.3	2.16	-	+
AH-0022	2	5.7	1.96	-	+
AH-0040	3	15.8	1.69	-	+
AH-0048	4	13.7	1.76	NDM + VIM	+
AH-0052	5	5.3	2.32	-	+
AH-0054	6	3.9	2.57	-	+
AH-0060	7	4.6	2.26	-	+
AH-0068	8	25.9	1.87	-	+
AH-0069	9	13.1	1.87	-	+
AH-0076	10	17.1	1.97	NDM	+
AH-0081	11	11.3	2.14	NDM	+
AH-0082	13	5.6	1.91	NDM	+
AH-0083	14	22.7	1.88	NDM	+
AH-0087	15	3.1	1.63	NDM + OXA48-like	+
AH-0090	16	4.1	1.79	NDM	+
AH-0114	17	16.9	1.82	NDM	+
AH-0124	18	10.5	1.86	NDM	+
AH-0125	19	16.5	1.92	NDM	+
AH-0137	20	7.3	1.88	NDM	+
AH-0141	21	3.2	1.98	-	+
AH-0152	22	1.2	1.48	-	+
AH-0153	23	15.5	1.74	-	+
AH-0154	25	9.6	1.82	IMP	+
AH-0178	26	14.7	1.87	IMP	+
AH-0193	27	3.8	2.00	IMP	+
AH-0205	28	3.0	3.23	-	+
AH-0211	29	25.2	1.94	-	+

Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0216	30	8.4	2.45	-	+
AH-0226	31	1.1	2.71	-	+
AH-0232	32	1.3	1.80	-	+
AH-0242	33	2.0	2.30	IMP	+
AH-0245	34	5.1	1.98	IMP	+
AH-0264	35	53.5	1.52	IMP	+
AH-0269	36	18.6	1.64	-	+
AH-0283	37	20.1	1.56	IMP	+
AH-0284	38	12.2	1.73	-	+
AH-0285	39	10.8	1.79	-	+
AH-0309	40	2.4	1.45	-	+
AH-0322	41	56.4	1.51	-	+
AH-0323	42	0.4	1.08	NDM	+
AH-0328	43	3.8	1.41	-	+
AH-0329	44	106.0	1.46	NDM	+
AH-0333	45	30.8	1.57	NDM	+
AH-0334	46	33.7	1.52	-	+
AH-0336	47	2.2	1.58	NDM	+
AH-0339	48	3.8	1.50	NDM	+
AH-0379	49	21.9	1.54	-	+
AH-0381	50	40.4	1.51	-	+
AH-0382	51	10.0	1.66	-	+
AH-0385	52	45.0	1.51	-	+
AH-0390	53	1.6	1.63	NDM	+
AH-0396	54	8.9	1.57	-	+
AH-0400	56	0.9	1.24	-	+
AH-0411	57	4.4	1.64	-	+
AH-0414	58	1.4	1.22	-	+
AH-0417	59	0.0	0.01	NDM	+
AH-0431	60	13.8	1.78	NDM	+

Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0451	61	6.9	1.81	-	+
AH-0455	62	3.7	1.37	-	+
AH-0458	63	22.8	1.47	-	+
AH-0461	64	5.0	1.75	NDM	+
AH-0467	65	15.1	1.57	NDM + IMP	+
AH-0469	66	7.1	1.63	NDM	+
AH-0471	67	2.6	1.62	NDM	+
AH-0475	68	101.9	1.50	NDM	+
AH-0476	69	0.1	-0.31	NDM	+
AH-0478	70	0.2	1.88	-	+
AH-0486	71	2.4	1.89	-	+
AH-0530	72	20.5	1.62	NDM	+
AH-0536	73	3.9	2.43	-	-
AH-0537	74	34.1	1.53	-	+
AH-0539	75	9.0	2.01	NDM	+
AH-0575	76	2.7	2.25	-	-
AH-0577	77	66.5	1.50	-	+
AH-0592	78	0.8	1.98	NDM	+
AH-0595	79	22.8	1.73	NDM	+
AH-0599	80	1.9	2.39	-	+
AH-0612	81	6.3	1.75	NDM	+
AH-0615	82	7.3	1.45	NDM	+
AH-0616	83	9.9	1.70	-	+
AH-0617	84	1.2	2.29	-	+
AH-0625	85	6.4	1.90	NDM	+
AH-0632	87	12.8	1.53	NDM	+
AH-0651	88	5.7	1.66	-	+
AH-0656	89	1.8	1.60	-	+
AH-0660	90	2.2	1.75	-	+
AH-0665	91	2.8	2.40	-	+

Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0704	92	1.4	2.16	NDM	+
AH-0707	93	5.6	1.68	-	+
AH-0709	94	6.5	1.57	-	+
AH-0713	95	3.5	2.15	-	+
AH-0716	96	12.2	1.84	-	+
AH-0752	97	6.7	1.96	NDM	+
AH-0762	98	4.8	1.94	-	+
AH-0770	99	1.5	3.33	NDM	+
AH-0785	100	6.6	1.84	-	+
AH-0794	101	5.2	1.62	-	+

Anexo V:

Cuadro 9. Resultados de las muestras de heces negativas según CHROMagar CARBA

Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0004	103	8.0	1.61	-	+
AH-0006	104	3.1	2.12	-	+
AH-0008	105	-0.5	1.17	-	+
AH-0013	106	1.4	2.17	-	+
AH-0017	107	1.5	1.49	-	+
AH-0018	108	1.2	2.38	-	+
AH-0019	109	0.3	26.52	NDM	+
AH-0020	110	5.2	1.89	-	+
AH-0021	111	0.6	0.97	-	+
AH-0025	112	1.3	2.08	-	+
AH-0026	113	0.9	1.02	-	+
AH-0043	114	24.6	1.50	-	+
AH-0049	115	3.6	1.53	-	+
AH-0058	116	15.2	1.74	-	+
AH-0062	117	2.9	1.25	-	+
AH-0064	118	0.8	0.78	-	+
AH-0085	119	1.3	1.45	-	+
AH-0091	120	3.0	1.72	-	+
AH-0139	121	4.3	1.34	-	+
AH-0142	122	4.2	1.38	-	+
AH-0145	123	34.5	1.51	-	+
AH-0146	124	6.6	1.21	-	+
AH-0151	125	1.2	0.92	-	+
AH-0158	126	19.9	1.50	-	+
AH-0176	127	3.0	2.38	-	+
AH-0179	128	4.7	2.07	-	+
AH-0183	129	4.6	1.94	-	+

Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0197	130	1.6	2.97	-	+
AH-0206	131	1.8	2.52	-	+
AH-0213	132	0.6	-1.74	-	+
AH-0227	134	2.9	2.44	-	+
AH-0229	135	1.8	2.78	-	+
AH-0233	136	1.7	3.10	-	+
AH-0235	137	2.2	2.18	-	+
AH-0236	138	2.8	6.75	-	+
AH-0241	139	1.3	-8.64	-	+
AH-0243	140	1.7	2.98	-	+
AH-0252	141	2.4	2.75	-	+
AH-0257	142	3.5	2.38	-	+
AH-0259	143	5.4	2.05	-	+
AH-0271	144	5.1	2.25	-	+
AH-0274	145	3.0	2.18	-	+
AH-0281	146	2.6	1.56	-	+
AH-0286	147	4.8	1.84	-	+
AH-0289	148	4.0	1.72	-	+
AH-0314	149	9.1	1.85	-	+
AH-0315	150	2.1	2.05	-	+
AH-0325	151	7.4	1.85	-	+
AH-0326	152	3.3	1.82	-	+
AH-0335	153	0.6	9.49	-	+
AH-0345	154	4.3	2.18	-	+
AH-0346	155	1.1	15.10	-	+
AH-0355	156	1.0	-1.74	-	+
AH-0397	157	2.2	5.03	-	+
AH-0432	158	1.8	4.84	-	+
AH-0439	159	0.2	-0.41	-	+
AH-0444	160	6.5	2.27	-	+

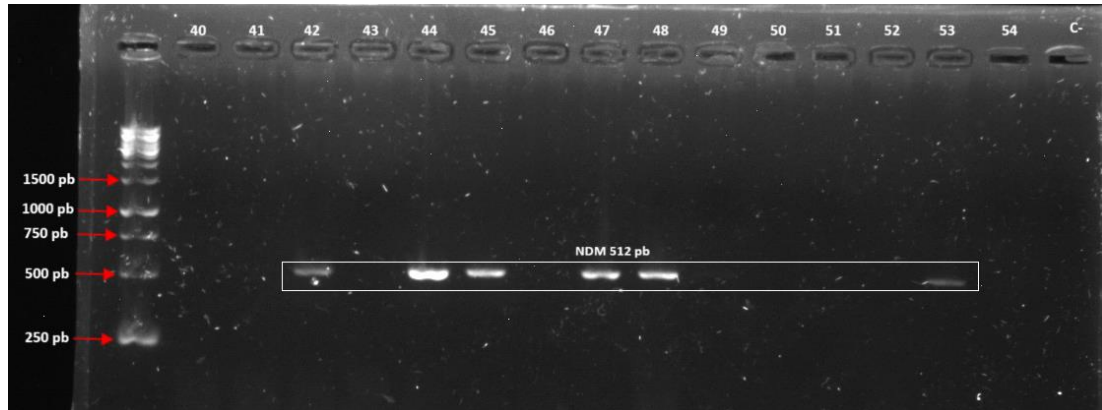
Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0462	161	3.0	3.96	-	+
AH-0464	162	3.7	4.36	-	+
AH-0466	163	1.5	7.05	-	+
AH-0470	165	0.5	-1.14	-	+
AH-0477	166	18.8	1.62	-	+
AH-0479	167	1.7	3.53	-	+
AH-0482	168	3.5	3.16	-	+
AH-0487	169	2.0	2.54	-	+
AH-0488	170	1.2	1.26	-	+
AH-0501	171	1.3	3.79	-	+
AH-0511	172	0.3	-0.58	-	+
AH-0513	173	2.1	3.09	-	+
AH-0518	174	-0.9	0.80	-	+
AH-0519	175	1.1	3.33	-	+
AH-0521	176	0.3	-0.68	-	+
AH-0522	177	7.2	1.60	-	+
AH-0525	178	3.7	1.49	-	+
AH-0533	179	1.8	1.55	-	+
AH-0534	180	3.8	1.48	-	+
AH-0535	181	4.4	1.59	-	+
AH-0549	182	4.5	1.65	-	+
AH-0566	183	8.1	1.61	-	+
AH-0567	184	4.4	1.49	-	+
AH-0579	185	2.5	1.48	-	+
AH-0580	186	3.1	1.67	-	+
AH-0586	187	2.2	1.87	-	+
AH-0594	188	3.5	1.78	-	+
AH-0597	189	2.8	1.30	-	+
AH-0611	190	6.2	1.56	-	-
AH-0623	191	3.7	1.64	-	+

Código de muestra	ID tubo	Concentración ADN (ng/μL)	A260/280	Carbapenemasa	Validez
AH-0652	192	2.8	1.78	-	+
AH-0653	193	3.4	2.01	-	+
AH-0657	194	2.3	3.66	-	+
AH-0658	195	4.2	1.78	-	-
AH-0662	196	3.7	1.85	-	+
AH-0702	197	2.9	2.24	-	+
AH-0705	198	1.3	4.46	-	+
AH-0714	199	2.5	2.29	-	+
AH-0717	200	2.2	1.54	-	+
AH-0780	201	4.2	1.75	-	+
AH-0784	202	3.7	1.47	-	+
AH-0791	203	3.5	1.46	-	+

Anexo VI:

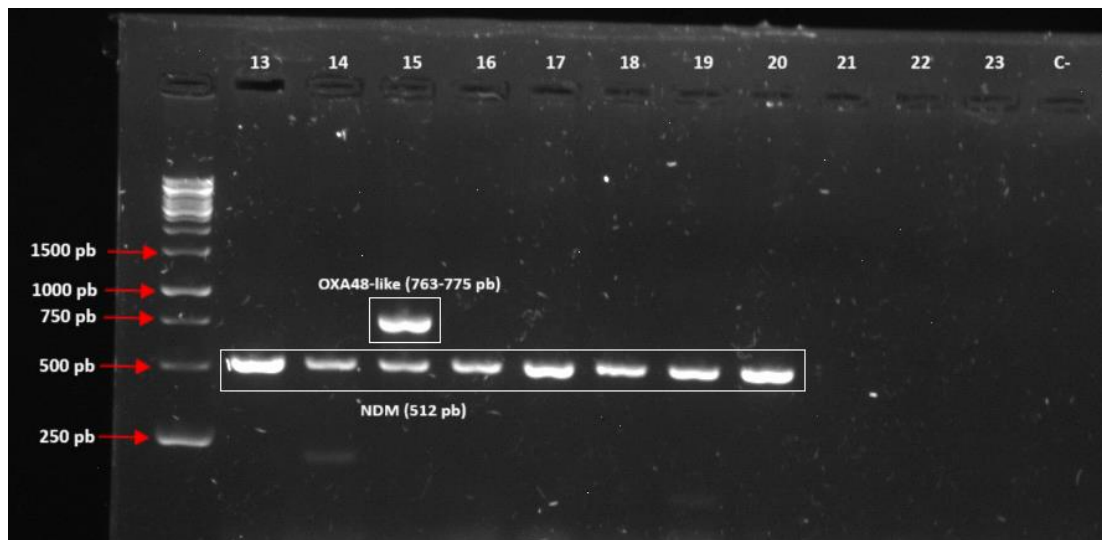
Ejemplos de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas

Figura 7. Primer ejemplo de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas



En este gel se señala la detección del gen *bla*_{NDM} en múltiples muestras.

Figura 8. Segundo ejemplo de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas

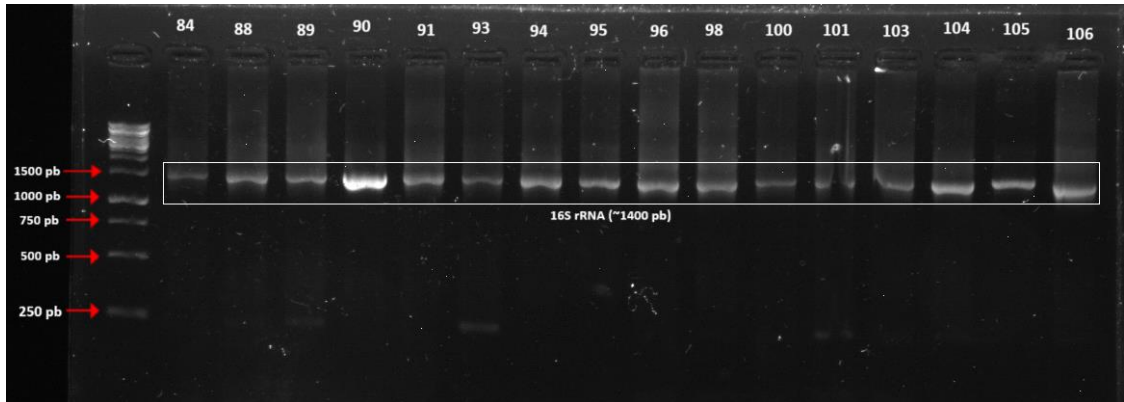


En este gel se señala la detección del gen *bla*_{NDM} en múltiples muestras, además de la detección de la combinación de genes *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA48-like}

Anexo VII:

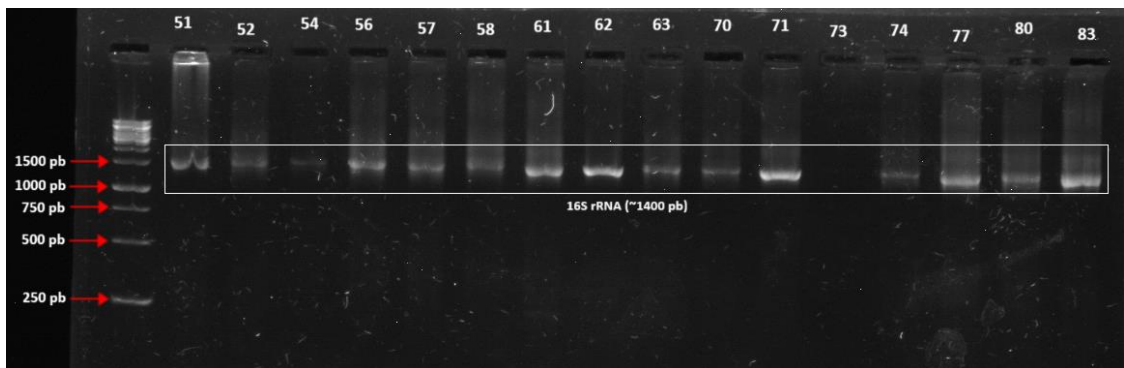
Ejemplos de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA

Figura 9. Primer ejemplo de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA



En este gel se señala la detección del gen 16S rRNA en múltiples muestras.

Figura 10. Segundo ejemplo de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA



En este gel se señala la detección del gen 16S rRNA en múltiples muestras.