

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología



Selección de método de detección y formulación de propuesta de investigación: "Desarrollo de pruebas moleculares para detección de bacterias resistentes en menos de 24hrs en la unidad pediátrica en UNICAR"

Trabajo de graduación en modalidad de tesis

presentado por José Andrés Grajeda Estrada

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala

2016

Selección de método de detección y formulación
de propuesta de investigación: "Desarrollo de
pruebas moleculares para detección de bacterias
resistentes en menos de 24hrs en la unidad
pediátrica en UNICAR"

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología



Selección de método de detección y formulación de
propuesta de investigación: "Desarrollo de pruebas
moleculares para detección de bacterias resistentes en
menos de 24hrs en la unidad pediátrica en UNICAR"

Trabajo de graduación en modalidad de tesis

presentado por José Andrés Grajeda Estrada

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala

2016

Vo. Bo. :

(f)



(Ph.D. Dalia Mei-Lin Lau Bonilla)

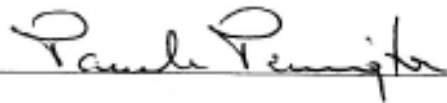
Tribunal Examinador:

(f)



(Ph.D. Dalia Mei-Lin Lau Bonilla)

(f)



Ph. D. Pamela Pennington

(f)



Ph. D. Krisztina Fulop Ríos

Fecha de aprobación: Guatemala, 22 de agosto del 2016

ÍNDICE

Lista de cuadros	x
Lista de figuras	xii
Resumen	xiv
I. Introducción	1
II. Objetivos.....	3
III. Justificación.....	5
IV. Marco teórico	7
V. Metodología.....	21
VI. Resultados y análisis de resultados	25
VII. Conclusiones	37
VIII. Recomendaciones	38
X. Anexos.....	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Asignación de punteo para cada parámetro	22
Cuadro 2. Comparación de métodos de detección de resistencia bacteriana.....	26
Cuadro 3. Descripción de cada parámetro evaluado para la selección del método	29
Cuadro 4. Puntuación de cada parámetros de evaluación del método	30
Cuadro 5. Comparación entre métodos según rúbrica	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Procedimiento realizado para la selección del método	24
--	----

RESUMEN

Este proyecto de graduación busca explorar potenciales metodologías para la detección rápida de resistencia a antibióticos, presentes en bacterias oportunistas en la Unidad de Pediatría de la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR). Las infecciones intrahospitalarias derivan en altos costos económicos debido a un aumento en la estadía hospitalaria, costo de cuidados intensivos, y tasa de mortalidad, por lo que se recomienda realizar una detección temprana que implica un mejor consejo para brindar un tratamiento adecuado. Los métodos evaluados fueron: Difusión de disco, microfluídos, antibiograma por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), PCR, Espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de corrida (MALDI-TOF) aplicado en metodología comercial, microarreglos, secuenciación de genoma completo (WGS), y lisis celular. Se realizó una rúbrica para evaluar diversos aspectos relevantes en cuanto a la selección del método, los parámetros evaluados fueron: base teórica del método, tipo de prueba, tiempo de detección, equipo, precio del equipo, precio aproximado de la prueba, determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y determinación de nuevos mecanismos de resistencia. Por medio de éstos se determinó el acercamiento más eficiente (rápido, económico, sensible y específico) para realizar un diagnóstico adecuado de resistencia bacteriana. Los métodos evaluados se compararon con una escala numérica para cada parámetro. Así se determinó que la metodología más adecuada es el antibiograma con qPCR, por lo que se procedió a realizar una propuesta de investigación con el fin de establecer la prueba y así contribuir al megaproyecto cuyo objetivo principal es el desarrollo de estrategias para reducir el impacto de infecciones nosocomiales en un hospital.

I. INTRODUCCIÓN

La Unidad de Cirugía Cardiovascular de Guatemala (UNICAR), es una institución que nació en los años 70's sin fines de lucro, con el objetivo principal de realizar procedimientos quirúrgicos en el área de cardiología en el país. Dicha institución trabaja con base en fondos del estado y donaciones de fundaciones como la Fundación Aldo Castañeda y la Fundación Ronald McDonald, las cuales aportan recursos para que se puedan llevar a cabo las operaciones. UNICAR opera más de 300 pacientes por año y este número va incrementando. La labor de esta unidad de cirugía, está representada por su unidad de pediatría, ya que son pioneros en procedimientos en niños en el país y en la región centroamericana (UNICAR, 2012).

El hospital es propenso a uno de los problemas generalizados en la salud pública, las infecciones nosocomiales, estas son infecciones adquiridas intrahospitalariamente y tiene un alto impacto en la vida de los pacientes (Chen, 1994; Cazali, 2013). Un sistema inmune comprometido aumenta el riesgo de adquirir este tipo de infecciones, el sistema inmune puede estar en un estado atenuado en niños o tras procedimientos quirúrgicos, en UNICAR los pacientes son niños y estos son operados por lo que el riesgo de adquirir una infección es alto (Chen, 1994) en UNICAR las tasas de infección son entre 12% y 16% (Grajeda, 2015). A pesar de estos riesgos, se ha demostrado que determinar tempranamente el patrón de sensibilidad a antibióticos en infecciones nosocomiales disminuye tasas de mortalidad, costos de cuidados y tiempo de estadía en el hospital, debido a que el tratamiento que se le da al paciente es más adecuado y por lo tanto eficaz (Doern *et al.*, 1994). Por lo discutido anteriormente, es recomendado realizar detecciones tempranas y específicas para así dar un mejor tratamiento y que el paciente tenga mayores probabilidades de sobrevivir tras la operación (Weinstein, 1998).

La metodología estándar utilizada para realizar un tamizaje de resistencia a antimicrobianos es por microbiología clásica, esta metodología puede ser por difusión por disco, la cual consiste en determinar el fenotipo (susceptibilidad al antibiótico) por medio del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco con antibiótico, dicho método toma tiempo (48-72hrs) pero por su facilidad de realización rutinaria y económica sigue siendo el “*Gold Standard*” (AST Standards, 2011). Existen por lo tanto, metodologías novedosas que buscan disminuir el tiempo de detección. Los métodos tienen diversas bases científicas así como ventajas y desventajas. Algunos de los métodos que han sido desarrollados son: métodos basados en PCR, espectrometría de masas, microarreglos, microfluídos, lisis celular y secuenciación del genoma (Pulido *et al.*, 2013).

II. OBJETIVOS

A. General

1. Establecer un método más eficiente (rápido, económico, sensible y específico), que la microbiología clásica para detección de bacterias resistentes a antibióticos en la unidad pediátrica de UNICAR y escribir una propuesta de investigación para desarrollar y ejecutar esta metodología.

B. Específicos

1. Determinar un método de detección de resistencias bacterianas a antibióticos que sea más rápido, económico, sensible y específico que la microbiología clásica en la unidad de pediatría de UNICAR.

2. Formular una propuesta de investigación para desarrollar y ejecutar la metodología elegida.

III. JUSTIFICACIÓN

En UNICAR existe una alta incidencia de infecciones nosocomiales, entre 12% y 16% (Grajeda, 2015) y puede haberse reportado hasta 25%, atribuido a pacientes inmunosuprimidos tanto por el procedimiento quirúrgico *per se* como por la edad del paciente, ya que son pacientes pediátricos (Cazali, 2013). Las bacterias causantes de estas infecciones intrahospitalarias son detectadas por microbiología clásica al igual que la susceptibilidad a antibióticos - con el método de difusión de disco- llevándose a cabo entre 48hrs y 72hrs (Cazali, 2013; ATS Standards, 2011). Debido a esto, los pacientes no reciben un tratamiento adecuado a tiempo, lo cual incide en la tasa de mortalidad, cuidados hospitalarios y permanencia del paciente (Chen *et al.*, 1994). La susceptibilidad a antibióticos es tan importante como la determinación de la bacteria que causa la infección, ya que los métodos utilizados no son lo suficientemente rápidos, es de gran importancia aplicar metodologías que superen las barreras de tiempo, y que a la vez, sean lo suficientemente sensibles y específicas (Pulido *et al.*, 2013). Se ha demostrado que al mejorar el tiempo de detección se obtienen mejoras en el pronóstico de vida del paciente y los costos en que incurre el hospital (Doern *et al.*, 1994; Trenholme *et al.*, 1989; Iregui *et al.*, 2007). En UNICAR financian los procedimientos quirúrgicos por medio del estado y de donaciones y los realizan sin fines de lucro. Al disminuir los gastos se pueden operar más pacientes, y así mejorar el servicio que brinda el hospital, un día en el intensivo puede estar entre Q5,000 y Q8,000 (UNICAR, 2012).

Al realizar un estimado tomando en cuenta el costo de cuidado intensivo y un cuidado de dos semanas, se calculó que el hospital gasta alrededor de Q16,800,000.00. Con disminuir el tiempo de cuidado hospitalario tres días al tener una prueba más rápida se podrían ahorrar Q6,000,000.00 los cuales pueden ser re utilizados para brindar mejores servicios. Por lo tanto la elección de un método que se adapte a las necesidades del hospital es fundamental para disminuir las tasas de mortalidad causadas por infecciones nosocomiales a través de la mejora de los cuidados post-operatorios así como la disminución del tiempo de los mismos por el aumento en su calidad.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Antibióticos: mecanismo de acción y mecanismo de resistencia

La resistencia a antibióticos es causada por diversos de mecanismos, los más importantes son la presencia de enzimas que inactivan la droga utilizada, una enzima que sustituye la función de el blanco de una droga, una mutación o modificación post-traduccional que reduce la interacción entre la enzima blanco y la droga, una reducción en la entrada de antibiótico a la bacteria o bien bombas de eflujo que sacan el medicamento y una producción mayor de la enzima que es blanco del agente antimicrobiano (Fluit *et al.*, 2001). Para cada antibiótico existe un mecanismo de acción específico así cómo un mecanismo de resistencia, a continuación se plantea un panorama general para diferentes familias de antibióticos:

1. Betalactámicos. Esta familia de antibióticos es ampliamente utilizada y tienen efecto inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias, por lo tanto ataca bacterias Gram positivo. La familia incluye penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, entre otros. La resistencia a esta gran familia de antimicrobianos es causada por la presencia de enzimas (beta-lactamasas) que hidrolizan la droga o bien por la reducción de afinidad a las proteínas que se unen a penicilina (*Peniciling Binding Proteins*, PBPs). Aunque con menor frecuencia sí se han observado bombas de eflujo (Fluit *et al.*, 2001; Bush, 2010).

La resistencia a esta familia se ha clasificado acorde a la secuencia de nucleótidos; A (Activa contra benzylpenicilina y *Extended-spectrum beta-lactamases* - ESBLs), C (actúan cuando hay una sobreexpresión) y D (Hidrolizan oxacilina), para los que en su sitio activo tienen serina y B (Actúan contra penicilinas y cefalosporinas y algunos carbapenémicos) para las enzimas que tienen cuatro átomos de zinc en el sitio activo (Fluit *et al.*, 2001). Los genes pueden encontrarse en plásmidos o en el cromosoma positivo (Fluit *et al.*, 2001). Las beta-lactamasas son muy variadas y su efecto tiene importancia tanto en bacterias Gram positivo como bacterias multiresistentes Gram negativo (Bush, 2010). La variedad de ensayos que se han desarrollado es tan amplia como la cantidad de beta-lactamasas que pueden existir, por lo tanto la detección de estas es dependiente del tipo de betalactámico a utilizar.

a. Resistencia a meticilina. La búsqueda del gen *mecA* es uno de los ensayos más utilizados para encontrar la resistencia a meticilina. Este se puede combinar con PCR del gen específico de la bacteria, en el caso de *Staphylococcus aureus* con el gen *nuc*. Aunque se han realizado diversas

variantes de la prueba, se considera que la amplificación del gen *mecA*, es la mejor manera de identificar resistencia a oxacilina en estafilococos, cabe aclarar que en algunos casos la resistencia depende de la expresión del gen, por lo que, no siempre se relaciona la presencia del gen con la susceptibilidad de la bacteria (Fluit *et al.*, 2001).

b. Resistencia a penicilina. En algunas bacterias como *Streptococcus pneumoniae* la resistencia a penicilina se da por una reducción en la afinidad a PBPs por lo que los genes alterados para dichas proteínas son los que causan la resistencia. Debido a la variedad genética que puede ocasionar estas resistencias, las pruebas moleculares basadas en PCR pueden resultar en falsos negativos (Fluit *et al.*, 2001).

c. Beta-lactamasas comunes . Las beta-lactamasas comunes son aquellas que no entran en el grupo de ESBLs ni de metalo-beta-lactamasas, uno de los antibióticos más utilizados que pertenecen a este grupo son las cefalosporinas. Su detección se realiza buscando los genes TEM, OXA, SHV y AmpC, *cepA*, y *cfxA* con sus variantes, generalmente se asocian a plásmidos. También se han realizado inmunoensayos (Fluit *et al.*, 2001).

d. ESBL. Generalmente encontramos estas beta-lactamasas codificadas en plásmidos, TEM o SHV. La mayoría se inhiben con ácido clavulónico. De parte de TEM, se han encontrado más de 20 variantes, de la misma forma con SHV la cantidad de variantes es amplia. Se han realizado métodos como reacción en cadena de la polimerasa para polimorfismos conformacionales de hebra única (*Single Strand Conformational Polymorfism, PCR-SSCP*) y PCR tradicional (Fluit *et al.*, 2001).

e. Metalo beta lactamasas. Tanto para los carbapenémicos como para las cefalosporinas, el gen *blaIMP*, es el que codifica para dichas beta-lactamasas. Esta enzima se codifica en un integron y se ha identificado en diferentes bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Para esta resistencia se ha utilizado la amplificación de dichos genes o de la integrasa *intI3* (Fluit *et al.*, 2001).

2. Aminoglucósidos. Gentamicina, tobramicina, amikacina y estreptomycin son los aminoglucósidos más utilizados para atacar bacterias tanto Gram negativo como Gram positivo. Estas drogas inhiben la síntesis de proteínas al unirse a los ribosomas de la bacteria por lo que la bacteria no puede continuar su ciclo celular normal. Existen tres tipos de resistencia y dependen del tipo de modificación que ocurra al aminoglucósido utilizado: aminoglucósido acetil-transferasa (ACC), aminoglucósido adenilil-transferasa (ANT) y aminoglucósido fosfotransferasa

(APH). Aunque los más comunes son por modificación a la droga por enzimas, también existen mutaciones en el ribosoma y bombas de eflujo (Fluit *et al.*, 2001; Hermann, 2007).

En bacterias Gram negativo se identificó la enzima ANT(2") codificado en plásmidos, se han identificado otras enzimas parecidas, también codificadas en plásmidos y se han propuesto análisis por PCR, y por electroforesis de campo pulsado en gel (*Pulsed field gel electrophoresis, PFGE*). En cuanto a estafilococos se han identificados enzimas como AAC(6') y APH(2") que proveen resistencia a varios antibióticos pues son bifuncionales, se ha procurado detectar por multiplex-PCR ya que en estas bacterias la variedad de genes es poca. Para estreptococos, resistentes a gentamicina, sí existe una variedad en cuanto a los genes de resistencia por lo que el uso de PCR es limitado (Fluit *et al.*, 2001).

Ya que existe una amplia variedad de genes que determinan la resistencia y que generalmente se encuentra en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, los análisis por PCR para determinar esta resistencia es compleja, sin embargo, el uso de microarreglos puede contribuir a solucionar este problema -aunque no se ha realizado mayor avance por el tiempo y costo- (Fluit *et al.*, 2001).

3. Fluoroquinolonas. Este tipo de drogas sintéticas también atacan la síntesis de proteínas, inhibiendo la topoisomerasa II o IV, por lo tanto, la estructura del ADN (el superenrollado) de la bacteria se ve afectado. Las dos formas predominantes de resistencia es la permeabilidad de la droga y la modificación de las enzimas objetivo. Ya que la mayoría de las resistencias reportadas son por cambios en la enzima, se ha encontrado que de los codones 67 al 106 de la GyrA es donde se encuentran las alteraciones, esta región es llamada QRDR o región determinante de la resistencia a la quinolona (*quinolone resistance-determining region, QRDR*). También se ha encontrado la importancia de la subunidad ParC y ParE para la resistencia en la GyrA y GyrB respectivamente. Algunas bombas de eflujo como NorA en *S. aureus*, han sido estudiadas como transportadores que dan multiresistencia y una resistencia de bajo nivel hacia fluoroquinolonas (Fluit *et al.*, 2001; Oliphant y Green, 2002).

La detección de estas resistencias es variada, se han utilizado polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción(RFLP), secuenciación, amplificación y PCR alelo-específico, sin embargo, las alteraciones pueden ser muy variadas y no se han caracterizado la influencia de las bombas de eflujo, además, no siempre se correlacionan las alteraciones con nuevas fluoroquinolonas con el fenotipo (Fluit *et al.*, 2001).

4. Macrólidos, lincosamida y estreptogramina (MLS). Este tipo de antibióticos afecta la síntesis de proteínas. Hay una gran variedad de causas y genes involucrados en la resistencia a dichas drogas, por lo tanto, con la excepción de los genes *mef* y mutaciones puntuales en 23S ARNr, no existen métodos moleculares prácticos para la detección específica de dichos agentes (Fluit *et al.*, 2001).

5. Glucopéptidos. La actividad de los glucopéptidos como vancomicina y teicoplanina es uniéndose a las cadenas D-alanil-D-alanina de los peptidoglicanos, esto no permite la formación de cadenas de peptidoglicanos. La resistencia codificada por *vanA* o *vanB*, se da cuando los peptidoglicanos ya no son tradicionales sino D-alanil-D-lactato; *vanC* cambia a D-alanil-D-serina así como *vanE*; también ha reportado el tipo *vanD*. La técnica molecular utilizada para la detección de la resistencia, aventajándose de las variables conocidas y caracterizadas, son los ensayos de PCR. Incluso han probado tener mayor eficacia que los métodos convencionales (Fluit *et al.*, 2001).

6. Tetraciclinas. Inhibiendo la sub-unidad ribosomal 30S, las tetraciclinas previenen la síntesis de proteínas. Se han encontrado más de 24 tipos de resistencia a tetraciclina y 3 oxitetraciclinas. Los mecanismos detectados son o por bombas de eflujo o por protección ribosomal (elongación del factor G). Las bombas de eflujo pueden ser detectadas por PCR (detectando los genes *tet*), sin embargo, la variedad está incrementando. Se ha utilizado también la hibridación ADN-ADN y el PCR, aunque en estas pruebas se utilizan para diferenciar entre el tipo de resistencia que presenta la bacteria. Esto es importante ya que las bombas de eflujo no tienen efecto contra minociclinas (Fluit *et al.*, 2001).

7. Trimetroprima. Estas son moléculas análogas al ácido dihidrofólico, por lo que compiten inhibiendo la dihidrofolato reductasa (*dihydrofolate reductase*, DHFR). La resistencia a estos antibióticos puede ser por mutaciones en DHFR, adquisición del gen resistente, o sobreproducción de la enzima. Los métodos basados en PCR no han sido muy explorados ni son prometedores para la detección de estas resistencias debido a la alta variabilidad en los mecanismos (Fluit *et al.*, 2001).

8. Cloranfenicol. Unido al 50S inhibe la transferencia de péptidos en la síntesis de proteínas. La inactivación del antibiótico por acetiltransferasas es el mecanismo de resistencia más común y se encuentra en los genes *cat* tanto en bacterias Gram positivo como Gram negativo, dicho gen es

codificado en plásmidos. También se ha encontrado resistencia por bombas de eflujo en algunas bacterias Gram negativo. Ya que el antibiótico no es muy utilizado, no se han realizado muchos estudios para generar métodos de detección a estas resistencias (Fluit *et al.*, 2001).

B. Mecanismos de resistencia a antibióticos por cada bacteria

Las bacterias encontradas en infecciones nosocomiales generalmente presentan resistencia a ciertos antibióticos. Ya que este es un problema a nivel mundial se han reportado diferentes resistencias dependiendo de la bacteria. Las bacterias cuyos mecanismos de resistencia están descritos a continuación son las más frecuentes en la unidad de pediatría en UNICAR.

1. *Acinetobacter baumannii*. Esta bacteria es una de las más importantes a nivel hospitalario ya que se han reportado bacterias con resistencia a toda clase de antibiótico (Perez *et al.*, 2007). La especie bacteriana resistente a múltiples drogas (multidrug resistance, MDR por sus siglas en inglés) ha sido encontrada globalmente y no solo ha presentado resistencia, sino también a demostrado causar un alta mortalidad en los pacientes infectados (Perez *et al.*, 2007). Los antibióticos para los que se ha reportado resistencia a nivel global son: beta-lactámicos clase A, B, C y D, aminoglucosidos, quinolonas, tetraciclinas y polimixinas (Perez *et al.*, 2007).

En algunos reportes se encontró resistencia específicamente a, amikacina, cefepimina, ceftazidimina, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperaciclina y trimetoprim sulfam (Cutovic *et al.*, 2007). La distribución de la infección en dicho estudio fue claramente en infección respiratoria, también siendo la bacteria más común en el hospital dónde se realizó el análisis (Cutovic *et al.*, 2007).

La capacidad de ser multiresistente se da gracias a la obtención de genes del ambiente, fenotipo de los genes *FECEB* y *comQLONM* (Perez *et al.* 2007). Algunos estudios han identificado grupos de genes dónde se encuentran las resistencias (AbaR1), que no solo contiene los genes de resistencia de antibióticos comunes, sino también transposones, implicando la transferencia horizontal de genes (Perez *et al.*, 2007). Además, también se ha demostrado que, la formación de biopelículas contribuye a que la bacteria sea multiresistente (Badave y Dhananjay, 2015).

Se ha demostrado que para *A. baumannii* multiresistente hay terapias de antibióticos combinados que son útiles en la eliminación de la bacteria, tanto *in vitro* como en modelos animales, y en algunos casos, en pruebas clínicas - Algunos ejemplos son: meropenem + ampicilina-sulbactámica, Imipenem + rifampicina y rifampicina + colistina - (Perez *et al.*, 2007).

El correcto uso de antibióticos es indispensable para combatir infecciones por dicha bacteria y evitar la propagación de nuevos mecanismos de resistencia (Custovic *et al.*, 2014).

2. *Aeromonas hydrophila*. Esta es una bacteria oportunista que ha ido aumentando su frecuencia en enfermedades nosocomiales en heridas en la piel, por lo que, es importante su correcta identificación y el uso de antibióticos adecuados para combatirla, es recomendado utilizar gentamicina, cloranfenicol o tetracilina (Trust y Chipman, 1979). Aunque *A. hydrophila*, no es muy frecuente, se ha reportado en casi todos los casos resistencia a penicilina, ampicilina, carbenicilina y cefalozina, algunos casos amoxicilina y ácido clavulánico y en otros piperacilina (Gold y Salit, 2006). A pesar de esto, la tercera generación de cefalosporinas, los aminoglucosidos (excepto esteptomicina), trimetoprim sulfam, tetraciclina, entre otros, son antibióticos a los cuales la bacteria es susceptible en la mayoría de casos (Gold y Salit, 2006).

3. *Burkholderia cepacia*. Aislada de la sangre causando sepsis en pacientes inmunosuprimidos y relacionada a materiales médicos contaminados, *B. cepacia* es importante clínicamente, tanto su detección como determinar los patrones de sensibilidad a antibióticos (Patra *et al.*, 2013). Generalmente es aislada de muestras de sangre y es resistente a varios antibióticos (Patra *et al.*, 2013). Las resistencias comunes reportadas han sido aminoglucósidos, polimixinas y colistina, también hay reportes de resistencia a ampicilina y amaquicina (Patra *et al.*, 2013) y a quinolonas (Tseng *et al.*, 2014). Las resistencias se han relacionado a bombas de eflujo (Tseng *et al.*, 2014).

Para infecciones con este microorganismo, es también importante una rápida acción con una combinación adecuada de antibióticos, sobre todo en pacientes neonatos y severamente inmunosuprimidos (Patra *et al.*, 2013).

4. *Enterobacter cloacae*. Existen cepas multiresistentes a drogas (*multi-drug resistance, MDR*) para *E. cloacae*, beta lactamasa de espectro extendido (*Extended-spectrum β -lactamase, ESBL*) es la más reportada (Oteo *et al.*, 2013). El grupo con mayor frecuencia es el del tipo CTX-M-15 que también se presenta en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, este grupo de bacterias es resistente a una amplia variedad de antibióticos, casi todas las beta-lactamasas y otras familias, los carbapenémicos son una de las pocas drogas con que se puede tratar estas infecciones, y debe ser utilizadas con cuidado pues se han reportado cepas resistentes a esta familia de antibióticos (Oteo *et al.*, 2013). La resistencia a los beta-lactámicos también se relacionan con la sobreexpresión de los genes *ampC* y adquisición de plásmidos (Girlich, Poirel y Nordmann, 2015).

5. *Escherichia coli*. La bacteria *E. coli* causa una de las más conocidas e importantes en infecciones adquiridas intrahospitalariamente, en Europa, la cepa resistente a cefalosporinas de tercera generación (G3CREC) es quizás la más importante en cuanto a mortalidad y permanencia hospitalaria junto con *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; los costos y muertes son excesivos por lo que su detección y tratamiento adecuados son esenciales (de Kraker *et al.*, 2011). En definitiva la incidencia de cepas resistentes a incrementado significativamente, ampicilina, sulfonamida, tetraciclina, y también se demuestra la adquisición de resistencia a nuevas drogas (Tadesse *et al.*, 2012). También se ha relacionado la resistencia dependiendo del tejido dónde se presenta la infección, por ejemplo resistencia a fluoroquinolonas en infecciones del tracto urinario, esta resistencia se obtiene a través de un plásmido, a pesar de la alta frecuencia a un antibiótico también se observa resistencia a otros, entre ellos ampicilina, kanamicina y gentamicina (Longhi *et al.*, 2012). Es común encontrar *E. coli* del resistente a ESBL del grupo CTX-M-15 (Longhi *et al.*, 2012). El incremento de las resistencias hacia quinolonas, trimetoprim, ácido nalidixico y cefprofloxacina sugiere que se deben usar terapias combinadas de nitrofurantoina (Kahlmeter y Poulsen, 2012). Tanto para esta bacteria como para *Klebsiella pneumoniae* se han reportado ESBL (Park *et al.*, 2012), y, algunos brotes de cepas resistentes a fluoroquinolonas que han obtenido genes de resistencia a otros antibióticos (Johnson *et al.*, 2012).

6. *Klebsiella pneumoniae*. Existen cepas resistentes a casi todos los antibióticos, entre ellos carbapenem, que ha generado brotes en algunos hospitales, en estos casos tanto la secuenciación como la epidemiología son importantes para tratar estos brotes (Sniktin *et al.*, 2012). También se han reportado *K. pneumoniae* multiresistentes por ESBL (Park *et al.*, 2012), colistina y carbapenem - aumentando el riesgo de mortalidad- (Capone *et al.* 2013). En Estados Unidos se encontró multiresistencia a carbapenem y otros antibióticos, los antibióticos con menos resistencia cruzada fue con tetraciclina y amikacina (Sanchez *et al.*, 2013). También hay resistencia a quinolonas -obtenido por la bomba de eflujo codificada por el gen *OqxAB* (Perez *et al.*, 2015). La resistencia a los carbapenemicos es una urgencia a nivel global, algunos métodos moleculares para la detección de esta resistencia es el PCR cuantitativo multiplex, ya que permite evaluar los diferentes genes de resistencia a este grupo de antibióticos, aunque hay otras técnicas de detección (Tzouvelekis *et al.*, 2015). Una de las recomendaciones en cuanto al tratamiento en estos casos, aunque no hay suficientes datos y se debe considerar la rápida selección de mutantes resistentes, es el uso de fosfomicinas (Tzouvelekis *et al.*, 2015).

7. *Pseudomonas aeruginosa*. Tan importante como *K. pneumoniae*, *E. coli* y *S. aureus*, *P.aeruginosa* es resistente y de gran importancia a nivel de infecciones nosocomiales (Breidenstein *et al.*, 2011). Esta bacteria tiene una variedad de mecanismos de resistencia los cuales son adquiridos mediante mutaciones y obtención de nuevos genes, y, selección por el uso inadecuado de antibióticos (Livermore, 2015), estudios han encontrado resistencia a carbapenemicos y a amikacina así como penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas (Livermore, 2015). Se recomienda el uso combinado de fluoroquinolonas con inhibidores de eflujo o beta-lactámicos con inhibidores de beta-lactamasas (Livermore, 2015). Hay una gran cantidad de genes relacionados con la resistencia a antimicrobianos (resistoma) en esta especie bacteriana, tanto intrínsecos como adquiridos por transferencia horizontal o por mutaciones (Breidenstein *et al.*, 2011). En términos generales se han encontrado resistencia a beta-lactamicos -incluyendo carbapenemicos-, fluoroquinolonas, aminoglucosidos y antimicrobianos policatiónicos (Poole, 2011).

8. *Staphylococcus aureus*. En este caso, las resistencias son adquiridas por transferencia horizontal por lo tanto la identificación es de gran importancia. Debido a multiresistencia, se recomienda el uso de clidamicina, o tetraciclinas como doxiciclina y minociclina, incluso el uso de algunos agentes como rifampicina, sin embargo, hay pocos estudios que indiquen un tratamiento definitivo (Chambers *et al.*, 2010). Penicilinas, meticilina y beta-lactámicos, cefalosporinas, carbapenemicos y vancomicina Chambers *et al.*, 2010). Las cepas más comunes son la COL y la *community-associated multi resistant Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) (Chamber *et al.*, 2010). Así pues, esta bacteria es importante no solo porque aumenta las tasas de mortalidad, sino también, el costo económico de los hospitales (de Kraker *et al.*, 2011).

9. *Staphylococcus epidermidis*. Los patrones de resistencia para esta bacteria han sido hacia fluoroquinolonas y azitromicinas, se han observado co-resistencia otros antimicrobianos, pero estos son los más comunes (Dave, 2011).

10. *Stenotrophomonas maltophilia*. *S. maltophilia*, es considerado como un patógeno emergente. Las resistencias son de gran variedad y provienen de transposones, plásmidos e integrones. Las resistencias encontradas son hacia beta-lactamasas, quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y aminoglucósidos, algunas polimixinas, vancomicina, ceftazidimida, ácido clavulónico y piperaciclina (Brooke, 2015).

C. Resistencias a antibióticos por cada bacteria en Guatemala

La Organización mundial de la salud (OMS) a través de la Organización Panamericana de la Salud (*Pan American Health Organization*, PAHO) han colectado datos sobre las resistencias a antimicrobianos en el *Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos* en el 2011. En Guatemala se han reportado: *E. coli* con resistencia a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulónico, cefalotina y cefotaxima; *K. pneumoniae*, ampicilina, amoxicilina, cefalotina y cefotaxima; *Enterobacter spp.* cefotaxima y muy pocos casos de ampicilina, amoxicilina/ácido clavulónico y cefalotina; *S. aureus*, penicilina, oxacilina, clindamicina y eritromicina; en el caso de *Enterococcus faecalis*, la mayoría de casos han sido reportados resistentes a gentamicina y estreptomina; *Enterococcus faecium*, ampicilina mayormente; y para *P. aeruginosa*, piperacilina, imipenem y ceftazidima.

D. Técnicas de detección de resistencia a antibióticos

La detección de resistencia a antibióticos representa cada vez una mayor importancia en la microbiología clínica, puesto que, en términos generales, las bacterias son cada vez menos susceptibles a estas drogas (AST Standards, 2011). Por esto varias organizaciones buscan establecer metodologías estandarizadas para la detección de dichas resistencias; las más conocidas son *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) en USA, *World Organisation for Animal Health* (OIE) en la Unión Europea y la *CDS Antibiotic sensitivity testing* (CDS-AST) en Australia (AST Standards, 2011). El estándar establecido por dichas instituciones varía entre el método de difusión de disco y método de concentración mínima inhibitoria (MIC) (WHO, 2015). Ya que, la resistencia a antibióticos es un problema grave en la salud pública global, se planean estrategias para la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos, resaltando la identificación de organismos resistentes comunes, la confirmación de casos, investigación e interpretación constante de análisis rutinarios así como el incremento de protocolos para investigar casos particulares y poco comunes (WHO, 2015). Parte de la carrera mundial por una detección temprana de esta resistencia a drogas propone nuevos métodos que sean más rápidos y eficientes (Dulcel *et al.*, 2009). Los métodos utilizados son variados y dependen o bien del antibiótico al que se tiene la resistencia o bien la bacteria o tipo de bacteria (*egs.* Gram negativo) en la que presenta la resistencia al antimicrobiano (Georgios *et al.*, 2014). La mayoría de las metodologías tiene como objetivo principal, detectar de forma más rápida que los métodos tradicionales y con mayor especificidad y sensibilidad (a pesar de las implicaciones en aumento de costos), evitando cultivar las muestras para poder obtener un

resultado. Los acercamientos son variados, entre ellos se encuentran la metagenómica, pirosecuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativo (qPCR), (Schmieder y Edwards, 2012; Woodford y Sundsfjor, 2005).

El debate aumenta así cómo las técnicas propuestas para la detección. Algunos autores exponen que las técnicas basadas en PCR no logran diferenciar entre bacterias muertas y vivas por lo que los resultados no son del todo confiables. A la vez proponen un método llamado *cantilever fluctuation* como sensor nanomecánico, de ésta forma logran detectar en minutos la respuesta del microorganismo al antibiótico (Longo *et al.*, 2013).

Las técnicas moleculares, aunque aún no son el “*Gold Standard*”, su uso ha ido aumentando debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad. Estas técnicas dependen de la resistencia que se busca, ya sean beta-lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, MLS, glucopéptidos, tetraciclinas o multiresistencias (Fluit *et al.*, 2001). Algunos de los métodos que se han desarrollado y se busca utilizar en microbiología clínica son:

1. Métodos basados en PCR. Los métodos basados en PCR busca genes involucrados en la resistencia a drogas. Este método provee información específica, sin embargo, no siempre se relaciona con la capacidad de la bacteria de ser o no resistente, resultando en falsos positivos. Es decir, algunos mecanismos de resistencia dependen de los niveles de expresión de los genes involucrados, por lo tanto, que el gen esté presente no necesariamente indica que la bacteria sea resistente a dicho antibiótico. Por otro lado los métodos basados en PCR no logran detectar nuevos mecanismos de resistencia, o bien mecanismos que no han sido caracterizados o relacionados a algún *set* de genes (Pulido *et al.*, 2013).

2. Espectrometría de masas MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*). La metodología toma la ventaja de la espectrometría de masas y busca identificar resistencia basado en datos comparativos de la bacteria con una contra parte susceptible y una resistente. Se ha encontrado que este método no es del todo confiable a nivel clínico pues los espectros obtenidos no siempre muestran diferencias entre cepas resistentes y susceptibles. Por otro lado, este método solo determinará la presencia de genes de resistencia y no sus niveles de expresión por lo que no necesariamente se relaciona con el fenotipo. Una modificación en la metodología en la que se miden la hidrólisis de los antibióticos es un acercamiento que sí indica el fenotipo y se ha encontrado eficaz (Pulido *et al.*, 2013).

3. Microarreglos. Utilizar microarreglos para detección de antibióticos tiene la clara ventaja de poder buscar una gran cantidad de genes en muy poco tiempo. A pesar de esto, es imposible determinar si coincide con el fenotipo o bien nuevos genes y mecanismos de resistencia (Pulido *et al.*, 2013).

4. Microfluídos. Un cultivo celular a través de un chip que logra detectar ya sea de forma electroquímica, magnética u óptica, el crecimiento bacteriano. Con este método sí se pueden determinar MIC parciales, los resultados se obtienen en menos de 4 horas y sí se relaciona con los resultados de métodos fenotípicos (Pulido *et al.*, 2013).

5. Lisis celular. Este acercamiento es un método que lisa las células y luego observa los núcleos teñidos por fluorescencia. Así evalúa si el antibiótico mató o no a la bacteria. Este método se logra realizar en 100min y ha sido validado para algunas bacterias y resistencias como *E. coli* resistente a ampicilina (Pulido *et al.*, 2013).

6. Secuenciación de todo el genoma (WGS). La secuenciación de todo el genoma ha resultado útil para caracterizar nuevas resistencias y estudios de brotes muy particulares. Para la microbiología clínica aún no es práctica pues es demasiado cara en comparación a otros acercamientos (Pulido *et al.*, 2013).

7. Métodos comerciales. Biomerieux Vitek es un equipo especializado para la detección de microorganismos de la compañía Fisher Scientific, cuesta alrededor de \$115,000 y utiliza chips para realizar la identificación, es necesario obtener las tarjetas de identificación para el microorganismo o grupo de microorganismos deseados, el paquete de 20 cuesta alrededor de \$350, se debe resaltar que la bacteria debe ser aislada antes de proceder a la identificación, se puede realizar la búsqueda de resistencias al mismo tiempo que la identificación de la bacteria y en total el procedimiento toma entre 48hrs y 72hrs (VWR, 2014). Otro sistema es MicroScan Walk Away de la compañía Beckman Coulter puede detectar en 3 hrs si la bacteria es Gram positivo o Gram negativo, además se le pueden agregar paneles para la identificación en 4hrs de la bacteria y pruebas de susceptibilidad a antibióticos determinando concentración mínima inhibitoria e identificación en 48 horas, además facilita la fase de crecimiento del inóculo inicial (Beckman Coulter, 2015).

8. Antibiógrama con qPCR. El método de realizar PCR en tiempo real para determinar la carga bacteriana ha sido utilizado para encontrar diferentes resistencias y propone un método que combina la rapidez de los métodos moleculares (qPCR) obteniendo resultado en menos de 24hrs

junto con la sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos, además este método incluye un hemo-cultivo previo, este ayuda a evitar falsos negativos al incrementar la concentración de bacterias de la muestra (Pulido *et al.*, 2013). Con este método se puede determinar la resistencia, la susceptibilidad y la concentración mínima inhibitoria. Con un paso posterior de secuenciación de los amplicones se puede determinar la especie bacteriana (Waldeisen *et al.*, 2011).

Cada metodología presenta ventajas y desventajas, sin embargo, se busca una estrategia que logre tomar ventaja de la rapidez de los métodos moleculares y la versatilidad de los métodos fenotípicos. A la vez, el método a utilizarse de forma clínica debe ser más rápido que los métodos tradicionales, así como suficientemente específico y sensible. Aunque el método sea más caro económicamente a groso modo, a la larga, con una detección temprana los costos de cuidados del paciente y la estadía hospitalaria se verán disminuidos (Pulido *et al.*, 2013).

E. Efecto de detección temprana en costo de cuidados y permanencia intrahospitalaria

Una rápida detección de resistencia a antibióticos así como identificación de bacterias en menor tiempo que la microbiología clásica proveerá información esencial para la toma de decisiones de tratamiento a un paciente con una infección. Un estudio realizado durante un año en la Universidad de Massachusetts comprobó que, los costos finales de hospitalización se veían afectados significativamente utilizando técnicas rápidas tanto de identificación de bacterias como de susceptibilidad a antibióticos. En este estudio compararon 10hrs contra 24hrs en la detección y el mismo tiempo de hospitalización, tomaron en cuenta mortalidad, días de intubación, días en tratamiento intensivo e intermedio, tiempo antes de modificar el tratamiento de antibióticos y los costos de hospitalización (Doern *et al.*, 1994). En Chicago realizaron un estudio, utilizando un método comercial de menos de 8hrs contra el método de rutinario de 48hrs, encontraron que con una detección rápida la terapia podía cambiar tanto en el inicio de una mejor terapia, cambio de antibiótico o bien cambio a un antibiótico de menor costo. Los costos por el cambio y mejoramiento en la terapia tuvieron un impacto económico de aproximadamente \$158 por paciente (Trenholme *et al.*, 1989).

El método afecta la rapidez con que se detecta la susceptibilidad, pero el flujo de trabajo es de igual importancia. Una comparación con una diferencia de 5hrs en la obtención de resultados resultó en, un apropiado uso de antibióticos, impactando significativamente en las tasas de

mortalidad, el tiempo de estadía y el costo total por paciente (~\$2000), un estimado de 4 millones de dólares en un hospital en Illinois (Barenfanger, Drake y Kacich, 1999). Por tanto, la importancia de una detección temprana de resistencia a antibióticos involucra no solo la sobrevivencia de los pacientes sino costos económicos significativos. A la vez, se ha demostrado que el retraso en la obtención de resultados tiene una influencia directa en las tasas de mortalidad de los pacientes (Iregui *et al.*, 2007).

V. METODOLOGÍA

La metodología para la selección del método se llevó a cabo creando una rúbrica con el objetivo de comparar numéricamente diferentes parámetros que son considerados importantes para elegir una técnica adecuada de detección de bacterias resistentes a antibióticos. Se compararon 8 métodos, difusión de disco, microfluidos, antibiogramas por qPCR, PCR, MALDI-TOF MS en un equipo comercial, microarreglos, WGS y lisis celular (ver Cuadro 2). Para cada metodología se establecieron 8 parámetros de importancia (ver Cuadro 3) en la selección del método a cada uno de ellos se le proporcionó una puntuación (ver Cuadro 4) y luego se calificaron las técnicas de acuerdo a los parámetros establecidos (ver Cuadro 5). Tras realizar el análisis se compararon las puntuaciones totales y se profundizó en resaltar las ventajas desventajas de los métodos con puntuaciones más altas.

Es importante resaltar que durante la selección del método se llevo a cabo una fase de investigación en literatura para evaluar métodos que se utilizan y se proponen en la actualidad. Luego de esto se procedió a determinar parámetros que influyeran en el funcionamiento de cada metodología así como establecer las relaciones entre dichos parámetros, es por esto que a cada uno se le asigno una puntuación diferente como se observa en la sección de resultados. Con dichos parámetros establecidos se llevó a cabo una investigación en la literatura más profunda con la cual se verificó y se definió cada uno de los factores que iban a ser evaluados. Luego se estableció una comparación entre cada uno de ellos con la rúbrica de evaluación previamente descrita.

Los parámetros fueron la base teórica del método, el tipo de prueba, el tiempo de detección del equipo, el precio del equipo, el precio aproximado de la prueba, la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la detección de nuevos mecanismos de resistencia. Los punteos para cada uno de ellos se eligieron de acuerdo al aporte de estos en la eficiencia del método. El parámetro más importante es el tiempo de detección ya que es por este acercamiento, una prueba más rápida, que se pueden disminuir tanto los costos de cuidado hospitalario como la permanencia hospitalaria y a la vez se mejora el pronóstico de vida de los pacientes. Los siguientes punteos altos tienen implicaciones en los demás parámetros, el tipo de prueba y el precio del equipo tienen un efecto en el precio aproximado por prueba y la determinación de MIC los cuales tienen una puntuación menor, además se brinda una puntuación más alta a la detección de nuevos mecanismos de resistencia, o mecanismos no estudiados previamente ya que brinda una ventaja de detección en contra de métodos que buscan características ya estudiadas.

Con dichos parámetros establecidos se llevó a cabo una investigación en la literatura más profunda con la cual se verificó y se definió cada uno de los factores que iban a ser evaluados. Luego se estableció una comparación entre cada uno de ellos con la rúbrica de evaluación previamente descrita.

En el cuadro a continuación se puede observar la rúbrica utilizada para calificar cada uno de los métodos según sus características. En el cuadro se detalla el rango de puntaje que puede obtenerse con cada parámetro. El detalle incluye la característica que discrimina entre un puntaje y otro. Utilizando esta rúbrica se realizaron las calificaciones observadas en el Cuadro 5 (ver sección VI)

Cuadro 1. Asignación de puntaje para cada parámetro

Método	Asignación de puntaje para cada parámetro
1. Base	Influye en tipo de prueba fenotípica 40
30-40	Influye en tipo de prueba genotípica 30
2. Tipo de prueba	Genotípico y fenotípico 60
50-60	Fenotípico 55
	Genotípico 50
3. Tiempo de detección	< 24 horas 150
90-150	24 - 48 horas 95-100
	72 horas > 90
4. Equipo	Influye en tipo de prueba fenotípica 40
30-40	Influye en tipo de prueba genotípica 30
5. Precio del equipo	< \$ 10,000 80
70-80	\$ 10,000 - \$ 100,000 75
	> \$100,000 70
6. Precio aproximado de prueba	< \$10 40
30-40	> \$10 30
7. Determinación de MIC*	Sí determina MIC 80
70-80	Aproxima MIC 75
	No detecta MIC 70

Continuación Cuadro 1. Asignación de punteo para cada parámetro

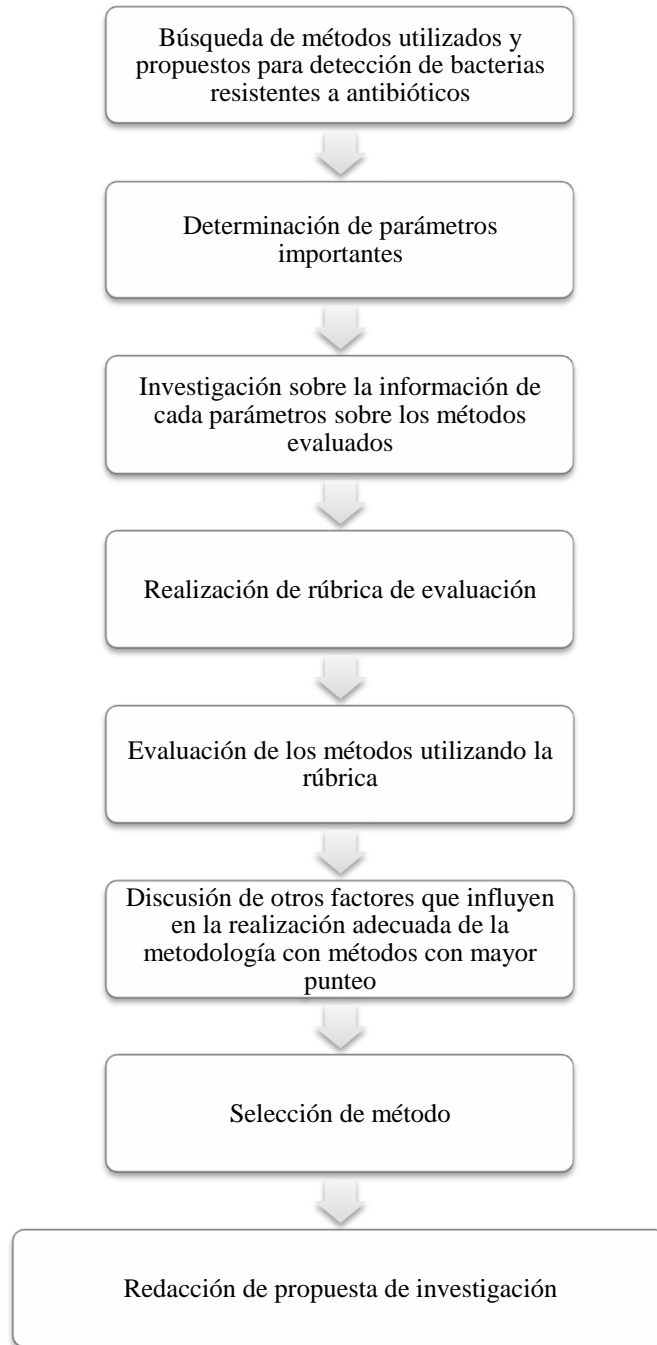
Método	Asignación de punteo para cada parámetro
8. Nuevos mecanismos	Sí detecta nuevo mecanismo 80
70-80	Sugiere nuevo mecanismo 75
	No detecta nuevo mecanismo 70
9. Demanda	Alta 20
10-20	Media 15
	Baja 10
10. Capacitación del personal	Baja 20
10-20	Media 15
	Alta 10

* MIC: *Minimum Inhibitory Concentration*

Para las metodologías cuya puntuación fue parecida se procedió a evaluar factores externos a la metodología que contribuyeran a la realización, interpretación y factibilidad de realizar cada una de forma rutinaria en un laboratorio. Esta evaluación se encuentra descrita en la sección VI. Resultados y análisis de resultados. Por último se estableció el método más adecuado para la detección de bacterias resistentes de forma rápida y económica que también fuera viable para realizarse de forma rutinaria en un laboratorio.

Luego de realizar la selección del método se procedió a elaborar la propuesta de investigación "Desarrollo de prueba diagnóstica molecular para detección de resistencia a antibióticos en menos de treinta horas en la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR)". La cuál fue sometida a una convocatoria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT). Dicha propuesta se encuentra en la sección de Anexos en el formato solicitado por CONCYT.

En la figura siguiente se observa el procedimiento que se llevó a cabo para seleccionar el método.

Figura 1. Procedimiento realizado para la selección del método

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los siguientes resultados indican qué metodología es la más adecuada para realizar una prueba de detección y a la vez resalta la importancia de cada uno de los parámetros que son evaluados. En el cuadro a continuación se presentan los parámetros y las características de cada uno de los métodos. Los métodos de crecimiento son aquellos que están basados en el crecimiento de la bacteria en cierto medio con presencia de antibiótico para evaluar la susceptibilidad a los mismos, los métodos de PCR por otro lado evalúan los genes presentes en el microorganismo para determinar si es resistente a uno o varios antibióticos. Dada la base del método se determina si la prueba evalúa el fenotipo de la bacteria o si busca genes particulares haciéndolo un método genotípico. Es importante resaltar que el tipo de prueba establece si la misma es capaz de determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y nuevos mecanismos de resistencia, dado que el objetivo de la prueba es dar un consejo adecuado para una mejor toma de decisiones la determinación del MIC ayuda a decidir la concentración de la droga a utilizar como tratamiento así como la posibilidad de dar una terapia combinada y con diferentes concentraciones para aumentar la eficiencia del tratamiento. Las bacterias además, adquieren nuevos de mecanismos de resistencia a las drogas por lo que es de suma importancia que la metodología logre establecer si la bacteria es resistente o no, aunque dicha resistencia no haya sido reportada con anterioridad.

El Cuadro 1 resume toda la información recopilada para varias técnicas utilizadas en la detección de resistencia a antibióticos. Se estudiaron factores importantes que ayudan en la diferenciación y selección de un método. La información incluye factores como el funcionamiento y la base teórica detrás del método lo cual contribuye a la selección haciéndola más que solo un análisis de rapidez o precio de la técnica. Esto es importante para poder escoger una prueba completa y que no tenga que cambiarse luego de cierto tiempo de uso por quedar desactualizada o por qué se desarrollen métodos más eficientes. La idea es que la prueba sea la mejor posible y que determine la mayor cantidad de factores que influyen en el tratamiento contra bacterias resistentes.

Cuadro 2. Comparación de métodos de detección de resistencias bacterianas según diversos parámetros

Método	Diffusión de disco	Microfluidos	Antibiograma con qPCR	PCR	MALDI-TOF MS** (Comercial)	Microarreglos	WGS**	Lisis celular	Biomérieux Vitek	MicroScan Walk-Away
Base	Creclimiento Fenotípica	Creclimiento Fenotípico o Genotípico	ADN/PCR- Creclimiento Fenotípico y Genotípico	ADN/PCR Genotípica	ADN comparación Genotípica	ADN hibridación Genotípico	ADN secuenciación Genotípico	Microscopia Fenotípico	Creclimiento Fenotípico	Creclimiento Fenotípico
Tipo de prueba	48hrs-72hrs	4hrs	24hrs	24-48hrs	24hrs	24hrs	1-2-Semanas	2hrs	73hrs	48hrs
Equipo	Incubadora	Sensor de microfluidos	Termociclador tiempo real	Termociclador	MALDI Biotyper	Escáner de microarreglos	Secuenciador	Microscopio fluorescencia	Fisher Scientific	Beckman Coulter
Precio del equipo	\$500	\$115,000	\$25,000	\$5,000	\$200,000	\$10,000	\$65,000	\$5,000	\$115,000	\$240,000
Precio aproximado de prueba	\$2	\$20-30	\$30	\$10	\$6	\$20	\$1,50 (Mínimo 96 mx=\$144)	\$15	\$18	\$20
Determinación de MIC*	Si	Si	Si	No	No	No	No	Estimado	No	Si
Nuevos mecanismos	Si	Si	Si	No	No	No	Si (Luego de estudios)	Si	No	Si
Demanda	Meda	Muy Alta	Alta	Meda	Muy Alta	Meda	Meda	Baja	Alta	Alta
Capacitación	Baja	Baja	Meda	Alta	Baja	Alta	Meda	Alta	Meda	Meda

Existen otros parámetros importantes en cuanto a la velocidad de la prueba y al precio de la misma. Estos parámetros ayudan a evaluar si la prueba es adecuada y viable para la detección de antibióticos de forma rutinaria. El tiempo de detección es el parámetro más importante, ya que se relaciona con un mejor consejo para dar tratamiento y así aumentar el pronóstico de vida de los pacientes, disminuir los gastos hospitalarios de cuidado y el tiempo de permanencia de los hospitalizados (Weinstein, 1998). Por otro lado están los precios tanto del equipo como de la prueba, estos son un indicador para la viabilidad económica de realizar la metodología en la institución. En el Cuadro 3 se observa la descripción de cada parámetro y en el Cuadro 4. la puntuación que cada uno tiene según la importancia de cada uno según discutido anteriormente.

Los métodos evaluados en el Cuadro 2 son los más utilizados y los propuestos en la literatura, es por esto que varios de éstos métodos aún se encuentran en desarrollo. Fue de suma importancia para la investigación realizar una exploración previa para conocer los métodos más utilizados en la actualidad así como los métodos que están siendo propuestos por investigadores en el área. Ya que la detección de resistencia a antibióticos tiene grandes impactos en el área hospitalaria, tanto para los pacientes como para el hospital (económicamente), hay una variedad de soluciones que han sido planteadas durante la última década para disminuir, especialmente, la velocidad con la que se determina la susceptibilidad a antibióticos. En el Cuadro 2 se observan dos métodos comerciales, un método tradicional y el resto de propuestas para cumplir el objetivo. Con la búsqueda previa se logró seleccionar una variedad de metodologías para así tener un panorama acertado y actualizado en cuanto a dichas metodologías. Cabe resaltar que existen otras técnicas que no fueron evaluadas, si no se tomaron en cuenta fue porque estaban en desarrollo muy temprano o utilizan prácticas desactualizadas.

Como se mencionó anteriormente en el Cuadro 3 se describe cada parámetro que se utilizó para evaluar el método. Cada factor tiene una importancia intrínseca en la selección de una metodología adecuada ya que la técnica a seleccionar debe ser económica, específica sensible y sobre todo, rápida para la determinación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos. Los parámetros utilizados se relacionan entre sí brindando una mayor solidez a la decisión y al punteo final. La base del método nos indica que tipo de prueba es, ésta base también determina el análisis que se va a evaluar con la técnica, por ejemplo un método basado en el crecimiento bacteriano va a ser de tipo fenotípico y el análisis va a ser la bacteria y su capacidad de multiplicarse en el medio. Los métodos basados en ADN van a buscar genes específicos y si están presentes o no en la muestra, por lo tanto el tipo de prueba es genotípico.

Esto se relaciona con el equipo y a la vez con el tiempo de detección. El equipo va a ser la herramienta utilizada para encontrar el analíto y determinar si la bacteria en la muestra es o no resistente. Generalmente los métodos genotípicos son más rápido, el equipo y reactivos utilizados ayudan a buscar genes específicos lo cual aumenta la velocidad de detección. Los métodos fenotípicos por otro lado evalúan el crecimiento de la bacteria en un medio específico, ya que se basa en el crecimiento no busca factores específicos y se pueden determinar otros aspectos importantes más allá de solo conocer si la bacteria es resistente o no. La determinación de éstos factores influye considerablemente en la selección de la metodología. Uno de ellos es la concentración mínima inhibitoria, este aspecto indica que tan susceptible es cierta bacteria a algún antibiótico, con esto se puede modificar el tratamiento aumentando o disminuyendo la concentración del antibiótico, también se pueden utilizar varios antibióticos en diferentes concentraciones para combatir más eficazmente el crecimiento bacteriano, por lo tanto, las consecuencias de su infección.

De igual importancia es la determinación de nuevos mecanismos de resistencia es por ello que en el Cuadro 3 se le da una puntuación entre 70-80 al parámetro. La detección de nuevos mecanismos de resistencia nos brinda información de gran importancia en dos líneas. La primera es que se evitan falsos negativos. En las técnicas genotípicas, se estudian factores que ya han sido estudiados y caracterizados con anterioridad, por esto no se pueden detectar nuevos mecanismos con estas técnicas. Puede entonces haber bacterias que sí sean resistente a un antibiótico y que dicha resistencia no haya sido detectada con una prueba genotípica, por ejemplo PCR, por lo tanto da un falso negativo. Para evitar falsos negativos se debe recurrir a técnicas que valúen el crecimiento de una bacteria en un medio que contenga cierta concentración de antibiótico, al realizar esto la bacteria va a crecer o no de acuerdo a su susceptibilidad al antibiótico evitando por completo los falsos negativos. La segunda línea de importancia de la detección de éste factor es que si se logra detectar un mecanismo que no ha sido identificado previamente o bien alguno que ha sido detectado para otras bacterias, se puede realizar más investigación para estudiar y caracterizar los nuevos mecanismos que se encuentren o posibles formas de compartir resistencia a antibióticos entre bacterias que no ha sido estudiadas previamente.

A la vez se establecen parámetros que influyen en la determinación del método más económico. Debido a que se necesita una inversión inicial para la compra del equipo así como un capital de trabajo para ser utilizado en la realización de la prueba ya implementada, se toman en

cuenta el precio del equipo, el cual nos ayudará a conocer la inversión necesaria para implementar la prueba y el precio de la prueba, tomado de entidades que ya realizan la prueba rutinariamente y la brindan como servicio. Estos precios no están relacionados en este caso ya que se buscaba comparar cada uno de ellos por separado para cumplir con lo descrito anteriormente.

Existen otros factores que también afectan en la toma de decisión en cuanto a la selección del método, éstos factores no son claves para la determinación sino mas bien secundarios y ayudan en la realización de la prueba rutinaria una vez implementada. La demanda indica la capacidad que tiene el equipo para cubrir las necesidades de cierto centro hospitalario. Hay equipos que pueden cubrir una demanda alta de paciente diarios, una demanda media o una demanda baja. Esto afecta la selección del método ya que depende dónde se realice la prueba así será más adecuada una prueba u otra. Otro de los factores secundarios es la capacitación que debe brindarse al personal que realizará la prueba, en este caso hay técnicas que necesitan una capacitación alta del personal, media o baja. Mientras más baja sea la capacitación que debe brindarse a los técnicos de laboratorio la prueba obtiene un mayor puntaje ya que la inversión en el personal debe ser menor y una técnica cuya capacitación baja provee un menor rango de errores.

En el cuadro a continuación se describe resumidamente cada uno de los 10 parámetros evaluados.

Cuadro 2. Descripción de cada parámetro evaluado para la selección del método

Método	Descripción del parámetro
1. Base	La base teórica determina el tipo de prueba, ésta depende del equipo que se utilice así como el analíto a ser evaluado.
2. Tipo de prueba	El tipo de prueba determina si el método puede detectar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y nuevos mecanismos de resistencia.
3. Tiempo de detección	El tiempo de detección incide en la obtención de resultados por lo tanto en la toma de decisiones para brindar un tratamiento.
4. Equipo	El equipo determina el analíto que se puede medir así como otras aplicaciones en el laboratorio.
5. Precio del equipo	El precio del equipo determina la accesibilidad de realizar la prueba así como el precio aproximado de la prueba.

Continuación Cuadro 3. Descripción de cada parámetro evaluado para la selección del método

Método	Descripción del parámetro
6. Precio aproximado de prueba	Es determinado por el precio del equipo e influye en la accesibilidad de la prueba.
7. Determinación de MIC*	Indica la concentración mínima de un antibiótico con la que se puede combatir una bacteria, esta información es de gran importancia para tomar decisiones en cuanto al tratamiento.
8. Nuevos mecanismos	La detección de nuevos mecanismos de resistencia evita falso negativos debido a mutaciones y/o transferencia horizontal de genes.
9. Demanda	Establece la capacidad del equipo para realizar pruebas en un día y que rango de demanda puede cubrir. Esto influye dependiendo del hospital o el número de pacientes que el centro atiende.
10. Capacitación del personal	Indica el nivel de capacitación que debe recibir el personal para la correcta interpretación de los resultados.

A cada parámetro se le asignó un rango de puntos con los que luego se evaluó cada metodología. En el Cuadro 4. se observan las puntuaciones otorgadas, marcadas en color negro.

Cuadro 3. Puntuación de cada parámetros de evaluación del método

Parámetros	Puntuación				
	10-20	30-40	50-60	70-80	90-150
1. Base teórica		■			
2. Tipo de prueba			■		
3. Tiempo de detección					■
4. Equipo		■			
5. Precio del equipo				■	
6. Precio aproximado de prueba		■			
7. Determinación de MIC				■	
8. Detección de nuevos mecanismos de resistencia				■	
9. Demanda	■				
10. Capacitación del personal	■				
Puntuación máxima alcanzable					610

La puntuación fue otorgada acorde a la importancia del parámetro para la correcta ejecución, implementación y funcionalidad de la prueba. Es por ello que el tiempo de detección tiene un mayor rango de puntos (90-150) ya que es el parámetro más importante en cuanto a la funcionalidad e implementación de una prueba diagnóstica más rápida que la microbiología clásica, es vital que la metodología seleccionada sea rápida ya que esto ayudará a los médicos tratantes a dar medicamentos con mayor rapidez influyendo en la calidad de vida del paciente post-operado. Los dos parámetros con mayor puntuación luego de la rapidez del método son la determinación de MIC (parámetro 7) y detección de nuevos mecanismos de resistencia (parámetro 8), estos dos factores como se explicó anteriormente son de suma importancia para la toma de decisiones en cuanto al tratamiento que se va a dar al paciente (determinación de MIC) y para evitar falsos negativos (detección de nuevos mecanismos de resistencia). Otro parámetro que está dentro de éste rango de puntos es el precio del equipo, este nos indica la inversión inicial que debe realizar la institución interesada en implementar la prueba, además indica la disponibilidad del equipo dentro del laboratorio dónde se desarrolle la prueba y también afecta en la capacidad de obtenerlo o disponibilidad del equipo en el país. Para éste parámetro no se realizó un análisis económico ni ninguna proyección de inversión, sin embargo sí se compararon los precios de los diferentes equipos como un factor de gran importancia para la selección del método.

El tipo de prueba tiene una puntuación entre 50-60 puntos ya que este factor afecta directamente a los parámetros 7 y 8. Como parámetros de tercer nivel se encuentran el 1., 4., y 6., éstos ayudan a diferenciar entre las metodologías, cada uno de éstos parámetros influye en otro de mayor importancia y es por ello que la puntuación que se les otorga es baja. La base teórica del método afecta en el tipo de prueba por ende en la determinación de MIC y de nuevos mecanismos de resistencia, el equipo determina la rapidez y el precio del equipo, y el precio estimado de la prueba es un estimado de acuerdo a instituciones que realizan la prueba en forma de servicio con fines de comparación entre precios de mercado para cada metodología.

Los últimos dos parámetros son secundarios, y es por esto que tienen entre 10-20 puntos ya que afectan en la decisión final sobre la metodología a ser seleccionada y brindan información importante a la implementación de la técnica de forma rutinaria.

Es importante realizar una calificación semi-cuantitativa de cada parámetro, por esto se utiliza la rúbrica mostrada en el Cuadro 4 para cada uno de los parámetros explicados en el Cuadro 3 con

cada metodología. Se realiza también una suma de la puntuación para ayudar a determinar qué metodología es la más adecuada tomando en cuenta todas las características del método así como la capacidad económica para realizarlos y sobre todo la rapidez de resultados. En el Cuadro 5 se observa la calificación para cada metodología.

En el cuadro siguiente se observa la puntuación que fue otorgada para cada metodología, el máximo de puntos que puede obtener una técnica es de 610. En el cuadro también se observa el porcentaje que se obtuvo para cada metodología con respecto a la puntuación máxima.

Cuadro 4. Comparación entre métodos según rúbrica

Método	Difusión de disco	Microfluidos	Antibiograma con qPCR	PCR	MALDI-TOF MS ** (Comercial)	Microarreglos	WGS***	Lisis celular	Biomerieux Vitek	MicroScan Walk Away
Base	30	30	40	30	30	30	30	30	40	40
Tipo de prueba	50	55	60	50	50	50	50	55	55	55
Tiempo de detección	95	100	150	100	100	100	90	150	100	100
Equipo	40	30	40	30	30	30	30	30	40	40
Precio del equipo	80	70	75	80	70	80	75	80	70	70
Precio aproximado de prueba	40	30	30	40	40	30	40	30	30	30
Determinación de MIC*	80	70	80	70	70	70	70	75	70	80
Nuevos mecanismos	80	70	80	70	70	70	75	70	70	80
Demanda	15	20	15	10	20	15	15	10	20	20
Capacitación del personal	20	20	15	15	20	10	15	10	10	10
TOTAL	525	495	588	500	500	485	485	540	490	510
Porcentaje de 610	86.07	81.15	96.39	81.97	81.97	79.51	79.51	88.52	80.33	83.61

El método con un mayor indicador es el de antibiogramas por medio de qPCR, este método posee varias ventajas sobre los demás métodos que pueden dar un resultado en menos de 24hrs. El

parámetro del tiempo fue el que más contribuyó para la puntuación de ésta técnica con un porcentaje de 96.39%. El punto más importante es que es un híbrido entre los métodos fenotípicos y genotípicos por lo que aprovecha el equipo y la rapidez de los métodos basados en ADN/PCR y de los fenotípicos que facilitan la determinación de MIC y de nuevos mecanismos de resistencia. Además el precio del equipo es accesible y es un sistema abierto que permite realizar otras pruebas no relacionadas con la resistencia de bacterias, el precio aproximado por prueba es accesible y es un sistema abierto que permite realizar otras pruebas no relacionadas con la resistencia de bacterias.

Es importante resaltar que el antibiograma por qPCR tiene en términos de porcentajes, 7.87% más que el método siguiente. Ésta metodología tiene la rapidez necesaria en un hospital dónde la detección de infecciones nosocomiales de forma temprana debe realizarse con efectividad, además provee a los médicos con información importante para dar un tratamiento adecuado, tratamientos combinados y el uso correcto de antibióticos para combatir la infección eficientemente. El método provee información como la detección de nuevos mecanismos de detección que luego puede ser estudiados y caracterizando dando como fruto un nicho de investigación que no proveen otros métodos. La metodología se basa en la amplificación de una secuencia de ADN de la bacteria, es posible utilizar los productos de éste PCR para ser secuenciado. La secuenciación puede brindar más frutos y más riqueza a la investigación en el área de la microbiología, las secuencias se puede utilizar para formar una base de datos, y, en caso se detecten nuevos mecanismos de resistencia ya se tendrán datos que pueden ser analizados para la caracterización de dichos mecanismos. Por otro lado los amplicones secuenciados pueden ser utilizados como prueba de confirmación para la identificación de las bacterias, ya que la secuenciación toma tiempo no se recomienda utilizarla como prueba base para identificarlas, sino más bien como un complemento que ayude a confirmar la identificación y que pueda dar información importante tanto para el tratamiento de la enfermedad cómo para el hospital. Esto puede ser utilizado para estudiar casos particulares o brotes de bacterias que no han sido identificadas previamente en el centro de salud.

Los dos métodos con mayor puntuación luego del antibiograma por qPCR son el método de lisis celular con la segunda puntuación más alta (88.52%) y el método de difusión de disco (86.07%), la primer metodología es ventajosa ya que se puede hacer en un tiempo considerablemente rápido, sin embargo, tiene dos desventajas con respecto a la metodología de antibiogramas con qPCR, la primera y la más importante es que no puede terminar el MIC, la segunda es que al utilizar la microscopía limita la cantidad de pruebas simultáneas que se pueden

realizar y el control que se puede tener de variables específicas de la prueba. Por otro lado el método de difusión por disco tiene una alta puntuación ya que es un método fenotípico con el cual se puede determinar el MIC, nuevos mecanismos de resistencia y el precio es económico. La capacitación del personal es baja y se puede realizar una cantidad de pruebas media en un centro hospitalario. La gran desventaja de éste método es la rapidez, es por esto que aunque haya obtenido una puntuación alta, el método no fue elegido.

Por otro lado está el método de lisis celular con la segunda puntuación más alta, esta metodología es ventajosa ya que se puede hacer en un tiempo considerablemente más rápido, sin embargo, tiene dos desventajas con respecto a la metodología de antibiogramas con qPCR, la primera y la más importante es que no puede terminar el MIC, la segunda es que al utilizar la microscopía limita la cantidad de pruebas simultáneas que se pueden realizar y el control que se puede tener de variables específicas de la prueba. El tercer método más cercano es el de difusión de disco que aunque provee varias ventajas en cuanto a precio, determinación de MIC y de nuevos mecanismos de resistencia, la metodología es demasiado lenta y es por esto que se busca reemplazar. Existen otros métodos como el método comercial que utiliza la técnica MALDI-TOFMS que aunque es rápido el equipo tiene un precio muy alto, es un sistema cerrado donde no permite realizar otro tipo de pruebas y ya que se basa en una comparación con genes ya estudiados no permite establecer nuevos mecanismos de resistencia. Por otro lado están los métodos basados en microfluidos, estos también se incorporan a equipos comerciales por lo tanto realizar la prueba es fácil y económico, además se pueden evaluar una gran cantidad de pruebas en poco tiempo. Algunas de las desventajas de este tipo de prueba (para ambas metodologías comerciales), es que es necesario realizar un aislamiento de la bacteria previo a la metodología para la identificación y susceptibilidad a antibióticos lo que aumenta el tiempo de realización de la prueba en al menos 24hrs. Otras desventajas con respecto a estas metodologías es que están enfocadas en la identificación de la bacteria o diferenciación entre grupos grandes de las mismas, por ejemplo Gram positivo y Gram negativo, búsqueda de enterobacterias, etc. Esto es un inconveniente ya que para realizar pruebas de susceptibilidad se debe ya sea, agrandar la base de datos o adquirir partes adicionales al equipo comercial lo cual implica una mayor inversión inicial y un mayor costo para la prueba ya implementada.

El antibiograma por qPCR es una metodología híbrida entre los métodos fenotípicos y genotípicos que logra identificar la susceptibilidad con base en la comparación del crecimiento de la bacteria en la muestra en presencia de diferentes antibióticos con diferentes concentraciones. La detección es rápida ya que puede realizarse en menos de 24hrs, el equipo es capaz de detectar

varias muestras simultáneamente y se puede hacer hasta dos veces por día aumentando la capacidad del equipo brindando información esencial para brindar tratamientos adecuados. Además el equipo es accesible económicamente y para desarrollar el método y la prueba implementada no tienen precios muy elevados. Los productos del equipo tienen potencial en investigación y caracterización de resistencias.

Según los resultados encontrados el antibiograma por qPCR es la metodología más adecuada, es importante tomar en cuenta los retos de su implementación en un hospital de forma rutinaria. Son dos potenciales obstáculos que se deben resolver, los problemas pueden ser en la toma de muestra o en el diseño de la prueba. Los problemas en cuanto a la muestra implican que tipo de muestra se debe tomar, el potencial de contaminación, si el paciente está en un tratamiento de antibióticos previo o durante la toma de muestra y si el paciente presenta una infección mixta. En cuanto a la demanda laboral se debe resolver el diseño de la prueba, el uso de controles adecuados, la optimización de concentraciones de antibióticos a utilizar, la selección de antibióticos, concentraciones, controles y bacterias a utilizar y el tiempo de generación particular de cada bacteria.

En cuanto a la toma de muestra, esta debe ser tomada de acuerdo a los requerimientos del paciente. La toma de muestra por preferencia es sanguínea, sin embargo, hay casos en que la muestra, debido a la infección, debe ser tomada de esputo o de orina. En todos los casos la muestra debe ser tomada cuidadosamente y siguiendo el protocolo establecido para evitar contaminación de la muestra y falsos positivos. Un falso positivo causado durante la toma de muestra se observaría en la prueba con un crecimiento de la bacteria aunque el paciente no esté infectado, sin embargo, ya que se usan diferentes antibióticos a diferentes concentraciones durante la fase de crecimiento se disminuye la cantidad de falsos positivos, en el caso de encontrar un positivo con resistencia a alguno de los antibióticos es importante identificar y caracterizar dicha bacteria para estudiar la fuente de dónde proviene, ya sea del paciente o de una mala práctica en la toma de muestra. Por otro lado se debe tener en cuenta que la infección presentada por el paciente puede ser una infección mixta. La infección mixta no podrá ser detectada por la metodología en sí, al realizar la prueba se evaluaría la susceptibilidad a antibióticos, esta prueba puede dar como resultado una multiresistencia o resistencia a un solo antibiótico, ya que se determina la concentración mínima inhibitoria se puede realizar una recomendación tanto de los antibióticos a utilizar como de sus dosis. La identificación posterior de la bacteria causante de infección es de vital importancia ya que se puede establecer si la fuente de la resistencia o de la multiresistencia es de

una sola bacteria o de varias, en este caso la caracterización es vital para dar un mejor diagnóstico y tratamiento. El paciente puede estar tomando antibióticos ya sea por automedicación o prescrito por algún médico previo a la cirugía, si el paciente tiene antibióticos en su sistema esto afectaría directamente en el resultado. El antibiótico puede inhibir el crecimiento de otras bacterias al realizar la prueba, el crecimiento de la bacteria no sería adecuado y puede llegar a dar un falso negativo. Es de suma importancia conocer el historial médico del paciente previo a realizar la prueba, en caso de que este esté tomando algún antibiótico se debe evaluar la mejor forma de proceder dependiendo del estado del paciente, se puede dejar de tomar el medicamento o bien tomar en cuenta que el paciente está bajo el tratamiento para adecuar la prueba de la mejor forma.

El otro potencial problema son en cuanto al diseño de la prueba y la demanda laboral que se puede cumplir para realizarla. Esta prueba debe ser optimizada de tal forma que permita realizar la cantidad de pruebas necesarias dentro del hospital utilizando los controles adecuados. El primer punto crítico del diseño debe ser las bacterias que se van a estudiar, ya que se realiza una amplificación del gen 16S ARNr se detectarían todas las bacterias. Esto asume un tiempo de generación igual o parecido para todas las bacterias detectables. Por otro lado también es importante optimizar y tener controles para los antibióticos que serán evaluados, al seleccionar los antibióticos se debe tomar en cuenta las necesidades del hospital así como las concentraciones a las cuales se van a trabajar dichos antibióticos. Por lo tanto se deben tener controles de bacterias resistentes y no resistentes a los antibióticos seleccionados, además se debe optimizar la prueba para que las concentraciones a utilizar puedan dar un diagnóstico correcto y útil para los médicos tratantes. La fase de optimización es de suma importancia ya que brindará no solo la cantidad de controles, si no que la selección de antibióticos con sus concentraciones y de bacterias con que se va a trabajar. Esta optimización indicaría finalmente la cantidad de pruebas que se pueden realizar por corrida y el tiempo necesario de crecimiento inicial durante la prueba el cual maximice la eficiencia en cuanto a tiempo y número de pruebas a realizar.

Existe retos que deben ser resueltos para la implementación de dicha prueba a nivel hospitalario de forma rutinaria, se deben tomar en cuenta los factores discutidos y las necesidades del hospital dónde se implemente este método de detección, sin embargo, este método presenta ventajas en cuanto a tiempo, dinero y versatilidad del equipo por lo cuál es el método seleccionado para la detección de resistencia a antibióticos en infecciones nosocomiales.

VII. CONCLUSIONES

El método más eficiente para realizar un tamizaje de resistencia a antimicrobianos es el qPCR, además este método de presenta las ventajas de rapidez, especificidad y sensibilidad en comparación con otros métodos y determina factores importantes más allá de la detección de la resistencia, la determinación de MIC y puede detectar también nuevos mecanismos de resistencia. Además se realizó la propuesta en formato CONCYT para desarrollar el método y encontrar los parámetros óptimos para su funcionamiento adecuado y su consiguiente implementación.

VIII. RECOMENDACIONES

La metodología más adecuada para detectar resistencias bacterianas a antibióticos es por medio de antibiogramas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa de forma cuantitativa (qPCR), por lo que se recomienda realizar una propuesta de investigación con el objetivo de comprobar, desarrollar y ejecutar la prueba así como determinar los parámetros óptimos que serán utilizados más adelante en la realización rutinaria de la prueba.

También se recomienda realizar una confirmación sobre la identificación de la bacteria realizando secuenciación, este procedimiento contribuiría a construir una base de datos y posibilitaría nuevos estudios que abarquen la identificación de nuevos mecanismos de resistencia. Ésta secuenciación sería para confirmar la identificación brindada por otra metodología ya que la secuenciación es una toma tiempo y no es viable como una identificación bacteriana rápida.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Badave, G. K., & Kilkarni, D. 2015. «Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge». *Journal of Clinical Diagnostic Research*, 9(1), 08–09.

Barenfanger, J., Drake, C., & Kacich, G. 1999. «Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing». *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1415–1418.

Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. 2011. «*Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance». *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>

Brooke, J. S. 2012. «*Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen». *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 2–41. <http://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>

Bush, K. 2010. «Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections». *Critical Care*, 14, 224. <http://doi.org/10.1186/cc8892>

Capone, A.; Giannella, M.; Fortini, D.; Giordano, A.; Meledandri, M.; Ballardini, M.; Petrosillo, N. 2013. «High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality». *Clinical Microbiology and Infection*, 19. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12070>

Cazali, I. 2013. «Entrevista infecciones nosocomiales». *Unidad de Nosocomiales UNICAR*.

Chambers, H. F., & Deleo, F. R. 2010. NIH Public Access, 7(9), 629–641. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2200.Waves>

Chen, Y.-Y., Pesus, Y.-C., & Pesus, C. 1994. «Impact of nosocomial infection on cost illness and length of stay in intensive care units». *Journal of Clinical Microbiology*, 32(12), 3002 – 3007.

Custovic, A., Smajlovic, J., Tihic, N., Hadzic, S., Ahmetagic, S., & Hadzagic, H. 2014. «Epidemiological Monitoring of Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter Baumannii*». *Medical Archives*, 68(6), 402. <http://doi.org/10.5455/medarh.2014.68.402-406>

Dave, S. B., Toma, H. S., & Kim, S. J. 2011. «Ophthalmic antibiotic use and multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis*: A controlled, longitudinal study». *Ophthalmology*, 118(10), 2035–2040. <http://doi.org/10.1016/j.optha.2011.03.017>

de Kraker, M. E. a, Davey, P. G., & Grundmann, H. 2011. «Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe». *PLoS Medicine*, 8(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001104>

Doern, G. V., Vautour, R., Gaudet, M., & Levy, B. 1994. «Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification». *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1757–1762.

Ducel, G. Fabry, J. Nicolle, L. Girard, R. Perraud, M. Prüss, A. Savey, a. 2009. «Prevención de las infecciones nosocomiales». *Who.int*, 2, 70. <http://doi.org/10.1590/S0036-36341999000700012>

Fluit, A., Visser, M., & Schmitz, F. 2001. «Molecular detection of antimicrobial resistance». *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 836–871. <http://doi.org/10.1128/CMR.14.4.836>

Georgios, M., Egki, T., & Effrosyni, S. 2014. «Phenotypic and Molecular Methods for the Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram Negative Nosocomial Pathogens». In *Tends in Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.5772/57062>

Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P. 2015. «Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 81, 264–268. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.003>

Gold, W. L., & Salit, I. E. 2006. «*Aeromonas hydrophila*». 1357–1360.

Grajeda, G. 2015. Entrevista tasa de infección. *Unidad de pediatría UNICAR*.

Hermann, T. 2007. «Aminoglycoside antibiotics: Old drugs and new therapeutic approaches». *Cellular and Molecular Life Sciences*. <http://doi.org/10.1007/s00018-007-7034-x>

Iregui, M., Ward, S., Sherman, G., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. 2007. «Clinical Importance of Delays in the Initiation of Appropriate Antibiotic Treatment for Clinical Importance of Delays in the Initiation of Appropriate Antibiotic Treatment for Ventilator-Associated Pneumonia». <http://doi.org/10.1378/chest.122.1.262>

Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P. L., Billig, M., Sokurenko, E. V. 2013. «Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*». *Journal of Infectious Diseases*, 207, 919–928. <http://doi.org/10.1093/infdis/jis933>

Kahlmeter, G., & Poulsen, H. O. 2012. «Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: The ECO·SENS study revisited». *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(1), 45–51. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.013>

Livermore, D. M. 2002. «Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?» *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34, 634–640. <http://doi.org/10.1086/338782>

Longhi, C.; Conte, M. P.; Marazzato, M.; Iebba, V., Totino, V., Santangelo, F.; Comanducci, a. 2012. «Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in *Escherichia coli* from community uncomplicated urinary tract infection in an area of high prevalence of quinolone resistance». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 1917–1921. <http://doi.org/10.1007/s10096-011-1521-6>

Longo, G., Alonso-Sarduy, L., Rio, L. M., Bizzini, A., Trampuz, A., Notz, J.; Kasas, S. 2013. «Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors». *Nature Nanotechnology*, 8, 522–6. <http://doi.org/10.1038/nnano.2013.120>

Oliphant, C., & Green, G. 2002. «Quinolones: A Comprehensive Review». *American Family Physician*, 65(3), 455–465. Retrieved from <http://www.aafp.org/afp/2002/0201/p455.html>

Organización Panamericana de la Salud. 2011. «Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos 2009». <http://doi.org/978-92-75-33194-1>

Oteo, J., Cercenado, E., Vindel, A., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Saéz, D.; Campos, J. 2013. «Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit». *Journal of Medical Microbiology*, 62, 571–575. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.053017-0>

Park, S. Y., Kang, C.-I., Joo, E.-J., Ha, Y. E., Wi, Y. M., Chung, D. R.; Song, J.-H. 2012. «Risk factors for multidrug resistance in nosocomial bacteremia caused by extended-spectrum β -

lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*». *Microbial Drug Resistance* (Larchmont, N.Y.), 18(5), 518–24. <http://doi.org/10.1089/mdr.2012.0067>

Patra, S., Bhat Y, R., Lewis, L. E., Purakayastha, J., Sivaramaraju, V. V., Kalwaje E, V., & Mishra, S. 2014. «*Burkholderia cepacia* Sepsis Among Neonates». *The Indian Journal of Pediatrics*. <http://doi.org/10.1007/s12098-014-1473-9>

Perez, F., Rudin, S. D., Marshall, S. H., Coakley, P., Chen, L., Kreiswirth, B. N., ... Bonomo, R. a. 2013. «OqxAB, a quinolone and olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4602–4603. <http://doi.org/10.1128/AAC.00725-13>

Poole, K. 2011. «*Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max». *Frontiers in Microbiology*, 2(April), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>

Pulido, M. R., García-Quintanilla, M., Martín-Peña, R., Cisneros, J. M., & McConnell, M. J. 2013. «Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(June), 2710–2717. <http://doi.org/10.1093/jac/dkt253>

Sanchez, G. V., Master, R. N., Clark, R. B., Fyyaz, M., Duvvuri, P., Ekta, G., & Bordon, J. 2013. «*Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998-2010». *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 133–136. <http://doi.org/10.3201/eid1901.120310>

Schmieder, R., & Edwards, R. 2012. «Insights into Antibiotic Resistance Through Metagenomic Approaches». *Future Microbiology*, 7(1), 73–89.

Snitkin, E. S., Zelazny, a. M., Thomas, P. J., Stock, F., Henderson, D. K., Palmore, T. N., & Segre, J. a. 2012. «Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing». *Science Translational Medicine*, 4, 148ra116–148ra116. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004129>

Standars, A. 2011. «Antimicrobial resistance learning site». Retrieved May 5, 2015, from <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/detecting-antimicrobial-resistance/approaches-and-strategies/approaches-and-strategies-in-detecting-antimicrobial-resistance>.

Tadesse, D. a., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., & McDermott, P. F. 2012. «Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002». *Emerging Infectious Diseases*, 18(5), 741–749. <http://doi.org/10.3201/eid1805.111153>

Trenholme, G. M., Kaplan, R. L., Karakusis, P. H., Stine, T., Fuhrer, J., Landau, W., & Levin, S. 1989. «Susceptibility testing of bacterial blood culture Clinical Impact of Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacterial Blood Culture Isolates». *27*(6), 1342–1345.

Trust, T. J., & Chipman, D. C. 1979. «Clinical involvement of *Aeromonas hydrophila*». *Canadian Medical Association Journal*, *120*, 942–946.

Tzouveleakis, L. S., Markogiannakis, a., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. 2012. «Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions». *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 682–707. <http://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>

UNICAR. 2012. «Historia de Unidad de Cirugía Cardiovascular de Guatemala UNICAR». Retrieved from <http://www.unicargt.org/historia.html>

Waldeisen, J. R., Wang, T., Mitra, D., & Lee, L. P. 2011. «A real-time PCR antibiogram for drug-resistant sepsis». *PLoS ONE*, *6*(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028528>

Weinstein, R. 1998. «Nosocomial Infection Update». *Emerging Infectious Diseases*, *4*(3), 416–420. <http://doi.org/10.3201/eid0403.980320>

WHO (World Health Organization). 2015. «Drug resistance». Retrieved May 5, 2015, from WHO. 2015. “Drug resistance”. World Health Organization. http://www.who.int/drugresistance/Antimicrobial_Detection/en/

Woodford, N., & Sundsfjord, A. 2005. «Molecular detection of antibiotic resistance: when and where?» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(2), 259–261.

X. ANEXOS

Acorde a la selección del método, se procedió a realizar la propuesta de investigación, para dicha propuesta se utilizó el formato solicitado por CONCYT. La propuesta incluye referencias bibliográficas, figuras y cuadros con formato y numeración propios al documento. El objetivo de la propuesta "Desarrollo de prueba diagnóstica molecular para detección de resistencia a antibióticos en menos de treinta horas en la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR)", es recaudar fondos para poder desarrollar la metodología seleccionada y adaptarla a las necesidades del hospital cómo un servicio que contribuya a mejorar el servicio brindado por el mismo.



ID-R-0002

SOLICITUD DE APOYO FINANCIERO LÍNEA FODECYT

CÓDIGO DE INGRESO

(Designado por SENACYT)

1. INFORMACIÓN GENERAL:

1.1 Título del proyecto:

"Desarrollo de prueba diagnóstica molecular para detección de resistencia a antibióticos en menos de treinta horas en la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR)"

1.2 Monto solicitado al FONACYT: **Q.**

Monto de contrapartida: **Q.**

Monto de otras fuentes: **Q.**

LLENADO

1.3 Tipo de proyecto: **(Seleccionar un solo tipo)**

Investigación básica

Investigación aplicada

Desarrollo experimental

Innovación tecnológica

1.4 Disciplina científica: **(Seleccionar solo una que sea la predominante en el proyecto)**

actualizar disciplinas

<input type="checkbox"/>	Ciencias naturales y exactas	<input type="text" value="Ciencias biológicas"/>
<input type="checkbox"/>	Ingeniería y tecnología:	<input type="text"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Ciencias médicas:	<input type="text" value="Ciencias de la salud"/>
<input type="checkbox"/>	Ciencias agrícolas:	<input type="text"/>
<input type="checkbox"/>	Ciencias sociales:	<input type="text"/>
<input type="checkbox"/>	Humanidades:	<input type="text"/>

1.5 Sector (comisión sectorial) afin al proyecto:

1 Agropecuaria	<input type="checkbox"/>	6 Industria	<input type="checkbox"/>	1 Energía	<input type="checkbox"/>
2 Biotecnología	<input checked="" type="checkbox"/>	7 Informática	<input type="checkbox"/>	1 Recursos Humanos	<input type="checkbox"/>
3 Construcción	<input type="checkbox"/>	8 Medio Ambiente	<input type="checkbox"/>	1 Popularización	<input type="checkbox"/>
4 Ciencias básicas	<input checked="" type="checkbox"/>	9 Ciencias de la Tierra el océano y el espacio	<input type="checkbox"/>	1 Inventores	<input type="checkbox"/>
5 Calidad	<input type="checkbox"/>	10 Salud	<input checked="" type="checkbox"/>	1 Otra	<input type="checkbox"/>

1.6 Clasificador temático:

CLASIFICADOR TEMATICO

1.7 Duración meses

1.8 Objetivo socioeconómico: (Consignar solamente un objetivo)

- | | | | |
|-------------------------------------|---|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | Exploración y explotación de la tierra | <input type="checkbox"/> | Producción y tecnología industrial |
| <input type="checkbox"/> | Infraestructuras y ordenación del territorio | <input type="checkbox"/> | Estructuras y relaciones sociales |
| <input type="checkbox"/> | Control y protección del medio ambiente | <input type="checkbox"/> | Exploración y explotación del espacio |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Protección y mejora de la salud humana | <input type="checkbox"/> | Investigación no orientada |
| <input type="checkbox"/> | Producción, distribución y utilización racional de la energía | <input type="checkbox"/> | Otras investigaciones civiles (seguridad ciudadana, justicia y paz) |
| <input type="checkbox"/> | Producción y tecnología agrícola | <input type="checkbox"/> | Defensa |

1.9 Población a beneficiar:

Descríbala:

Si bien el proyecto se origina en una población específica, los productos a desarrollar pueden llegar a tener aplicación en poblaciones análogas en otros centros hospitalarios a largo plazo. Inicialmente, se está enfocando el trabajo hacia los pacientes pediátricos en la UNICAR. Parte de la misión de dicha institución es atender en el área de cardiología especialmente a niños de escasos recursos (muchas veces neonatos y niños en la primera infancia). Los pacientes post-operatorios tienen riesgo de contraer infecciones nosocomiales debido a su edad, estado nutricional, y a los procedimientos quirúrgicos que deben realizarse para salvar sus vidas. Por lo que es requerido contar con técnicas diagnósticas para dichas infecciones, que permitan el diagnóstico a tiempo para brindar el tratamiento apropiado lo más rápido posible. El desarrollo (e implementación a futuro) de pruebas rápidas, que consideren los recursos disponibles, serán de beneficio directo a esta población, y al hospital, porque incidiría en permitirle al personal de salud contar con la información para brindar un tratamiento más rápido que con las técnicas actuales: se disminuiría la tasa de mortalidad y tiempo de cuidados hospitalarios, se reducirían los costos por uso de la unidad de cuidados intensivos.

Población estimada a beneficiar directamente (en números)						
Sexo	Etnia	0-13 (Niñez)	14-17 (Adolescencia)	18-60 (Adultos)	61 en adelante (3ra. Edad)	Total
Hombres	Mayas					0
	Xincas					0
	Garífunas					0
	Mestizo	450				0
	Otro					0
	TOTAL		0	0	0	0
Mujeres	Mayas					0
	Xincas					0
	Garífunas					0
	Mestizo	450				0
	Otro					0
	TOTAL		0	0	0	0

SUMAR

1.10 Investigadores:

Mostrar opciones

1.10.1 Responsable de ejecutar el proyecto* (Investigador principal):

CÓDIGO-RNI- 9028

Información personal

Nombre completo: Lucía Nitsch Velásquez

Dirección personal: 6 avenida 8-25 zona 2

Teléfono: 22541311 Correo Electrónico escucha_al_viento@yahoo.com

Número de celular: 59784317

*Adjuntar curriculum vitae actualizado.

Sexo: Mujer

Rango de edad: 18-60

Etnia: Otro

Información laboral

CÓDIGO-RIDU-179

Nombre de la institución: Universidad del Valle de Guatemala
Dirección: 18 avenida 11-95 zona 15 Vista Hermosa 3
Teléfono: 13640336 Ext. 385, 301 Página Web: www.uvg.edu.gt
Correo institucional: lnitsch@uvg.edu.gt

1.10.2 Investigador asociado*:

CÓDIGO-RNI-3096

Información personal

Nombre completo: Dalia Mei Ling Lau Bonilla
Dirección personal: Boulevard Minerva 8-80 Valle Nuevo No. 291, zona 11,
Mixco teléfono: Correo
Electrónico: laubonilladml@yahoo.com
Número de Celular: 5720 6615

**Adjuntar curriculum vitae actualizado.*

Sexo: F Rango de edad: 16-60 Etnia:

Información laboral

CÓDIGO-RIDU-179

Nombre de la institución: Universidad del Valle de Guatemala Dirección: 18
avenida 11-95 zona 15 Vista Hermosa 3
Teléfono: Página Web: www.uvg.edu.gt
Correo institucional: dmlau@uvg.edu.gt

2. CARTA DE MANIFESTACIÓN DE DEMANDA PARA LA ATENCIÓN DEL PROBLEMA DETERMINADO: (No aplica a investigación básica)

Guatemala, 22 de junio de 2015.

*Señores Miembros del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Guatemala, Guatemala*

Por este medio les manifiesto que en el sector salud se ha identificado desde 2009 el problema consiste en que es necesario reducir el tiempo que toma realizar las pruebas diagnósticas de infección bacteriana por los métodos de microbiología clásica, en especial en pacientes postoperatorios pediátricos, para que tengan una mejor calidad y prospección de vida, y también se optimicen recursos hospitalarios. Razón por la cual es importante para nuestra organización Unidad de Cardiología Pediátrica que el proyecto: "Desarrollo de pruebas de detección de resistencia a antibióticos por medio de antibiogramas de qPCR para las bacterias nosocomiales reportadas por la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR)" Se ejecute, con lo cual el problema identificado podría verse resuelto parcial o totalmente.

Unidad de Cardiología Pediátrica

Nombre de la institución

Sello de la institución:

Firma de la máxima autoridad y/o
Representante legal de la Institución

Dr. Aldo Castañeda
Jefe Departamento de Pediatría Unicar

Nombre de la autoridad responsable de la
Institución

3. AVAL Y CONSTANCIA DE APOYO INSTITUCIONAL:

***LINEA FODECYT
Aval y Constancia de Apoyo Institucional***

Guatemala, 22 de junio de 2015.

*Señores Miembros del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Guatemala, Guatemala*

Por este medio hago constar que Lucía Nitsch Velásquez presentó a esta institución el proyecto denominado: "Desarrollo de pruebas de detección de resistencia a antibióticos por medio de antibiogramas de qPCR para las bacterias nosocomiales reportadas por la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR)"

Debido a la importancia que tiene para nuestra institución este proyecto, se le otorga el aval institucional correspondiente. Así mismo, nuestra institución se compromete a dar el apoyo requerido para que se alcancen los objetivos indicados, incluyendo la supervisión y evaluación del mismo, independientemente de las que realicen la SENACYT. Además se compromete a brindar como aporte de contrapartida para la ejecución de proyecto lo siguiente:

Aporte financiero: 0.00_____

Aporte en especie: 416,175_____

En caso de incumplimiento, nos sometemos a las disposiciones emanadas del CONCYT.

Universidad del Valle de Guatemala

Nombre de la Institución

Firma de la máxima autoridad y/o
Representante legal de la Institución

Sello de la Institución:

Rector. M.A. Roberto Moreno Godoy

Nombre de la autoridad responsable de la
Institución

4. CONSTANCIA DE FINANCIAMIENTO DE OTRAS FUENTES: (Llenar la forma de Aval y Constancia de financiamiento siguiente, si aplica)

***LINEA FODECYT
Aval y Constancia de Otras Fuentes de Financiamiento***

Guatemala, __de_____de 20__.

*Señores Miembros del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Guatemala, Guatemala*

Por este medio hago constar que Lucía Nitsch Velásquez _____
Nombre de la persona responsable del proyecto

Presentó el proyecto denominado:
Desarrollo de pruebas de detección de resistencia a antibióticos por medio de
antibiogramas de qPCR para las bacterias nosocomiales reportadas por la unidad de
pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR)
Debido a la importancia que tiene para nuestra institución este proyecto, daremos
el apoyo requerido para que se alcancen los objetivos indicados y como
contrapartida para la ejecución del proyecto aportaremos lo siguiente:

Aporte financiero: 0.00_____
Aporte en especie: 416,175_____

Universidad del Valle de Guatemala

Nombre de la Institución

Firma de la máxima autoridad y/o
Representante legal de la Institución

Sello de la Institución:

Rector. M.A. Roberto Moreno Godoy

Nombre de la autoridad responsable de la
Institución

5. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO: (Resumen ejecutivo).

5.1. TÍTULO

medio de antibiogramas de qPCR para las bacterias nosocomiales reportadas por la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular (UNICAR)

5.2. RESUMEN

El uso de antibióticos en infecciones nosocomiales se ve limitado por la existencia de resistencia que desarrollan las bacterias patógenas a estas drogas. Existen más de tres familias de antibióticos con una gran variedad de drogas agrupadas en cada una, sin embargo, igualmente variados son los mecanismos de resistencia que presentan las cepas bacterianas. En la unidad de pediatría de la unidad de cirugía cardiovascular de Guatemala (UNICAR), se resalta la importancia de obtener resultados rápidos y certeros en cuanto a las resistencias a antibióticos ya que existen altas tasas de infecciones y estas deben ser tratadas a tiempo y eficazmente. Se ha demostrado que reducir el tiempo de detección disminuye las tasas de mortalidad, costos de cuidados post-operatorios y de estadía en el hospital. La aplicación de métodos novedosos es limitada, principalmente por barreras como la falta de detección de nuevos mecanismos de resistencia y la poca capacidad para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), por lo que los métodos más utilizados, a pesar de los largos períodos de incubación, siguen siendo típicos. El uso de antibiogramas por qPCR, logra detectar la resistencia desde un acercamiento fenotípico, así como el MIC y reducir el tiempo de la prueba a menos de 24hrs, realizando un híbrido entre los métodos fenotípicos y genotípicos.

5.3. OBJETIVOS:

5.3.1. Objetivo general

ales de UNICAR, aplicando la técnica de antibiogramas, en diferentes tipos de muestra.

5.3.2. Objetivos específicos

1. Implementar la detección de la resistencia a al menos un antibiótico de cada familia por el método de antibiogramas de qPCR.
2. Implementar la detección de resistencia a antibióticos por el método de antibiogramas de qPCR en menos de 24hrs.

5.4. RESULTADOS ESPERADOS

Se espera obtener un protocolo estandarizado para una prueba diagnóstica molecular de detección de resistencia bacteriana a al menos ocho antibióticos representativos tanto de las familias de antibióticos como de los tratamientos usualmente disponibles en los hospitales (beta-lactamasas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, MLS, glucopéptidos, tetraciclinas, trimetroprimas y cloranfenicol). El protocolo estará basado en la técnica de de antibiogramas por qPCR. También se espera que la prueba se pueda realizar en menos de 24hrs.

5.5. IMPACTO DEL PROYECTO

Este es un proyecto de investigación, desarrollo y aplicación de pruebas diagnósticas de bacterias nosocomiales, que sean más rápidas que las actuales y de costo optimizado a los recursos del país. Por lo tanto consiste en varias fases, siendo ésta la de desarrollo de la prueba a resistencia a antibióticos, cuyo efecto es a mediano plazo. El presente proyecto representa un punto crítico para el impacto en los pacientes, puesto que permitirá determinar las condiciones de la reacción, viabilidad para todas las cepas consideradas, entre otros factores. La siguiente fase será validar la metodología con pacientes operados en UNICAR. El impacto a mediano plazo es directo a los pacientes de dicha institución, con el potencial de aplicación a otras unidades hospitalarias. Con una prueba diseñada adecuadamente, los pacientes tendrán mejores pronósticos de vida pues se les podrá responder de mejor forma a infecciones luego de la operación. Por otro lado el proyecto de investigación impacta al hospital ya que se disminuirán los costos de cuidados de los pacientes.

6. DESARROLLO DEL PROYECTO:

6.1. Resumen del proyecto

El uso de antibióticos en infecciones nosocomiales se ve limitado por la resistencia que desarrollan las bacterias a estas drogas. Existen más de 3 familias de antibióticos con una gran variedad de drogas agrupadas en cada una, sin embargo, igualmente variados son los mecanismos de resistencia que se presentan en las cepas bacterianas. En la unidad de pediatría de UNICAR se resalta la importancia de obtener resultados rápidos y certeros en cuanto a las resistencias a antibióticos ya que existen altas tasas de infecciones y estas deben ser tratadas a tiempo y de manera eficaz. Se ha demostrado que reducir el tiempo de detección disminuye las tasas de mortalidad, costos de cuidados post-operatorios y de estadía en el hospital. La aplicación de métodos novedosos es limitada, principalmente por barreras como la falta de detección de nuevos mecanismos de resistencia y la poca capacidad para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), por lo que los métodos más utilizados, a pesar de los largos períodos de incubación, siguen siendo fenotípicos. El uso de antibiogramas por qPCR, logrará detectar la resistencia desde un acercamiento fenotípico, así como el MIC y reducir el tiempo de la prueba a menos de 24 horas, realizando un híbrido entre los métodos fenotípicos y genotípicos

6.2. Palabras clave

antibiograma resistencia antibióticos qPCR infecciones nosocomiales postoperatorio técnica diagnóstica molecular

6.3. Introducción

En la unidad de cirugía cardiovascular de Guatemala (UNICAR) se realizan alrededor de 300 cirugías en el área de pediatría al año y el número de procedimientos crece año con año. Desempeñando sus funciones desde los años 70's, el hospital es de gran importancia a nivel nacional y regional al ser una unidad pionera en cirugía cardiovascular pediátrica (UNICAR, 2012). Además de ser financiada por el gobierno, las donaciones de instituciones no lucrativas como la fundación Aldo Castañeda o la fundación Ronald McDonald, contribuyen a realizar los procedimientos quirúrgicos necesarios (UNICAR, 2012). La labor de dicha institución y la colaboración con otras hace que este hospital tenga un nicho único de pacientes, tanto por su especialización en el área pediátrica como por el sector socioeconómico que atiende.

En el hospital, como en muchos otros, los problemas de infecciones adquiridas intrahospitalariamente (infecciones nosocomiales, IN) tienen un gran impacto en el pronóstico de vida de los pacientes (Chen, 1994; Cazali, 2013) En la Figura 1. en la sección de Anexos se resalta la necesidad de este proyecto, que nace como continuación de "Desarrollo de pruebas moleculares para la detección de bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensivo pediátrico de UNICAR". uno de los factores más importantes por los que ocurren las IN en pacientes postoperatorios es la inmunosupresión de los pacientes tras la intervención quirúrgica. Este tipo de paciente, de por sí está en un proceso de cicatrización y afrontando los riesgos asociados a la cirugía propiamente (cabe mencionar que UNICAR ha reducido este riesgo a 10% de mortalidad, comparable al de países desarrollados). Por lo que una IN tiene más probabilidad de ocurrir y un impacto mayor, que en pacientes postoperatorios de otras áreas del hospital, porque pone en riesgo la vida del paciente. Se han reportado casos fatales de IN, en varios de ellos por resistencia bacteriana. Las IN disminuyen el pronóstico y calidad de vida de un paciente, especialmente en la unidad de pediatría, por tratar a infantes (Chen, 1994). Se ha demostrado que una detección temprana tanto de las bacterias como de los patrones de sensibilidad a antibióticos reduce la tasa de mortalidad, costos de cuidados y tiempo de estadía en el hospital (Doern *et al.*, 1994). Esto está intrínsecamente relacionado a la fisiología bacteriana, puesto que el tratamiento es más efectivo previo a que el crecimiento bacteriano llegue a crecimiento exponencial. Por lo que es altamente recomendado realizar dichas detecciones tempranas de manera sistemática en los pacientes que se consideran más susceptibles (*e.g.* pediátricos postoperatorios) o aquéllos que presentan síntomas subclínicos de infección, para así implementar tratamientos adecuados y de forma efectiva contra los microorganismos que infectan al paciente (Weinstein, 1998). Esto ayuda a los médicos encargados a tomar decisiones más rápidamente, que serían más acertadas y adecuadas para cada paciente.

A nivel global, existe un aumento en la frecuencia de bacterias resistentes a antibióticos, lo cual representa un riesgo latente para la humanidad, el cual debe ser atendido desde ya. Entre las estrategias que propone la organización mundial de la salud, está la detección más rápida de bacterias y su resistencia a drogas, a fin de proveer tratamientos adecuados y oportunos, que mejoren el pronóstico de vida de los pacientes (WHO, 2015). Una variedad de tecnologías se han aplicado o han sido desarrolladas para cumplir con este propósito, sin embargo, aún no se ha reemplazado el estándar de oro (*Gold Standard*) dado por la microbiología clásica: la utilización de métodos fenotípicos para la detección de resistencia a drogas, siendo la difusión por disco la prueba más representativa (AST Standards, 2011). Los métodos que han intentado disminuir el tiempo de determinación de susceptibilidad a antibióticos se basan en una amplia variedad de técnicas, por ejemplo: métodos basados en PCR, espectrometría de masas, microarreglos, microfluidos, lisis celular y

secuenciación del genoma. Aunque las ventajas y desventajas son diversas, las limitaciones generales pueden concretarse a la detección de bacterias y su capacidad de resistencia **en al menos 24 horas**, la detección de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana, y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de antibióticos (Pulido *et al.*, 2013). Siendo el factor tiempo, un punto crucial para el tratamiento, las nuevas técnicas diagnósticas deben batir el record de 24 horas.

Las técnicas diagnósticas basadas en biología molecular son una opción a considerar, puesto que pueden cumplir con el requerimiento de tiempo y especificidad. Requiriendo investigación y desarrollo de las mismas. En este proyecto, se busca obtener el antibiograma a partir de cuantificar bacteria, tanto en ausencia como en presencia de antibióticos, midiendo la cantidad de ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) bacteriano, una modificación planteada por Pulido (et. Al. 2013). Para ello se utilizará la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o cuantitativo (qPCR), el cual supera las barreras planteadas(Pulido *et al.*, 2013). En breve, se expone al material infeccioso (e.g. sangre) a diferentes antibióticos y concentraciones de los mismos, para después cuantificar el gen bacteriano 16S ARNr a través de qPCR., de Resultando en un antibiograma con el cual se puede determinar la MIC, patrones de susceptibilidad y resistencia, utilizando la muestra directamente.. Este método (Antibiograma por qPCR) toma la ventaja de la rapidez de los métodos moleculares qPCR y de los métodos fenotípicos, logrando además superar a barrera de detectar nuevos mecanismos de resistencia (Waldeisen *et al.*, 2011).

6.4. Estado del arte

6.4.1 Marco teórico

I. Antibióticos su función y mecanismo de resistencia reportados

Existe una gran variedad de antibióticos, estos se dividen en familias dependiendo de su estructura y su forma de acción. Ya que cada familia ataca algún componente bacteriano diferente, las bacterias también desarrollan mecanismos de resistencia acordes a cada antibiótico implicando a la vez, métodos variados de detección. Algunas resistencias se deben a enzimas bacterianas que inactivan la droga, otras por mutaciones o modificaciones post-traduccionales que disminuyen la afinidad de la enzima por la droga o bien bombas de eflujo que expulsan la droga hacia el exterior de la célula (Fluit *et al.*, 2001). En el Cuadro 1. a continuación, se pueden observar 8 familias de antibióticos, su forma de acción, las resistencias que han sido reportadas, un antibiótico que representa la familia y algunos métodos de detección moleculares que se proponen o se utilizan según la literatura.

Cuadro 1. Antibióticos, familia, acción, resistencia, antibiótico representativo de la familia y métodos moleculares de detección reportados.

Familia	Acción	Resistencia	Antibiótico representativo	Métodos de detección reportado en la literatura
Betalactámicos	Inhiben la síntesis de la pared celular (Bush, 2010).	La enzimas betalactamasas, hidrolizan el medicamento. Otro mecanismo es la reducción de la afinidad de Proteínas de unión a penicilina (PBPs). Y bombas de eflujo. La resistencia a esta familia se clasifica en varios grupos según su secuencia genética: A. Activa contra beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL), C. Actúa cuando hay sobreexpresión. D. Hidrolizan oxalicina, B. Actúa contra penicilinas y cefalosporinas. (Fluit et al., 2001; Bush, 2010).	Meticilina, penicilina, beta-lactamasas comunes, ESLB y metalo beta-lactamasas	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para genes específicos. Inmunoensayos. PCR de plásmidos. Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (PCR-SSCP). Electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE). PCR multiplex. (Fluit et al., 2001; Bush, 2010)
Aminoglucósidos	Inhiben síntesis de proteínas, se unen a los ribosomas bacterianos (Hermann, 2007)	Hay tres tipos de resistencia: *Aminoglucósido acetil-transferasa (ACC), Aminoglucósido adenilil transferasa (ANT) y Aminoglucósido fosfotransferasa (APH), las tres formas modifican la droga y esta ya no puede realizar la acción. Hay también reportadas resistencias por mutaciones en el ribosoma y bombas de eflujo (Fluit et al., 2001; Hermann, 2007).	Gentamicina	PCR. Electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE). PCR múltiplex. Microarreglos (Fluit et al., 2001; Hermann, 2007).
Fluoroquinolonas	Inhibe la topoisomerasa II o IV lo cual afecta la replicación y mantenimiento del microorganismo (Fluit et al., 2001).	Alteraciones en la enzima que disminuyen la afinidad en la región determinante de la resistencia a quinolona (QRDR). Bombas de flujo (Fluit et al., 2001; Oliphant y Green, 2002).	Ciprofloxacina	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción(RFLP). Secuenciación. PCR. PCR alelo específico (Fluit et al., 2001; Oliphant y Green, 2002).
Macrólidos, lincosamida y estreptogramina (MLS)	Inhibe la síntesis de proteínas al unirse al ARNr 23S (Fluit et al., 2001).	Mutaciones en el gen 23S ARNr y en genes <i>mef</i> que previene la unión de la droga a la ribozima (Fluit et al., 2001)	Eritromicina	PCR aunque no es recomendado por lo que los métodos moleculares no son prácticos para determinar dicha resistencia (Fluit et al., 2001).
Glucopéptidos	Unión a cadenas de peptidoglicanos lo cuál destruye al pared celular (Fluit et al., 2001).	Peptidoglicanos cambian de D-alanil-Dlactato a D-alanil-Dserina (Fluit et al., 2001).	Vancomicina	PCR (Fluit et al., 2001).
Tetraciclinas	Inhibe la síntesis de proteínas a partir de la unión a la ribozima ARNr 30S.	Existen hasta 20 resistencias diferentes a tetraciclina y 3 a oxitetraciclinas Algunos mecanismos son bombas de eflujo y protección del ribosoma (Fluit et al., 2001).	Tetraciclina	Hibridación ADN-ADN. PCR. (Fluit et al., 2001).
Trimetroprima	Inhibición competitiva con ácido dihidrofólico, por lo que inhiben la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), necesaria para la síntesis de purinas y algunos aminoácidos (Fluit et al., 2001).	Mutaciones en DHFR, adquisición de genes de resistencia y sobreproducción de enzima (Fluit et al., 2001).	Trimetroprima sulfametoxanol.	PCR, aunque la variabilidad de los mecanismos ha hecho que estos métodos no sean prometedores (Fluit et al., 2001).
Cloranfenicol	Inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a ARNr 50S (Fluit et al., 2001).	Bombas de eflujo y acetiltransferasas (Fluit et al., 2001).	Cloranfenicol	No se han generado métodos moleculares efectivos para detectar éstas resistencias (Fluit et al., 2001).

II. Mecanismos de resistencia a antibióticos por cada bacteria

A continuación se observa un cuadro donde se resaltan las resistencias reportadas para las bacterias más frecuentes en UNICAR. Aunque en Guatemala no hay datos actualizados sobre las resistencias de cada una de éstas bacterias, los mecanismos reportados son comunes para cada especie por lo que es importante tomar en cuenta los reportes internacionales. Dada la resistencia se pueden establecer metodologías para una detección generalizada de las mismas.

Cuadro 2. Resistencias reportadas para las bacterias más frecuentes en UNICAR.

Bacteria	Resistencias reportadas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a múltiples drogas (MDR). Más frecuentemente beta-lactámicos clase A, B C y D, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas (Pérez et al., 2007; Badave y Dhananjay, 2015)..
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Beta- lactámicos, tetraciclinas, trimetroprina.
<i>Burkholderia cepacia</i>	Aminoglucósidos, quinolonas y algunos beta-lactámicos (Patra et al., 2013; Tseng et al., 2014)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Beta-lactámicos y ESBL. (Girlich, Poirel y Nordmann, 2014)
<i>Escherichia coli</i>	Cefalosporinas, ESLB, Quinolonas y trimetroprina (Jhonson et al., 2012; Park et al)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL. Carbapenem (Tzouveleklis et al., 2015). Tetraciclina (Sanchez et al., 2013).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem (Livermore, 2015; Breinsetein et al., 2011; Poole, 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Comunidad asociada de <i>Staphylococcus aureus</i> multi resistente (CA-MRSA), beta-lactámicos, tetraciclinas. (Chambers et al., 2010; Kraker et al., 2011)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Quinolonas. (Dave, 2011)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Quinolonas, tetraciclina, beta-lactámicos.

IV. Técnicas de detección de resistencia a antibióticos

Las resistencias a antibióticos son una urgencia internacional en el área de microbiología clínica, ya que cada vez las drogas que tenemos a disponibilidad son menos funcionales para combatir infecciones (AST Standars, 2011). Algunas organizaciones como *Clinical Laboratory Standars Institue* (CLSI) de E.E.U.U. *World Organization for Animal Health* (OIE) de U.E., *CDS Antibiotic sensivity testings* (CDS-AST) de Australia, han vigilado y recomendado estándares para la detección de resistencias bacterianas y resaltado la importancia del desarrollo de nuevas metodologías para una detección más

rápida (AST Standars, 2011). Los dos métodos, dependiendo de la organización, que se recomiendan son el método de difusión de disco y el método de Concentración Mínima Inhibitoria por dilución en placa (WHO, 2015). Las estrategias más importantes son la detección temprana, vigilancia para resaltar resistencias comunes, confirmación y seguimiento de casos, investigación e interpretación de datos rutinarios y sobre todo el incremento de protocolos para mejorar los métodos de detección y que esos sean rápidos y eficientes (WHO,2015). Las metodologías buscan ser más rápidas que las técnicas tradicionales a pesar del aumento de costos (Gerogios *et al.*, 2014). Algunos de los métodos son la metagenómica, pirosecuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativo (qPCR) (Schmieder y Edwards, 2012; Woodford y Sundsfjor, 2005). Sin embargo, existe aún mucho debate, ya que las técnicas de PCR no logran determinar si las bacterias están muertas o vivas, por lo que se proponen algunas metodologías como *cantilever fluctuation* que es sensor nanomecánico que en pocos minutos logra detectar la reacción de la bacteria ante la droga (Longo *et al.*, 2013).

Los métodos son variados, algunos son basados en PCR, otros utilizan equipos especializados como la espectrometría de masas con matriz asistida con laser de desorción/ionización midiendo el tiempo de corrida (MALDI-TOF MS), microarreglos, microfluídos, lisis celular y secuenciación de todo el genoma bacteriano (Pulido *et al.*, 2013).

A pesar de la variedad de métodos el que más ventajas presenta es el antibiograma por qPCR, con este método se logra determinar rápidamente por su componente molecular y sensible y específico por su parte de métodos fenotípicos (Pulido *et al.*, 2013).El método logra determinar la resistencia, susceptibilidad, concentración mínima inhibitoria, si la resistencia no ha sido reportada previamente también es detectable. Éste método tiene una fase de crecimiento en diferentes concentraciones de antibiótico, lo cual ayuda a determinar el MIC, luego utiliza un termociclador en tiempo real para amplificar ADN conservado en la bacteria aumentando la rapidez del método. Además de ser cuantitativo es sensible y específico, ya que la sensibilidad es alta se puede dar un mejor consejo en cuanto a tratamiento y comparar varios antibióticos para brindar terapias combinadas (Waldsein *et al.*, 2011).

V. Efecto de detección temprana en costo de cuidados y permanencia intrahospitalaria

La identificación rápida de las bacterias y de la resistencia a antibióticos provee información que es de gran importancia para la toma de decisiones en cuanto a tratamiento en un paciente con infección nosocomial, la detección en menor tiempo que la microbiología clásica ayuda a que el tratamiento sea más efectivo.

En la Universidad de Massachusetts se realizó un estudio en el cuál se encontró que los costos finales de hospitalización se ven afectados drásticamente al utilizar técnicas rápidas de detección. También se tomó en cuenta la mortalidad, días de tratamiento intensivo e intermedio y 10 horas contra 25 horas de detección más el tiempo de incubación (Doern *et al.*, 1994). En un hospital en Chicago realizaron un estudio utilizando un equipo comercial con el cuál se detectaba en menos de 8 horas más la fase de crecimiento, se encontró que se podía brindar una mejor y más rápida terapia y un ahorro (en 1989) de \$158 por paciente (Trenholme *et al.*, 1989).

El flujo de trabajo también es importante para mejorar el tiempo de detección, en Illinois observaron que con 5 horas de diferencia se logra dar un mejor tratamiento, disminuyo significativamente la tasa de mortalidad, tiempo de estadía y costo total del paciente resultando en un total de \$2000 de ahorro por paciente, en este hospital se estimó que con 5 horas de mejora se ahorrarían 4 millones de dolares al año Barenfanger, Drake y Kacich, 1999). Es por esto que la detección temprana implica la un aumento en la sobrevivencia de los pacientes y también un ahorro económico que puede ser invertido para brindar mejores servicio. Además se ha observado que al retrasarse el tiempo de obtención de resultados la tasa de mortalidad de los paciente aumenta, haciendo el tiempo esencial en la detección de la bacteria y el perfil de susceptibilidad a antibióticos (Iregui *et al.*, 2002).

6.4.2 Justificación de demanda

En UNICAR existe un alta incidencia de infecciones nosocomiales, atribuido a pacientes inmunosuprimidos tanto por el procedimiento quirúrgico como por la edad, ya que son pacientes pediátricos (Cazali, 2013). Las bacterias causantes de estas infecciones intrahospitalarias al igual que su susceptibilidad a antibióticos, son detectadas por microbiología clásica, llevándose a cabo entre 48 y 72 horas (Cazali, 2013; ATS Standars, 2011). Debido a esto los pacientes no reciben un tratamiento adecuado a tiempo, lo cual incide en la tasa de mortalidad, cuidados hospitalarios y permanencia del paciente en el hospital (Chen *et al.*, 1994). La susceptibilidad a antibióticos es tan importante como la determinación de la bacteria que causa la infección, ya que los métodos utilizados no son los suficientemente rápidos, es de gran importancia aplicar metodologías que superen las barreras de tiempo, y que a la vez, sean lo suficientemente sensibles y específicos (Pulido *et al.*, 2013). Se ha demostrado que al mejorar el tiempo de detección se obtienen mejoras en el pronóstico de vida del paciente y los costos en que incurre el hospital (Doern *et al.*, 1994; Trenholme *et al.*, 1989; Iregui *et al.*, 2002). Debido a que UNICAR, una institución sin fines de lucro, realiza procedimientos en base asignaciones del presupuesto estatal y a donaciones la disminución de costos y la optimización de

las pruebas de laboratorio permitiría, además de las ventajas directas a la salud de los pacientes, aumentar el número de intervenciones realizadas a pacientes y así mejorar el servicio que brinda el hospital (UNICAR, 2012). Este proyecto pretende implementar la técnica de antibiogramas de qPCR para la determinación de resistencia a drogas de las principales bacterias causantes de infecciones nosocomiales en UNICAR y de esta forma contribuir a mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes atendidos.

6.5. Planteamiento del problema

La alta incidencia de infecciones nosocomiales y el constante incremento en la frecuencia de resistencias a antibióticos afecta directamente la sobrevivencia y calidad de vida de los pacientes, así como los costos de cuidados intrahospitalarios y el tiempo de permanencia. La detección temprana de resistencia a drogas es esencial para mejorar la eficacia de los tratamientos a utilizar y el pronóstico de vida de los pacientes.

6.6. Objetivos

6.6.1. General

Estandarizar una prueba diagnóstica molecular para la resistencia bacteriana a tres familias de antibióticos por cepas reportadas por la Unidad de Nosocomiales de UNICAR, aplicando la técnica de antibiogramas, en diferentes tipos de muestra.

6.6.2. Específicos

I. Implementar la detección de la resistencia a al menos un antibiótico de cada familia por el método de antibiogramas de qPCR.

II. Implementar la detección de resistencia a antibióticos por el método de antibiogramas de qPCR en menos de 24hrs.

6.7. Hipótesis (si aplica)

Ha: El método de antibiogramas por qPCR es viable para detectar la resistencia a varias familias de antibióticos en menos de 24 horas.

Ho: El método de antibiogramas por qPCR no es viable para detectar la resistencia a varias familias de antibióticos en menos de 24 horas.

6.8. Metodología

La metodología que se llevará a cabo será la realización de antibiogramas utilizando qPCR según propuesto por Waldesein *et al.* en el año 2011.

Crece las bacterias en agar sangre y luego crece en medio líquido hasta concentraciones entre 50 y 200UFC/mL. Tomar 1 mL de la muestra y mezclarla con 9mL de medio LB, el cultivo se creció en una incubadora con agitación a 37°C en presencia de diferentes antibióticos. Separar la mezcla centrifugando por 10min a 525g.

Colectar 9.5 mL de sobrenadante. Centrifugar por 10min a 4,700g el sobrenadante. Decantar y resuspender en 125µl de buffer RIPA, agitar esta solución con un Vortex. Incubar a 25°C por 5min. Agregar 20µL de ADNasa con 20µL de buffer e incubar a 37°C por 30min. Centrifugar a las por 10min a 4700g. Decantar el sobrenadante. Lavar el pellet con 0.5mL de buffer RS con 25mM de EDTA , centrifugando a 4700g por 5min. Lavar otra vez con 0.5mL de buffer RS sin EDTA y centrifugando por 4min a 4700g. Resuspender en 25µL de buffer RS. La muestra luego es colocada en el sonificador por 1min previo a usarla para realizar el PCR en tiempo real.

Se utilizaran cebadores comerciales para el gen 16S ARNr, y 2µL de muestra. Luego se obtendrán los antibiogramas a través de las curvas de amplificación. Inicialmente se utilizarán parámetros reportados en la literatura, y se optimizarán según los resultados obtenidos. Se trabajará en triplicado, con al menos cinco bacterias que hayan sido reportadas por la unidad de nosocomiales de UNICAR.

Para la interpretación de resultados se utilizarán los parámetros recomendados por los autores, se interpretan los valores de del número de ciclo en que la curva de amplificación sobrepasa 0.5, luego se procederá a una comparación entre los valores de la curva con presencia de antibiótico y sin presencia del mismo, los autores asignan valores >3.0 como susceptible y <3.0 como resistente.

6.9. Resultados esperados

Se espera obtener un protocolo estandarizado para una prueba diagnóstica molecular de detección de resistencia bacteriana a al menos ocho antibióticos representativos tanto de las familias de antibióticos como de los tratamientos usualmente disponibles en los hospitales (beta-lactamasas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, MLS, glucopéptidos, tetraciclinas, trimetroprimas y

cloranfenicol). El protocolo estará basado en la técnica de de antibiogramas por qPCR. También se espera que la prueba se pueda realizar en menos de 24hrs.

6.10. Beneficiarios

Los beneficiarios directos son los pacientes del hospital UNICAR y el hospital mismo.

6.11. Impacto del proyecto

El impacto de la investigación, al aplicar la metodología en muestras hospitalarias, es directo a los pacientes operados en UNICAR en el área de pediatría. Los pacientes tendrán mejores pronósticos de vida pues se les podrá responder de mejor forma a infecciones luego de la operación. Por otro lado el proyecto de investigación impacta al hospital ya que se disminuirán los costos de cuidados de los pacientes.

6.12. Implicaciones éticas

En este proyecto de investigación no se realizarán pruebas en sujetos humanos, la metodología se desarrollará a partir de aislados de bacterias.

6.13. Bibliografía

Article, O., Badave, G. K., & Dhananjay, K. (2015). Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge, 9(0), 9–11. doi:10.7860/JCDR/2015/11014.5398

AST Standards. 2011. "Antimicrobial resistance learning site". Michigan State University Antibiotic sensitivity testing standards. <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/detecting-antimicrobial-resistance/approaches-and-strategies/approaches-and-strategies-in-detecting-antimicrobial-resistance>.

Barenfanger, J., Drake, C., & Kacich, G. (1999). Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1415–1418.

Bender, J., Strommenger, B., Steglich, M., Zimmermann, O., Fenner, I., Lensing, C., ... Layer, F. (2015). Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two cfr-carrying plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–9. doi:10.1093/jac/dkv025

- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426. doi:10.1016/j.tim.2011.04.005
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 2–41. doi:10.1128/CMR.00019-11
- Bush, K. (2010). Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care*, 14, 224. doi:10.1186/cc8892
- Capone, a., Giannella, M., Fortini, D., Giordano, a., Meledandri, M., Ballardini, M., ... Petrosillo, N. (2013). High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clinical Microbiology and Infection*, 19. doi:10.1111/1469-0691.12070
- Cazali, I. (2013). *Unidad de Nosocomiales UNICAR*.
- Chambers, H. F., & Deleo, F. R. (2010). NIH Public Access, 7(9), 629–641. doi:10.1038/nrmicro2200.Waves
- Chen, Y.-Y., Pesus, Y.-C., & Pesus, C. (1994). Impact of nosocomial infection on cost illness and length of stay in intensive care units. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(12), 3002 – 3007.
- Custovic, A., Smajlovic, J., Tihic, N., Hadzic, S., Ahmetagic, S., & Hadzagic, H. (2014). Epidemiological Monitoring of Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter Baumannii*. *Medical Archives*, 68(6), 402. doi:10.5455/medarh.2014.68.402-406
- Dave, S. B., Toma, H. S., & Kim, S. J. (2011). Ophthalmic antibiotic use and multidrug-resistant staphylococcus epidermidis: A controlled, longitudinal study. *Ophthalmology*, 118(10), 2035–2040. doi:10.1016/j.ophtha.2011.03.017
- De Kraker, M. E. a, Davey, P. G., & Grundmann, H. (2011). Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS Medicine*, 8(10). doi:10.1371/journal.pmed.1001104

- Doern, G. V., Vautour, R., Gaudet, M., & Levy, B. (1994). Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*(7), 1757–1762.
- Fasciitis, N. (2006). *Aeromonas Hydrophila*, 1357–1360.
- Finch, R. G. (2006). Controlling antibiotic resistance by rapid identification of susceptible target infections and pathogen recognition: A preface to the proceedings of the IFAR* colloquium 2005. *Clinical Microbiology and Infection*, *12*, 1–2. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01650.x
- Fluit, A., Visser, M., & Schmitz, F. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4), 836–871. doi:10.1128/CMR.14.4.836
- Georgios, M., Egki, T., & Effrosyni, S. (2014). Phenotypic and Molecular Methods for the Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram Negative Nosocomial Pathogens. In *Trends in Infectious Diseases*. doi:10.5772/57062
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *47*(3), 137–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822035>
- Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *81*, 264–268. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.003
- Hermann, T. (2007). Aminoglycoside antibiotics: Old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-007-7034-x
- Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. a, & Fridkin, S. K. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, *29*, 996–1011. doi:10.1086/591861
- Iregui, M., Ward, S., Sherman, G., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. (2007). Clinical Importance of Delays in the Initiation of Appropriate Antibiotic Treatment for
- Clinical Importance of Delays in the Initiation of Appropriate Antibiotic

Treatment for Ventilator-Associated Pneumonia *.
doi:10.1378/chest.122.1.262

Jacob, J. T., Klein, E., Laxminarayan, R., Beldavs, Z., Lynfield, R., & Alexander, J. (2013). Vital Signs : Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, 1–9.

Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P. L., Billig, M., ... Sokurenko, E. V. (2013). Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 207, 919–928. doi:10.1093/infdis/jis933

Kahlmeter, G., & Poulsen, H. O. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: The ECO-SENS study revisited. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(1), 45–51. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.013

Kalokhe, A. S., Shafiq, M., Lee, J. C., Ray, S. M., Wang, Y. F., & Metchock, B. (2013). Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing: a review of the literature. *Am J Med Sci.*, 345(2), 143–148. doi:10.1097/MAJ.0b013e31825d32c6.Multidrug-resistant

Knapp, L., Amézquita, A., McClure, P., Stewart, S., & Maillard, J.-Y. (2015). Bacterial resistance to microbicides: Development of a predictive protocol. *Applied and Environmental Microbiology*, (January), AEM.03843–14. doi:10.1128/AEM.03843-14

Ko, W. C., Lee, H. C., Chuang, Y. C., Liu, C. C., & Wu, J. J. (2000). Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. *Journal of Infection*, 40, 267–273. doi:10.1053/jinf.2000.0654

Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J., ... Chambers, H. F. (2011). Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical Infectious Diseases*, 52. doi:10.1093/cid/ciq146

Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34, 634–640. doi:10.1086/338782

Longhi, C., Conte, M. P., Marazzato, M., Iebba, V., Totino, V., Santangelo, F., ... Comanducci, a. (2012). Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance

- determinants in *Escherichia coli* from community uncomplicated urinary tract infection in an area of high prevalence of quinolone resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 1917–1921. doi:10.1007/s10096-011-1521-6
- Longo, G., Alonso-Sarduy, L., Rio, L. M., Bizzini, A., Trampuz, A., Notz, J., ... Kasas, S. (2013). Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nature Nanotechnology*, 8, 522–6. doi:10.1038/nnano.2013.120
- Longtin, S., Guilfoile, P., & Asper, a. (2004). Genotypic detection of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: a classroom exercise. *Journal of Biological Education*, 39, 32–33.
- Mataseje, L. F., Bryce, E., Roscoe, D., Boyd, D. a., Embree, J., Gravel, D., ... Wong, A. (2012). Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009-10: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program (CNISP). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(March), 1359–1367. doi:10.1093/jac/dks046
- Muto, C. a. (2005). Why are antibiotic-resistant nosocomial infections spiraling out of control? *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 26(1), 10–12. doi:10.1086/502481
- Ohad, S., Block, C., Kravitz, V., Farber, a., Pilo, S., Breuer, R., & Rorman, E. (2014). Rapid identification of *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter cloacae* genetic cluster III. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1315–1321. doi:10.1111/jam.12439
- Oliphant, C., & Green, G. (2002). Quinolones: A Comprehensive Review. *American Family Physician*, 65(3), 455–465. Retrieved from <http://www.aafp.org/afp/2002/0201/p455.html>
- Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Informe Anual de la Red de Monitoreo/ Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos 2009*. doi:978-92-75-33194-1
- Oteo, J., Cercenado, E., Vindel, A., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Saéz, D., ... Campos, J. (2013). Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 571–575. doi:10.1099/jmm.0.053017-0

- Park, S. Y., Kang, C.-I., Joo, E.-J., Ha, Y. E., Wi, Y. M., Chung, D. R., ... Song, J.-H. (2012). Risk factors for multidrug resistance in nosocomial bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 18(5), 518–24. doi:10.1089/mdr.2012.0067
- Patra, S., Bhat Y, R., Lewis, L. E., Purakayastha, J., Sivaramaraju, V. V., Kalwaje E, V., & Mishra, S. (2014). Burkholderia cepacia Sepsis Among Neonates. *The Indian Journal of Pediatrics*. doi:10.1007/s12098-014-1473-9
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. a. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471–3484. doi:10.1128/AAC.01464-06
- Perez, F., Rudin, S. D., Marshall, S. H., Coakley, P., Chen, L., Kreiswirth, B. N., ... Bonomo, R. a. (2013). OqxAB, a quinolone and olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4602–4603. doi:10.1128/AAC.00725-13
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2(April), 1–13. doi:10.3389/fmicb.2011.00065
- Pulido, M. R., García-Quintanilla, M., Martín-Peña, R., Cisneros, J. M., & McConnell, M. J. (2013). Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(June), 2710–2717. doi:10.1093/jac/dkt253
- Sanchez, G. V., Master, R. N., Clark, R. B., Fyyaz, M., Duvvuri, P., Ekta, G., & Bordon, J. (2013). *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998-2010. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 133–136. doi:10.3201/eid1901.120310
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2012). Insights into Antibiotic Resistance Through Metagenomic Approaches. *Future Microbiology*, 7(1), 73–89.
- Snitkin, E. S., Zelazny, a. M., Thomas, P. J., Stock, F., Henderson, D. K., Palmore, T. N., & Segre, J. a. (2012). Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. *Science Translational Medicine*, 4, 148ra116–148ra116. doi:10.1126/scitranslmed.3004129

- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. a., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., & MacKenzie, F. M. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 273–282. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030
- Tadesse, D. a., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., & McDermott, P. F. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 18(5), 741–749. doi:10.3201/eid1805.111153
- Trenholme, G. M., Kaplan, R. L., Karakusis, P. H., Stine, T., Fuhrer, J., Landau, W., & Levin, S. (1989). susceptibility testing of bacterial blood culture Clinical Impact of Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacterial Blood Culture Isolates, 27(6), 1342–1345.
- Trust, T. J., & Chipman, D. C. (1979). Clinical involvement of *Aeromonas hydrophila*. *Canadian Medical Association Journal*, 120, 942–946.
- Tseng, S.-P., Tsai, W.-C., Liang, C.-Y., Lin, Y.-S., Huang, J.-W., Chang, C.-Y., ... Lu, P.-L. (2014). The Contribution of Antibiotic Resistance Mechanisms in Clinical *Burkholderia cepacia* Complex Isolates: An Emphasis on Efflux Pump Activity. *PloS One*, 9(8), e104986. doi:10.1371/journal.pone.0104986
- Tzouveleakis, L. S., Markogiannakis, a., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682–707. doi:10.1128/CMR.05035-11
- UNICAR. (2012). Unidad de Cirugía Cardiovascular de Guatemala UNICAR. Retrieved from <http://www.unicargt.org/historia.html>
- Waldeisen, J. R., Wang, T., Mitra, D., & Lee, L. P. (2011). A real-time PCR antibiogram for drug-resistant sepsis. *PLoS ONE*, 6(12). doi:10.1371/journal.pone.0028528
- Widerström, M., McCullough, C. a., Coombs, G. W., Monsen, T., & Christiansen, K. J. (2012). A multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone (ST2) is an ongoing cause of hospital-acquired infection in a Western Australian Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(March), 2147–2151. doi:10.1128/JCM.06456-11
- WHO. 2015. "Drug resistance". World Health Organization. http://www.who.int/drugresistance/Antimicrobial_Detection/en/

Woodford, N., & Sundsfjord, A. (2005). Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 259–261.

6.14. Publicaciones y/o patentes

Investigador principal

"Magnitude and Origin of the Enhanced Basicity of the Catalytic Glutamate of

Triosephosphate Isomerase." M. Merced Malabanan, Lucia Nitsch-Velasquez,

Tina L. Amyes, and John P. Richard. *Journal of the American Chemical Society*. 2013. 135 (16), pp 5978–5981

“Análisis de los componentes mayoritarios del aroma de pinabete”.

2011. Universidad

del Valle de Guatemala – CONCYT.

Time-Dependent Density Functional Response Theory for Electronic Chiroptical

Properties of Chiral Molecules. Jochen Autschbach, Mark Rudolph, Lucia Nitsch. *Topics in Current Chemistry*. 2011. 298, 1-98

Generalization of Clough-Lutz-Jirgensons effect: hydroxyl, halogen and alkyl

alpha-chiral acids. Lucia Nitsch and Jochen Autschbach. *Chirality*. 2010.

• **Manual de Laboratorio en Nutrición.** 2007. Departamento de Nutrición. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Rafael Landívar.

• **Caracterización de Metabolitos Secundarios de los extractos de pinabete (Abies**

guatemalensis Rehder)”. 2005. Tesis con honores para el grado de Licenciada. Junio.

Universidad del Valle de Guatemala.

• **“Análisis de los aceites esenciales de *Abies guatemalensis*, identificación y cuantificación de los componentes del aroma”.** 2003. Estudio para el Instituto Nacional de Bosques. *Revista Guatemala Forestal*.

6.15. Capacidad Institucional

La Universidad del Valle de Guatemala es una de las entidades académicas más reconocidas del país. Es una de las pocas instituciones que posee un Instituto de Investigaciones dedicado a hacer investigación científica de alto nivel en áreas biológicas y de la salud. Inicialmente la Universidad del Valle colaboró estrechamente con el sector agrícola, específicamente con los sectores azucarero y cafetalero, en la resolución de problemas agronómicos que ayudarían a mejorar la productividad y calidad de productos tradicionales y no tradicionales. Así también el Centro de Estudios en Salud ha desarrollado diversos proyectos en el área de Malaria, Chagas, entre otras enfermedades tropicales.

El Departamento de Bioquímica y Microbiología ha graduado a más de 50 profesionales, muchos de ellos se han convertido en investigadores tanto dentro de UVG como en otras instituciones. El Departamento cuenta con el apoyo y orientación científica y administrativa del Instituto de Investigaciones de UVG, así como instalaciones necesarias para realizar experimentos en el área de biología molecular. Debido a que se han detectado necesidades dentro del área de técnicas moleculares que aún no han sido cubiertas por otros entes, y considerando la capacidad científica y administrativa que UVG brinda al Depto. De Bioquímica y Microbiología, se propone esta iniciativa de investigación.

La UVG ha expandido sus investigaciones gracias a los aportes como los financiados por CONCYT y a programas de cooperación internacional debido al gran prestigio del que goza. El instituto maneja actualmente más de 40 proyectos en diversas áreas de la investigación. También, UVG continúa la creación de nuevos proyectos que busquen resolver necesidades del país. La mayoría de proyectos con relación al área agronómica y enfermedades tropicales, incursionando con los métodos más avanzados y con la tecnología más actual de que se dispone en Guatemala.

Los laboratorios de la Universidad del Valle cuentan con equipo de alta tecnología, necesario para hacer todas las pruebas necesarias en este proyecto. El equipo necesario para la ejecución de este proyecto está organizado en dos laboratorios que forman el área del Depto. De Bioquímica y Microbiología, pero es necesaria la adquisición de reactivos y kits de extracción y amplificación de ADN para los diagnósticos de bacterias. Entre los equipos con los que cuenta la Universidad se encuentran lectores micropipetas, centrifugas, balanzas analíticas, campana de flujo laminar, espectrofotómetros UV-visible y cuarto frío.

El laboratorio del Depto. De Bioquímica y Microbiología de UVG cuenta con facilidades para hacer diagnóstico de bacterias mediante técnicas serológicas, y técnicas moleculares, exceptuando el termociclador para RT-PCR.

6.16. Anexos

6.16.1. Análisis de riesgo y plan de contingencia (si aplica)

No aplica

6.16.2. Figura 1. Carta de aval resaltando la necesidad de inicio del proyecto

En la siguiente figura se resalta la necesidad de UNICAR de realizar proyectos de investigación que puede impactar a la institución mejorando la calidad y sobrevida de los pacientes que atiende.

Figura 1. Carta de aval resaltando la necesidad de inicio del proyecto



UNIDAD DE CIRUGIA CARDIOVASCULAR DE
GUATEMALA

Departamento de Pediatría

Guatemala,
14 de febrero 2014

Señores Miembros del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Ciudad de Guatemala, Guatemala

Señores:

Por este medio hago constar que el proyecto: Desarrollo de pruebas moleculares para la detección de bacterias reportadas con mayor frecuencia en la unidad de intensive pediátrico de UNICAR tiene importancia para nuestra institución y para la sobrevida, y eventualmente la mejora de la calidad de vida de nuestros pacientes. Por lo que se le otorga el aval institucional correspondiente.

Así mismo, nuestra institución se compromete a dar el apoyo requerido para que se alcancen los objetivos indicados, incluyendo la supervisión y evaluación del mismo, independientemente de las que realice la SENACYT.

Atentamente,

Dr. Aldo Castañeda
Jefe Departamento de Pediatría UNICAR

6.16.2. Cronograma de trabajo

No.	Actividades	Mes																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	Organización de equipo de trabajo	■																	
2	Adquisición de materiales y equipo		■																
3	Comprobación de resistencias por difusión de disco			■															
6	Preparación de materiales				■														
7	Realización de prueba a partir de cepas aisladas					■													
8	Realización de prueba a partir de simulación de muestras						■												
9	Elaboración de prueba utilizando diferentes antibióticos							■											
10	Optimización de prueba								■										
11	Análisis de resultados preliminares									■									
12	Informe de resultados										■								
13	Estandarización de la prueba											■							
15	Consolidación de la prueba diagnóstica												■						
17	Diseño de trabajo para realización de la prueba rutinaria														■				
18	Elaboración de informe final																■		

6.16.3. Curricula vitae (del Investigador Principal como del equipo de investigación)

7. INFORMACIÓN FINANCIERA:

7.1. Costo del proyecto:

Recursos solicitados al FONACYT:	392,300.00
Recursos de contrapartida:	416,175.00
Recursos de otras fuentes de financiamiento:	0.00
Monto total del proyecto:	808

7.2. Ficha Presupuestaria Financiera (Archivo Digital Excel ID-R-0010).

Imprimir y adjuntar a solicitud FODECYT

Guardar como documento Excel en CD, nombre del archivo: Ficha Presupuestaria Financiera.

Requisito obligatorio: Con la asesoría del Analista Financiero de Proyectos, de la Dirección Financiera de la SENACYT, justificar ampliamente cada uno de los renglones solicitados por fuente de financiamiento (FONACYT, contrapartida y de otras fuentes).

La Ficha Presupuestaria Financiera propuesta deberá tener el Vo.Bo. del Analista Financiero de Proyectos, de la Dirección Financiera de la SENACYT.

NOTA: ESTA BOLETA YA TIENE FORMATO ESTÁNDAR NO MODIFICARLA FAVOR NO LLENAR INFORMACIÓN EN LA CELDA DE COLOR AZUL

FICHA PRESUPUESTARIA FINANCIERA

LINEA DE FINANCIAMIENTO FODECYT

Nombre del Proyecto:

Detección de resistencia a antibióticos por medio de antibiogramas de qPCR en la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular de Guatemala (UNICAR)

No. del Proyecto:

USO EXCLUSIVO SENACYT/CONCYT

Nombre del Investigador Principal:

M.Sc. Lucía Nitsch Velásquez

Nombre de la Unidad Ejecutora:

Universidad del Valle de Guatemala

DESCRIPCIÓN DEL PRESUPUESTO

	SUB		DESCRIPCION	MON TO	MONT O DE	MO NT O DE	MO NTO	MON TO
GRUPO	GRUPO	REGLON		SOLI CITA DO	CONT RAPATA	OT RAS FUENTES	TOT AL	REC OME NDA DO
0			SERVICIOS PERSONALES					USO EXCLUSIVO CONYNT
		0 35	Retribuciones a destajo				0,00	
1			SERVICIOS NO PERSONALES					
	12		PUBLICIDAD, IMPRESIÓN Y ENCUADERNACION					
		121	Divulgación e información				0,00	
		122	Impresión, encuadernación y reproducción				0,00	
	13		VIATICOS Y GASTOS CONEXOS					
		131	Viáticos en el exterior				0,00	
		133	Viáticos en el interior				0,00	
	16		MANTENIMIENTO Y REPARACION DE MAQUINARIA Y EQUIPO					
		161	Mantenimiento y reparación de maquinaria y equipo de producción				0,00	
		163	Mantenimiento y reparación de equipo médico, sanitario y de laboratorio		20.000,00		20.000,00	
		164	Mantenimiento y reparación de quipos educacionales y recreativos				0,00	
		166	Mantenimiento y reparación de equipo para comunicaciones				0,00	
	17		MANTENIMIENTO Y REPARACION DE OBRAS E INSTALACIONES					
		174	Mantenimiento y reparación de		36.0		36,0	

		instalaciones		00,0 0		000 ,00	
	176	Mantenimiento y reparación de otras obras e instalaciones				0,0 0	
18	SERVICIOS TECNICOS Y PROFESIONALES						
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad	114. 000, 00	24.8 00,0 0		138 .80 0,0 0	
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad: Evaluación externa de Impacto*	8.00 0,00			8.0 00, 00	8.00 0,00
	185	Servicios de capacitación				0,0 0	
	189	Otros estudios y/o servicios				0,0 0	
19	OTROS SERVICIOS NO PERSONALES						
	194	Otras comisiones y gastos bancarios				0,0 0	
	195	Impuestos, derechos y tasas				0,0 0	
	196	Servicios de atención y protocolo				0,0 0	
	199	Otros servicios no personales				0,0 0	
2	MATERIALES Y SUMINISTROS						
21	ALIMENTOS Y PRODUCTOS AGROPECUARIOS						
	211	Alimentos para personas				0,0 0	
	212	Alimentos para animales				0,0 0	
	213	Productos animales				0,0 0	
	214	Productos agroforestales, madera, corcho y sus manufacturas				0,0 0	
22	MINERALES						
	223	Piedra, arcilla y arena				0,0 0	
	224	Pómez, cal y yeso				0,0 0	
	229	Otros minerales				0,0 0	
24	PRODUCTOS DE PAPEL, CARTON E IMPRESOS						
	241	Papel de escritorio		500, 00		500 ,00	
	242	Papeles comerciales, cartones y otros				0,0	

						0	
	243	Productos de papel o cartón				0,0	
	244	Productos de artes graficas				0,0	
	245	Libros, revistas y periódicos				0,0	
	249	Otros productos de papel, cartón e impresos		500,00		500,00	
25	PRODUCTOS DE CUERO Y CAUCHO						
	254	Artículos de caucho				0,0	
26	PRODUCTOS QUIMICOS Y CONEXOS						
	261	Elementos y compuestos químicos		8.000,00		8.000,00	
	262	Combustibles y lubricantes				0,0	
	263	Abonos y fertilizantes				0,0	
	264	Insecticidas, fumigantes y similares				0,0	
	266	Productos medicinales y farmaceuticos				0,0	
	267	Tintes, pinturas y colorantes				0,0	
	268	Productos plásticos, nylon, vinil y pvc				0,0	
	269	Otros productos químicos y conexos	20.300,00			20.300,00	
27	PRODUCTOS DE MINERALES NO METALICOS						
	271	Productos de arcilla				0,0	
	272	Productos de vidrio		4.000,00		4.000,00	
	274	Cemento				0,0	
28	PRODUCTOS METALICOS						
	282	Productos metálicos no férricos				0,0	
	283	Productos de metal				0,0	
	284	Estructuras metálicas acabadas				0,0	
	286	Herramientas menores				0,0	

		289	Otros productos metálicos				0,0	0
	29	OTROS MATERIALES Y SUMINISTROS						
		291	Útiles de oficina		1.00		1.00	00,00
		292	Útiles de limpieza y productos sanitarios				0,0	0
		293	Útiles educacionales y culturales				0,0	0
		294	Útiles deportivos y recreativos				0,0	0
		295	Útiles menores médico-quirúrgicos y de laboratorio		2.00		2.00	00,00
		297	Útiles, accesorios y materiales eléctricos				0,0	0
		298	Accesorios y repuestos en general				0,0	0
		299	Otros materiales y suministros				0,0	0
3		PROPIEDAD, PLANTA, EQUIPO E INTANGIBLES						
	32	MAQUINARIA Y EQUIPO						
		321	Maquinaria y equipo de producción				0,0	0
		323	Equipo médico-sanitario y de laboratorio	250.000,00	319.375,00		569,37	5,00
		324	Equipo educacional, cultural y recreativo				0,0	0
		329	Otras maquinarias y equipos				0,0	0
		381	Activos intangibles (Patentes)				0,0	0
			TOTAL	392.300,00	416.175,00	0,0	808,47	8.00 0,00

1.* Imprimir y adjuntar a solicitud FODECYT

2.* Guardar como documento Excel en CD, nombre del archivo: Ficha Presupuestaria Financiera

Nota: En hojas adicionales justificar ampliamente cada uno de los rubros respectivos por fuente de financiamiento (FONACYT, Contrapartida de otras fuentes que se detallan)

Monto Recomendado	Q8. 000, 00
Monto de Contrapartida	Q41 6.17 5,00
Monto de Otras fuentes	Q0, 00
Monto Total del Proyecto	Q42 4.17 5,00

7.3. Planilla para incentivos a la Investigación (Archivo Digital Excel) ID-R-0004

Imprimir y adjuntar a solicitud FODECYT

Guardar como documento Excel en CD, nombre del archivo: Planilla de Incentivos a la Investigación.

ID-R-0004

PLANILLA PARA INCENTIVOS A LA INVESTIGACIÓN

Proyecto FODECYT No.	ID-R-002
Nombre del Proyecto:	Detección de resistencia a antibióticos por medio de antibiogramas de qPCR en la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular de Guatemala (UNICAR)
Investigador Principal:	M.Sc. Lucía Nitsch Velásquez
Unidad Ejecutora:	Universidad del Valle de Guatemala, Departamento de Bioquímica y Microbiología

No.	Nombre	*Cargo	**Si está en Planilla de Institución	**hrs. Diarias al mes	Incentivo para la investigación FONACYT (Q./Hra.)	TOTAL AL MES	Duración meses	TOTAL FONACYT	TOTAL CONTRAPARTIDA	TOTAL OTRAS FUENTES	MONTO TOTAL	MONTO RECOMENDADO
1	Lucía Nitsch Velásquez	Investigador Principal	No	2	1,250.00	2,500.00	18	45,000.00			45,000.00	
2	Daña Mei Ling Lau Bonillas	Co-investigador	No	2	1,000.00	2,000.00	18	36,000.00			36,000.00	
3	José Andrés Grajeda Estrada	Asistente de investigación	No	2	625.00	1,250.00	12	15,000.00			15,000.00	
4	Lucía María Ruiz Dávila	Técnico de investigación	No	2	500.00	1,000.00	12	12,000.00			12,000.00	
5	Martha Patricia Herrera González	Técnico de investigación	No	2	500.00	1,000.00	6	6,000.00			6,000.00	
n						0.00		0.00			0.00	
						0.00		0.00			0.00	
						0.00		0.00			0.00	
TOTAL								Q 114,000.00	Q -	Q -		Q -

1 * Consignar el cargo que se desempeñará en el proyecto por parte del equipo de investigación (investigador principal, investigador asociado, asistente de investigación o técnico).

2 ** Indicar si el equipo de investigación está en Planilla de Institución (Si o No).

3 *** Hora diaria mes. Se conceptualiza como una hora diaria dedicada al proyecto durante un mes de trabajo.

4 Imprimir y adjuntar a solicitud FODECYT

5 Guardar como documento Excel (97'-2003) en CD, nombre del archivo: Planilla

Nota: En hojas adicionales describir las actividades que realizara cada uno de los integrantes del equipo de investigación en el proyecto.

8. Declaración de originalidad

Yo Lucía Nitsch Velásquez, Investigadora Principal del proyecto "Detección de resistencia a antibióticos por medio de antibiogramas de qPCR en la unidad de pediatría en la Unidad de Cirugía Cardiovascular de Guatemala (UNICAR)", asumo la responsabilidad profesional de la información consignada en la presente propuesta, asegurando que la misma es de mi autoría, realizada en colaboración con Dra. Dalia Lau y Andrés Grajeda, y autorizo al CONCYT, para que realice las verificaciones correspondientes y proceda como corresponda.

Lucía Nitsch Velásquez

Nombre del Investigador Principal

Firma

28 de septiembre 2015

Fecha

2441126810101

DPI

Para uso exclusivo de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología

Firma, sello y fecha de recepción