



FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

RÁPIDA IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE HEMOCULTIVOS CON
PSEUDOMONAS AERUGINOSAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS A
PARTIR DE SUBCULTIVOS DE CORTA INCUBACIÓN

Línea de investigación:

Microbiología y parasitología

Tesis para optar el Título de Especialista en Microbiología

Autora:

Ortega Aguilar, Sherly Janett

Asesora:

Cruz Gonzales, Gloria Esperanza
(ORCID: 0000-0003-1937-5446)

Jurado:

Garay Bambaren, Juana Amparo
Guerrero Barrantes, Cesar Enrique
Yovera Ancajima, Cleofe del Pilar

Lima - Perú

2023



Reporte de Análisis de Similitud

Archivo:	1A_SHERLY_JANETT_ORTEGA_AGUILAR_TITULO_ESPECIALISTA_2022
Fecha del Análisis:	22/11/2022
Operador del Programa Informático:	MEDINA VILCHEZ MIRTHA VANESSA
Correo del Operador del Programa Informático:	mmedina@unfv.edu.pe
Porcentaje:	4%
Asesor:	Dra. GLORIA ESPERANZA CRUZ GONZALES
Título:	"RÁPIDA IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE HEMOCULTIVOS CON PSEUDOMONAS AERUGINOSAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS A PARTIR DE SUBCULTIVOS DE CORTA INCUBACIÓN"
Enlace:	https://cutt.ly/41QAjOw



Mg. Zoila Santos Chero Pisfil
Jefa (e)
Oficina de Grados y Gestión del Egresado



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**RAPIDA IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE HEMOCULTIVOS CON
PSEUDOMONAS AERUGINOSAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS A
PARTIR DE SUBCULTIVOS DE CORTA INCUBACION**

Línea de investigación:

Microbiología

Tesis para optar el Título de Especialista en Microbiología

Autora

Ortega Aguilar, Sherly Janett

Asesora

**Cruz Gonzales, Gloria Esperanza
(ORCID: 0000-0003-1937-5446)**

Jurado

**Garay Bambaren, Juana Amparo
Guerrero Barrantes, Cesar Enrique
Yovera Ancajima, Cleofe del Pilar**

Lima-Perú

2023

ÍNDICE

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Descripción y formulación del problema	2
1.1.1 Formulación del problema	4
1.2 Antecedentes.....	4
1.3 Objetivos.....	8
Objetivo General	8
Objetivos Específicos.....	8
1.4 Justificación.....	8
II. MARCO TEORICO.....	12
2.1 Bases Teóricas sobre el tema de investigación.....	12
Bacteriemia	12
Hemocultivos	12
BD BACTEC™ FX	13
Subcultivo de corta incubación	13
Identificación del germen causante de bacteriemia.....	13
Espectrometría de masas Matrix-Assited Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF).....	14
Pseudomonas aeruginosa	15
Resistencia antibiótica.....	16

Carbapenemasas.....	16
Detección del mecanismo de resistencia.....	18
Método de inactivación de carbapenem (CIM).....	20
Método de inactivación de carbapenem simplificado (CIMS).....	20
III. MÉTODO.....	21
3.1 Tipo de Investigación.....	21
3.2 Ámbito Temporal y Espacial.....	21
3.3 Variables.....	21
3.4 Población y Muestra.....	21
Criterios de Inclusión:.....	22
Criterios de Exclusión:.....	22
3.5 Instrumentos.....	22
3.6 Procedimientos.....	22
3.7 Análisis de datos.....	24
3.8 Consideraciones éticas.....	24
IV. RESULTADOS.....	25
V. DISCUSION DE RESULTADOS.....	28
VI. CONCLUSIONES.....	31
VII. RECOMENDACIONES.....	32
VIII. REFERENCIAS.....	33
IX. ANEXOS.....	47

RESUMEN

Un agente causal de bacteriemias con alta tasa de mortalidad son las *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que presentan una gran variedad de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, siendo las carbapenemasas las de mayor importancia. Por ello, es necesario que los hemocultivos tengan una rápida identificación y la detección de la presencia de mecanismo de resistencia del patógeno para así poder brindar un tratamiento óptimo y oportuno. **Objetivo:** Proponer una alternativa rápida identificación y detección de hemocultivos con *Pseudomonas aeruginosas* productoras de carbapenemasas usando subcultivos de corta incubación. **Diseño:** Investigación prospectiva y descriptiva. **Metodología:** Se empleó 82 cepas de *Pseudomonas aeruginosas* productoras de carbapenemasas, las cuales fueron inoculadas en frascos de hemocultivos y a partir de ellas se realizaron subcultivos que fueron incubadas por 5 horas. A estos subcultivos se les realizó la identificación mediante el MALDITOF y la detección de resistencia enzimática por el método de inactivación de carbapenemasa simplificado (CIMS). **Resultados:** El 100% de los subcultivos con 5 horas de incubación fueron identificadas por el MALDI-TOF con un score >1.7 y el CIMS fue positivo para todas las cepas productoras de carbapenemasas. **Conclusiones:** Se evidenció que el uso de los subcultivos de corta incubación presenta buena performance para la identificación con el MALDITOF y con el CIMS, permitiendo que se pueda realizar la identificación y detección de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas desde las 11 horas posterior a la positividad del hemocultivo.

Palabras clave: Hemocultivos, subcultivos de corta incubación, *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenemasas.

ABSTRACT

A causal agent of bacteremia with a high mortality rate is *Pseudomonas aeruginosa*, due to the fact that they present a great variety of mechanisms of resistance to antimicrobials, carbapenemases being the most important. Therefore, it is necessary for blood cultures to have rapid identification and detection of the presence of a resistance mechanism of the pathogen in order to provide optimal and timely treatment. Objective: To propose a rapid alternative for the identification and detection of blood cultures with carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* using short-incubation subcultures. Design: Prospective and descriptive research. Methodology: 82 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains were used, which were inoculated in blood culture bottles and subcultures were made from them and incubated for 5 hours. These subcultures were identified using MALDITOF and enzymatic resistance detected using the simplified carbapenemase inactivation method (CIMs). Results: 100% of the subcultures with 5 hours of incubation were identified by MALDI-TOF with a score >1.7 and the MICs were positive for all carbapenemase-producing strains. Conclusions: It was evidenced that the use of short incubation subcultures presents a good yield for identification with MALDITOF and with CIMs, allowing the identification and detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* to be carried out from 11 hours after infection. blood culture positivity.

Keywords: Blood cultures, short incubation subcultures, *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenemases.

I. INTRODUCCION

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias viables en el torrente sanguíneo y conforman una de las causas de las altas tasas de mortalidad en nosocomios. El diagnóstico de las bacteriemias es obtenido mediante el estudio de hemocultivos el cual es una herramienta sumamente útil, pero con ciertas limitaciones debidas a sus falsos positivos por contaminantes y falsos negativos por la baja carga bacteriana presente al momento de la venopunción. Los agentes bacterianos mayormente aislados de las bacteriemias son los bacilos gram negativos siendo la *Pseudomona aeruginosa*, la predominante del grupo de los no fermentadores.

Pseudomona aeruginosa es un microorganismo altamente relacionado a infecciones asociadas a la atención de la salud, responsable de 32,600 hospitalizaciones, 2,700 muertes y hasta 767 millones de dólares en gastos hospitalarios en Estados Unidos en el 2017 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2019).

Debido a la alta presencia de resistencia a carbapenems en *Pseudomonas aeruginosa*, ha generado a que el reporte se prolongue y sea una limitante para brindar al paciente un tratamiento óptimo y oportuno.

En base a esta problemática el presente estudio tuvo como finalidad estudiar y desarrollar una nueva alternativa de diagnóstico y detección de *Pseudomona aeruginosas* productoras de carbapenemasas en el menor tiempo posible utilizando 2 metodologías: El primero usando tiempos cortos de incubación (5 horas) para los subcultivos de los hemocultivos positivos y posteriormente ser identificados mediante la metodología MALDITOF. El segundo mediante el uso del Método de inactivación del carbapenem simplificado (CIMs).

1.1 Descripción y formulación del problema

La bacteriemia es una de las infecciones más comunes en los nosocomios y con una alta tasa de mortalidad a nivel mundial, el cual alcanza entre el 13.6 – 45% (De La Rosa et al., 2016; García Lozano, 2017; Islas-Muñoz et al., 2018). Varios estudios concuerdan en que los pacientes oncológicos, presentan una mayor predisposición y severidad a esta infección debido a sus constantes procedimientos terapéuticos como quimioterapias, biopsias, cirugías, trasplantes entre otros (Abad et al., 2019; Al-Otaibi et al., 2016; Sierra et al., 2020; Velázquez-Acosta et al., 2018). La incidencia de bacteriemia en el paciente oncológico es de aproximadamente un 30% (García Lozano, 2017). Diversos estudios han evidenciado el predominio de bacilos gram negativos (BGN) en los aislamientos de las bacteriemias (Abad et al., 2019; Al-Otaibi et al., 2016; Bousquet et al., 2014; De La Rosa et al., 2016; Islas-Muñoz et al., 2018; Sierra et al., 2020; Velázquez-Acosta et al., 2018). A esta problemática se adiciona el aumento de bacterias con alta resistencia antibiótica. Durante los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de infecciones causadas por bacterias multidrogorresistentes (MDR) (Al-Otaibi et al., 2016; Velázquez-Acosta et al., 2018). Los BGN resistentes a los carbapenems están en aumento en todo el mundo. Dentro del grupo de los bacilos gramnegativos no fermentadores las especies más problemáticas, por su resistencia extrema, son *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* (Casellas, 2011). En el Perú circulan todas las clases de carbapenemasas (Angles-Yanqui et al., 2020).

En el diagnóstico de las bacteriemias, la identificación del microorganismo requiere de su aislamiento en un subcultivo de 18 a 24 horas y su posterior estudio de sensibilidad antibiótica en similar tiempo, existiendo en algunos casos la necesidad de requerir más tiempo aún. En la búsqueda de agilizar el reporte del diagnóstico microbiológico se cuenta con metodologías que

acortan los tiempos convencionales tanto para la identificación como para el estudio de sensibilidad. El estudio del perfil proteico bacteriano mediante el MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry) permite identificar en pocos minutos el microorganismo aislado (Martín-Pujol et al., 2019; Ruiz-Aragón et al., 2018; Siller-Ruiz et al., 2017; Mazzillo Vega y Cabrera Bravo, 2020).

De similar manera, recientemente se ha propuesto un método rápido que enfrenta directamente la cepa aislada con el antibiótico para evaluar la presencia de mecanismo de resistencia enzimática; tales como las carbapenemasas. De esta manera se pueden detectar en los aislados la presencia de estas enzimas en pocas horas.

Alternativamente, algunas técnicas moleculares y metodologías de pre tratamiento han permitido acortar el tiempo de la identificación y el estudio de mecanismo de resistencia del patógeno asociado a la bacteriemia. Dichos métodos han obtenido buena performance sin embargo tienen un costo elevado y/o suelen ser complejos lo que no permite establecerla como prueba de rutina en los laboratorios de microbiología.

Finalmente, tanto la identificación bacteriana por MALDI-TOF como la detección de resistencia enzimática mediante el método simplificado han sido validadas a partir del estudio de cepas aisladas de 18 a 24 horas. Por lo que se desconoce si el estudio de aislamientos de 5 horas permite alcanzar la identificación y detección de resistencia enzimática.

1.1.1 *Formulación del problema*

Problema General

¿Se podrá lograr una rápida identificación y detección de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas en hemocultivos, a partir de subcultivos de corta incubación?

Problemas Específicos

- ¿Será útil el MALDI-TOF para la identificación de las *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas?
- ¿Será de utilidad el Método de Inactivación de carbapenem simplificado (CIMS), para la detección e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas?

1.2 **Antecedentes**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció a la sepsis como una prioridad de la salud global, ya que se estima que hay aproximadamente 30 millones de episodios al año asociados a 6 millones de muertes por esta causa (Reinhart et al., 2017).

En un estudio realizado en Colombia se determinó que los microorganismos más frecuentemente aislados en bacteriemias fueron bacilos gramnegativos en (54%) (De La Rosa et al., 2016). Según diversos estudios a nivel internacional, entre 3 y 5% de todas las infecciones bacterianas, y hasta 28 a 38% de las bacteriemias causadas por microorganismos Gram negativos, son causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) (Valderrama et al., 2016).

En el estudio de Tofas et al. (2017) se identificó que el 29,7% de Bacteriemias fueron causados por PAE. Otro estudio menciona que el 17 % de todas las bacteriemias por gramnegativos en pacientes con neoplasias malignas hematológicas son causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Reynolds y Kollef, 2021).

Las bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos se asocian con aumento de la mortalidad, prolongación de la estancia hospitalaria y un incremento considerable en los costos de atención (Valderrama, et al. 2016).

La resistencia antimicrobiana tiene un impacto mundial desde que los microorganismos y genes resistentes no respetan fronteras geográficas o ecológicas. La diseminación ocurre a través de alimentos, agua, animales y/o personas por los concurridos viajes y alto comercio internacional.

La OMS ha designado la resistencia antimicrobiana como una de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo al constituir una de las mayores amenazas para la salud mundial (Pérez, 2017).

Pseudomonas aeruginosa productora de carbapenemasas es uno de los microorganismos prioritarios en el estudio de la resistencia a los antibióticos a nivel mundial y una amenaza a la salud pública por producir infecciones graves con alta letalidad (World Health Organization [WHO], 2017).

A nivel de América Latina y en el Perú la resistencia bacteriana ha ido progresando de forma alarmante, lo cual da a entender que ha habido evolución de éstas, complicando notablemente el tratamiento. Además, *Pseudomonas aeruginosa* es el agente nosocomial más relacionado a neumonía asociada a ventilador y bacteriemia (Jáuregui-Rojas et al., 2021).

El porcentaje de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a todos los carbapenems (imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem) en Brasil, Perú, Costa Rica, Rusia, Grecia, Polonia, Irán y Arabia Saudita está en el rango de 50 a 75.3% (Vashchyk et al., 2021).

Mayta-Barrios et al. (2021) realizaron un estudio de caracterización molecular a 185 cepas con presencia de enzimas carbapenemasas de clase A, B y D en cepas de 30 IPRESS del Perú, durante el 2019. Su prevalencia fue del 59,7%, siendo la clase B la más frecuente, y los genes más detectados fueron *blaNDM*, *blaIMP*, *blaOXA24-like*, *blaKPC* y *blaOXA23-like*.

van der Zwaluw et al. (2015), desarrollaron un ensayo fenotípico denominado el Método de inactivación de carbapenem (CIM), para detectar la actividad de las carbapenemasas en bacilos gramnegativos mediante la hidrólisis enzimática de los antibióticos incubándolos con suspensiones bacterianas; sin embargo, en el 2017 el CLSI presentó una serie de cambios a la técnica denominándose Método de inactivación de carbapenems modificado (CIMm). Los cambios consistían en que en lugar de usar agua destilada para la suspensión de la bacteria con el disco antibiótico se usaría el caldo TSB y un mayor tiempo de incubación (4 horas) del disco en dicho caldo (Lisboa et al., 2018).

En el 2019, Gutiérrez et al. demostraron en su estudio que el uso de imipenem como sustrato en el método CIM, en lugar de meropenem para la detección de carbapenemasas, aumenta tanto la sensibilidad como la especificidad.

Otro estudio en el 2021 concluye también en que la introducción de los discos de imipenem en la versión CIM estándar mejora la sensibilidad diagnóstica y la especificidad de la prueba para bacilos gram negativos no fermentadores (Bogiel et al., 2021).

En 2018, Jing et al. propusieron una metodología que reduce el tiempo del resultado del CIMm, esta nueva propuesta fue denominada como Método de inactivación de carbapenems

simplificado (CIMs). El fundamento era el mismo, sólo que ya no requería la previa incubación en caldo TSB sino más bien se realizaba la unión directa del disco antibiótico con las colonias del microorganismo a identificar. En este estudio donde se evaluó el performance del Método de inhibición de carbapenem modificado (CIMm) versus el método de inhibición de carbapenem simplificado (CIMs), los resultados mostraron que la tasa de concordancia de la CIMs y la CIMm fue del 100%, incluido un falso positivo.

En el 2020, Wang et al. presentaron un estudio, donde encontró que los aislamientos productores de carbapenemasas de PAE fueron negativos al CIMs cuando se usó disco de meropenem, lo que indica que CIMs usando disco de meropenem es inadecuado para la detección de actividad carbapenemasa en PAE, por lo que el disco de meropenem sólo debe aplicarse a búsqueda de carbapenemasas en Enterobacterias, sin embargo el disco de imipenem es recomendado usarse para PAE ya que con este disco de antibiótico el resultado del método CIMs tuvo muy buena performance.

En el 2014, Idelevich et al. realizaron un estudio en el que usó la metodología MALDI-TOF MS para identificar hemocultivos positivos utilizando subcultivos de periodos cortos de incubación, los tiempos controlados fueron de 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 12 h hasta que se identificó con éxito un patógeno. Ese mismo año se reportó un estudio en el que se evaluó y validó la utilidad de la metodología de subcultivo de corta incubación, donde se obtuvieron resultados satisfactorios para la identificación de especie del 90,4% para aislamientos de bacilos gram negativos y un 95,7% para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta identificación se realizó a partir de subcultivos con un tiempo de 5 horas de incubación (Verroken et al., 2015). Otro estudio del 2016 demostró que la identificación del germen a partir del barrido de un

subcultivo de pocas horas de incubación (4 horas) fue concordante con la técnica estándar realizada con subcultivos de 18-24 horas (Ballester-Téllez et al., 2017).

1.3 Objetivos

Objetivo General

Detectar rápidamente *Pseudomonas aeruginosas* productoras de carbapenemasas en hemocultivos a partir de subcultivos de corta incubación.

Objetivos Específicos

- Determinar la utilidad del MALDITOF para Identificar *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas a partir de subcultivos de corta incubación.
- Determinar la fiabilidad del método de inactivación del carbapenem simplificado (CIMs), usando cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de corta incubación.

1.4 Justificación

Las infecciones por bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos, y su elevada frecuencia tanto en hospitales como en la comunidad, se ha convertido en un problema de salud pública en el mundo debido a su asociación con hospitalizaciones más prolongadas, mayores tasas de fracasos terapéuticos, aumento de la mortalidad y mayores costos de la atención hospitalaria (Rada et al., 2019) .

Islas-Muñoz et al. (2018), indican que las bacteriemias por Bacilos Gram negativos multidrogoresistentes en pacientes con cáncer tiene una alta tasa de mortalidad a los 30 días y está estrechamente relacionada con un tratamiento antimicrobiano inadecuado en las primeras 24

h. Por lo que, una pronta identificación y estudio de sensibilidad antibiótica de los BGN aislado de los hemocultivos son de vital importancia para así poder brindar un tratamiento oportuno y adecuado, de esta manera reducir la morbilidad y la mortalidad de esta infección (Ruiz-Aragón et al., 2018).

La identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas es una de las aplicaciones con mayor impacto clínico potencial de la tecnología MALDI-TOF MS, ya que contribuye a una instauración más oportuna de la terapia antimicrobiana dirigida. Su uso ha demostrado un incremento en la supervivencia de los pacientes y la reducción de los costos derivados de la atención en salud (Maldonado et al., 2017). MALDI-TOF MS es una técnica rápida y fiable para la identificación bacteriana puesto que se puede tener la identificación del germen en tan solo 3 minutos. Sin embargo, los protocolos de identificación directa de MALDI-TOF MS a partir de frascos de hemocultivos incluyen varios pasos de lavado y extracción, lo que requiere tiempo práctico adicional e insumos costosos.

La resistencia antimicrobiana ha puesto en riesgo los logros de la medicina moderna. Entre las infecciones más temibles en la actualidad son las producidas por bacilos gramnegativos multirresistentes para las cuales no quedan casi o ninguna opción de tratamiento (Pérez, 2017).

La OMS ha buscado mejorar las iniciativas para favorecer la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos y la mejora de los existentes. Por esta razón la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que figuran 12 familias de bacterias consideradas como las más peligrosas para la salud humana siendo la *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a los carbapenémicos catalogada en la prioridad 1 (WHO, 2017).

Pseudomonas aeruginosa se ha convertido en un microorganismo altamente relacionado a infecciones asociadas a la atención de la salud, responsable de 32,600 hospitalizaciones, 2,700

muerter y hasta 767 millones de dólares en gastos hospitalarios en Estados Unidos en 2017 (CDC], 2019).

La bacteriemia de origen hospitalario por *Pseudomonas aeruginosa* genera una mayor mortalidad que otras bacteriemias por Gram negativos que afectan a la tercera parte de los pacientes en las primeras 48 horas, con un valor neto entre 35 y 60% (Valderrama et al., 2016).

Pseudomonas aeruginosa se caracteriza por su resistencia intrínseca mediada por la expresión de β -lactamasas cromosómicas inducibles y la producción inducible de bombas de expulsión. Además, puede desarrollar resistencia para todos los antimicrobianos posibles mediante mutaciones, conocida como resistencia adquirida (Jáuregui-Rojas et al., 2021).

Los carbapenems son importantes agentes terapéuticos en el entorno de atención médica. Debido al amplio espectro que presentan se usan como terapia de primera línea contra infecciones causadas por Enterobacterias con β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a las quinolonas y aminoglucósidos.

Los antibióticos carbapenémicos por lo general son administrados para tratar infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos, por lo que cuando las bacterias desarrollan resistencia a ellos, las opciones de tratamiento pueden ser extremadamente limitadas.

Valderrama et al. (2016), mencionan que en su estudio se observó que el uso del meropenem como tratamiento empírico es un factor de riesgo altamente predominante para inducir la resistencia lo cual concuerda con diversos estudios previos en otros países.

En la búsqueda de un método práctico y que disminuya el tiempo del reporte de la *Pseudomonas aeruginosa* causante de la bacteriemia, tanto su identificación como el mecanismo de resistencia que presenta, se ha diseñado este estudio basado en dos metodologías; la primera es el Subcultivo de incubación corta (SIC) y el Método de Inactivación de Carbapenem

Simplificado (CIMS). El uso de estas metodologías en conjunto nos permitirá obtener la identificación del germen y la detección del mecanismo de resistencia carbapenemasa en un periodo de tiempo de 11 a 17 horas posterior a la positividad del hemocultivo; de esta manera proponemos este algoritmo para acortar el tiempo de un posible tratamiento inadecuado y/o la tasa de mortalidad en nuestra población.

II. MARCO TEORICO

2.1 Bases Teóricas sobre el tema de investigación

Bacteriemia

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias de conocida patogenicidad en el torrente sanguíneo y se diagnostica mediante hemocultivos (García Lozano, 2017). El hecho de que las bacterias invadan el torrente sanguíneo supone un fracaso del sistema inmune por contener la infección en el foco primario y el uso de un tratamiento antibiótico inadecuado el cual puede desencadenar a una infección diseminada que podría entrañar un peor pronóstico y dar lugar a focos secundarios de sepsis.

La bacteriemia y la sepsis son eventos íntimamente relacionados. El concepto de bacteriemia es esencialmente microbiológico mientras que sepsis es un concepto eminentemente clínico y consiste en el desarrollo de una respuesta sistémica a la infección (García Ordóñez y Colmenero Castillo, 2006).

Hemocultivos

El hemocultivo es la herramienta diagnóstica más utilizada para determinar el agente etiológico, si se sospecha una bacteriemia (Carbajal y Aguirrechu, 2020; Guzmán et al., 2012; Franco, 2019)

Es un examen microbiológico que consta en estudiar la sangre por 5 días en métodos automatizados y permite la detección de bacteriemias, permitiendo adecuar la terapia antimicrobiana de acuerdo al microorganismo aislado según la sensibilidad in vitro que éste presente, puesto que la terapia se inicia generalmente de forma empírica (Baeza y Sandoval, 2019)

BD BACTEC™ FX

Una metodología muy empleada en los últimos años para los hemocultivos es el sistema BD BACTEC™ FX es un sistema automatizado y modular de monitorización continúa destinado a la detección del crecimiento bacteriano en hemocultivos mediante un sensor fluorimétrico de gases integrado en el vial del hemocultivo; los fotodetectores presentes en cada una de las estaciones del instrumento miden el nivel de fluorescencia emitido por cada vial, que se corresponde con la cantidad de CO₂ liberado por los microorganismos (Guna Serrano et al., 2019). De esta manera el sistema permite aislar el microorganismo patógeno presente en la sangre.

Subcultivo de corta incubación

Cultivos aislados a partir de frascos de hemocultivos, los cuales son incubados con un periodo menor al tiempo estándar (18 – 24h). Existen estudios que han demostrado que una incubación corta de 5 horas permite que la cepa ya pueda ser trabajada tanto para procedimientos de detección de especie mediante la tecnología MALDITOF como también la identificación de sensibilidad.

Identificación del germen causante de bacteriemia

La identificación de microorganismos se ha realizado tradicionalmente por métodos basados en tinciones que permiten la clasificación de la morfología microscópica con el fin de apoyar decisiones diagnósticas y terapéuticas tempranas; así como en pruebas *in vitro* basadas en reacciones bioquímicas utilizadas por sistemas manuales o automatizados, que integran pruebas con diferentes sustratos, incrementando la rapidez y simplicidad de la identificación.

Sin embargo, estos métodos fenotípicos tienen limitaciones relacionadas con su dependencia de los procesos metabólicos de los microorganismos, que requieren de un cultivo con crecimiento adecuado y tiempos de incubación mínimos para alcanzar un resultado (Maldonado et al., 2017).

Numerosos laboratorios de nuestro país realizan la identificación bacteriana tradicionalmente mediante el estudio de características fenotípicas; sin embargo, muchas veces no se puede llegar a identificar la especie de gérmenes exigentes por lo que es muy necesario adquirir nuevas tecnologías que llenen el vacío de estos reportes.

Espectrometría de masas Matrix-Assited Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF)

La tecnología MALDI-TOF permite el análisis de proteínas, principalmente de tipo ribosomal, para la identificación exacta de bacterias (incluyendo micobacterias), mohos y levaduras a través de la creación de un espectro de masas específico para cada microorganismo (Sierra et al., 2019). En este método, las proteínas desconocidas en estudio son hidrolizadas en pequeños péptidos cuyas masas absolutas se determinan mediante un espectrómetro de masas. La huella de tamaños de péptidos obtenida, que es única para cada microorganismo, es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos de tal forma que la huella problema se puede asociar estadísticamente con la huella más semejante y realizar así la identificación del microorganismo (March y Eiros, 2012).

Los sistemas comerciales más empleados en la actualidad que usan la tecnología MALDI-TOF MS para identificación de microorganismos son el sistema VITEK MS

(bioMérieux, Durham, NC) y el sistema MALDI Biotyper(r) (BrukerDaltonics Inc., Billerica, MA). Las bases de datos de los espectros de referencia se comercializan como parte de un sistema patentado y son construidas y mantenidas por los fabricantes, por lo que la capacidad de agregar espectros y construir bases de datos personalizados es importante para un análisis discriminatorio adicional usando MALDI-TOF MS que, además, permita la tipificación de cepas e investigaciones epidemiológicas. Debido a que los espectros obtenidos por MALDI TOF MS generalmente no son completamente idénticos a los que están incluidos en las bases de datos, estos sistemas asignan un valor de puntuación (MALDI Biotyper3) o nivel de confianza (VITEK(r) MS) a cada coincidencia, con base en las similitudes del microorganismo de prueba con los espectros de referencia (Maldonado et al., 2017).

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo gramnegativo móvil miembro de la familia *Pseudomonadaceae*. Cuenta con un flagelo polar que le confiere la motilidad. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios. Se caracteriza por ser parte del grupo de no fermentadores por su incapacidad de fermentar lactosa y la habilidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno (como acetato y amoniac) para obtener energía de la oxidación de azúcares (Riojas Hernández et al., 2021). *Pseudomonas aeruginosa* cuenta con mecanismos de resistencia antibiótica intrínsecos y adquiridos. Los mecanismos intrínsecos se refieren a la habilidad innata de entorpecer la eficacia de un antibiótico específico a través de características estructurales y funcionales inherentes. *P. aeruginosa* tiene la capacidad de generar resistencias a cualquier familia de antibióticos en el transcurso de una terapia prolongada. Por lo tanto, aislamientos inicialmente

susceptibles pueden convertirse en resistentes en los siguientes días de antibioticoterapia (Pang et al., 2019).

Resistencia antibiótica

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de una bacteria para sobrevivir y replicarse en presencia de sustancias bacteriostáticas o bactericidas (Franco, 2019).

La resistencia a los antibióticos de las bacterias Gram negativas se produce mediante diversos mecanismos, entre los que se pueden mencionar la alteración del sitio blanco de ciertos antibióticos, el incremento de la expresión de los sistemas de eflujo, la alteración de la permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas y la producción de enzimas que inactivan los antibióticos, de las cuales este último mecanismo de resistencia es el más importante (Rada y Restrepo, 2019). A aquellos microorganismos con resistencia a un agente de tres o más categorías antimicrobianas se le denomina Multidrogoresistentes (MDR) (Suárez Trueba et al., 2012).

Carbapenemasas

Las carbapenemasas son el mecanismo más importante de resistencia de BGN; los genes asociados a esta resistencia se localizan en cromosomas o plásmidos que favorecen su propagación y transferencia (Angles-Yanqui et al., 2020).

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las β -lactamasas. Tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros β -lactámicos. Además, presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles (Moreno-Monge, 2013).

Se conocen 3 tipos moleculares de carbapenemasas, denominados A, B y D. Las de las clases A y D son serina-beta-lactamasas, mientras que las de clase B, son metalo-beta-lactamasas, es decir, su actividad hidrolítica depende de la presencia de zinc. Las carbapenemasas también hidrolizan otros betalactámicos, además de carbapenemas, pero el perfil de sustrato concreto depende de la enzima considerada (Cercenado, 2015).

Las carbapenemasas de tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas) son de la clase molecular A y son las más prevalentes en el mundo. Estas enzimas hidrolizan las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos; además, son inhibidas por el ácido borónico y, parcialmente, por los inhibidores de las betalactamasas, como el ácido clavulánico y el tazobactam.

Entre las carbapenemasas de clase molecular B, se han identificado las enzimas VIM (metalo-betalactamasas codificadas por el integrón verona), las cuales constituyen uno de los más grandes subgrupos de las metalobetalactamasas de subclase molecular B1 (MLB B1), de la cual se han descrito 46 variantes. La enzima IMP (betalactamasa de clase B que hidroliza imipenem); fue identificada en un plásmido de conjugación con un perfil de resistencia a imipenem y a cefalosporinas de espectro extendido.

Las carbapenemasas NDM (metalo-betalactamasas de tipo Nueva Delhi) confieren una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos y tienen un gran efecto negativo en los tratamientos. Esta familia de enzimas NDM comprende 16 variantes. Las enzimas NDM son resistentes a los carbapenémicos a excepción de la colistina. Su diseminación se ha detectado principalmente en enterobacterias y en menor proporción, en *Acinetobacter spp.* y *P. aeruginosa*.

Las metalo-betalactamasas de clase D se denominaron enzimas de tipo oxacilinasas (OXA), por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la cloxacilina. Sus genes están integrados en el cromosoma, los plásmidos o los integrones. Además, poseen una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos y se han identificado 498 variantes, las cuales se caracterizan porque son poco inhibidas por los inhibidores de las betalactamasas y EDTA (Rada et al., 2019).

En la actualidad, las carbapenemasas clínicamente más importantes son las de tipo KPC (clase A), IMP/VIM (clase B) y OXA-48 (clase D) (Velásquez et al., 2013).

Rada et al. (2019), señalan que entre el grupo de bacilos gram negativos no fermentadores que presentan mayor resistencia a carbapenems son los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

La resistencia a carbapenémicos en especies *Pseudomonas* puede tener un origen cromosómico o estar mediada por la adquisición horizontal de genes productores de carbapenemasas (Riojas Hernández et al., 2021).

Detección del mecanismo de resistencia

El estudio de estos mecanismos de resistencia enzimática varía según el mecanismo y grupo bacteriano implicado. El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorios (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) establece el tamizaje, detección y confirmación de BLEE y bacterias productoras de carbapenemasas.

Dentro de las pruebas de tamizaje para la detección de bacilos gram negativos productoras de carbapenemasas tenemos a las siguientes: Medios cromogénicos para cultivar e identificar con relativa rapidez cepas de bacterias resistentes a los carbapenémicos directamente de una muestra

clínica. Estos medios suelen usarse mucho en estudios de vigilancia intrahospitalaria. Este método está basado en la capacidad de las bacterias para crecer en un medio selectivo con la adición de un antibiótico de carbapenem; sin embargo, estas pruebas no son confirmatorias puesto que también detectan sensibilidad reducida a carbapenems por lo que es necesario realizar pruebas adicionales y/o confirmatorias. Las pruebas bioquímicas como Blue carba o Carba NP son otros métodos relativamente rápidos, Estas pruebas se basan en la hidrólisis del imipenem por un lisado de bacterias productoras de carbapenemasas. Un resultado positivo disminuye el pH del medio produciendo la reacción que cambie el color del indicador.

Métodos inmunocromatográficos que nos permiten una detección rápida de carbapenemasas a partir de colonias aisladas. Estas pruebas están basadas en la tecnología de membrana con nanopartículas de oro coloidal. Actualmente existen diversas casas comerciales que ofrecen estas pruebas con presentaciones para detectar diferentes enzimas MBL, KPC y tipo OXA.

Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen el estándar de método diagnóstico, permitiendo obtener resultados en 4 a 6 horas con excelente rendimiento. Su principal limitación es el alto costo y la disponibilidad de recursos e infraestructura en las instituciones de salud.

Existen también métodos fenotípicos que consisten en colocar estratégicamente discos del carbapenem y enfrentarlos con discos de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) o el ácido fenil borónico y visualizar las distorsiones o sinergias de los halos.

Método de inactivación de carbapenem (CIM)

Es una técnica fenotípica desarrollada para detectar la actividad de las carbapenemasas en bacilos gramnegativos mediante la hidrólisis enzimática de los antibióticos incubándolos con suspensiones bacterianas (Lisboa et al., 2018; van der Zwaluw et al., 2015).

Método de inactivación de carbapenem simplificado (CIMs)

Se basa en el método de inactivación de carbapenem modificado (CIMm) sólo que aplica un cambio en el procedimiento el cual acorta el proceso experimental. En lugar de incubar el disco de antibiótico en el medio de cultivo del organismo durante 4 h como en el CIMm, el organismo a analizar se untó directamente sobre un disco de antibiótico en el CIMs (Jing et al., 2018).

III. MÉTODO

3.1 Tipo de Investigación

Se realizó una investigación de tipo prospectiva, cuantitativa siendo el diseño de investigación descriptiva.

3.2 Ámbito Temporal y Espacial

La investigación se realizó durante 2 meses en el área de microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades neoplásicas (INEN), el cual es una institución especializada en detección, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de enfermedades tumorales o neoplásicas. Esta institución se encuentra ubicada en la Avenida Angamos 2520 en el distrito de Surquillo de la ciudad de Lima.

3.3 Variables

Tabla 1.

Nombrar esta tabla

Variables	Tipo de variable	Escala de Medición	Categoría	Indicador	Fuente
Identificación de la cepa	Cualitativa	Nominal	Analítica	Pseudomona aeruginosa	MALDI-TOF
Método de inactivación de carbapenem simplificado	Cualitativa	Nominal	Analítica	Positivo / Negativo	Lectura de diámetro de halo (mm)

3.4 Población y Muestra

La población estuvo constituida por cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* con mecanismo de resistencia a Carbapenems del cepario de microbiología almacenadas a -20°C,

procedentes de cultivos positivos de pacientes atendidos en el INEN en el periodo 2017 al 2019. Estas cepas cuyos perfiles de resistencias fueron confirmadas por el método de rutina de laboratorio mediante el equipo automatizado BD Phoenix 100™ bajo criterios CLSI y sus genes de resistencia fueron caracterizados por el método de Biología molecular Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

La muestra fue de 82 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con presencia de mecanismo de resistencia a carbapenems del cepario de microbiología INEN.

Criterios de Inclusión: Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* con mecanismo de resistencia a carbapenems confirmadas mediante PCR obtenidas del cepario del servicio de Microbiología procedentes de cultivos positivos de pacientes atendidos en el INEN en el periodo de 2017 a 2019.

Criterios de Exclusión: Aislamientos no recuperados, otros aislamientos que no posean el gen de resistencia.

3.5 Instrumentos

Ficha de recolección de datos (Ver anexo C).

3.6 Procedimientos

Se recolectó 82 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con presencia de mecanismo de resistencia carbapenemasa, los cuales se encuentran almacenados a -80°C en la congeladora de investigación del servicio de microbiología del INEN, fueron reactivados en agar sangre e

incubados a 37°C por 16h. Posterior a esto se realizó una suspensión a una escala de 0.5 Mac Farland en solución salina el cual fueron medidos en el nefelómetro BD PhoenixSpec™. En frascos de hemocultivo BD Bactec Plus Aerobic de pacientes cuyos cultivos de sangre fueron estudiados por 5 días y dando como resultado negativo, se inoculó la suspensión de 0.5 Mac Farland del microorganismo a estudiar con la ayuda de una jeringa. Los frascos se incubaron en un sistema de hemocultivo automatizado (BD) Bactec FX; después de que los hemocultivos indiquen la positividad, se extrajo 10 ml del líquido de hemocultivo y se colocó en un tubo falcón de 15mm los cuales se centrifugaron a 3500 rpm x 10 minutos para lograr una mayor concentración de carga bacteriana. Después de la centrifugación con la ayuda de una pipeta pasteur se extrajo la mayor cantidad de capa bacteriana, la cual se encuentra entre el sedimento (Paquete Globular) y el plasma (Ver ANEXO D). Estas fueron sembradas en una placa de agar sangre e incubados a 37°C por 5 horas. Pasado este tiempo con la capa de crecimiento de los subcultivos se realizó la identificación del microorganismo siguiendo el procedimiento establecido de la metodología BD™ Bruker MALDI Biotyper™. Una vez identificado la *Pseudomona aeuginosa* se procedió a realizar la detección del mecanismo de Resistencia enzimática mediante la técnica de Método de inactivación de Carbapenems simplificado usando el disco de Imipenem. El procedimiento de inactivación de carbapenem simplificado consiste en untar directamente sobre los discos de antibióticos la cepa a estudiar con la ayuda de un asa de siembra. Posteriormente, los discos se aplicaron a placas de agar Mueller-Hinton previamente inoculadas con una suspensión 0,5 McFarland de una cepa indicadora susceptible (*Escherichia coli* ATCC 25922). Las placas se incubaron a 37°C durante 6h. Posterior a esta incubación se realizó la lectura del diámetro de los halos a

las 6, 8, 10 y 12 horas de incubación. Se realizó el mismo procedimiento a la cepa ATCC PAE 27853, el cual fue nuestro control negativo.

3.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos se consignaron en la ficha de recolección de datos, los cuales posteriormente fueron ingresados, procesados y analizados mediante el uso de Microsoft Excel. Estos datos se expresaron en tablas, gráficos, distribución de frecuencias y porcentajes de acuerdo a los objetivos de la investigación.

3.8 Consideraciones éticas

En este estudio no resulta necesario la elaboración de un consentimiento informado debido a que se trabajará con aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, se obviaron la historia clínica y datos adicionales del paciente. Se consideró los lineamientos de ética del comité de investigación de la institución donde se realizó el estudio (INEN).

IV. RESULTADOS

Los 82 subcultivos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas, cuya incubación fueron de tan sólo 5 horas; presentaron una identificación con un score >1.7 , el cual es un score aceptable y de muy buena confiabilidad mediante el uso de la tecnología MALDITOF (Fig. 1 y 2).

Figura 1.

Score del MALDITOF en la identificación de PAE a partir de subcultivos de corta incubación.

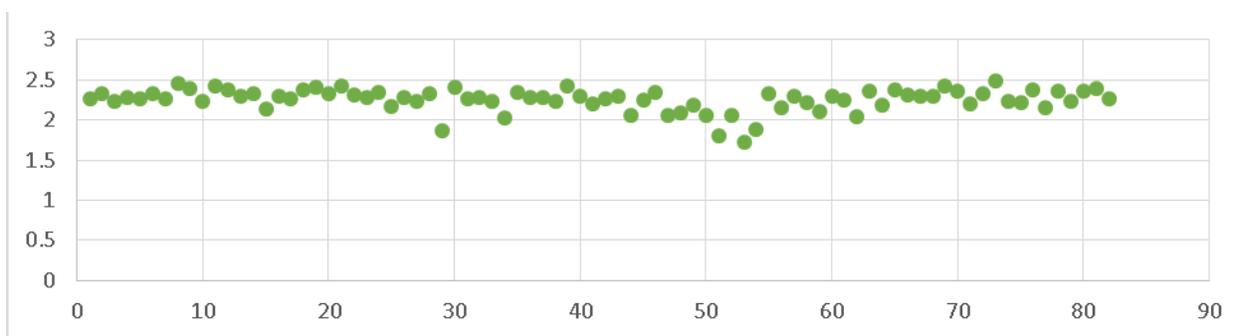
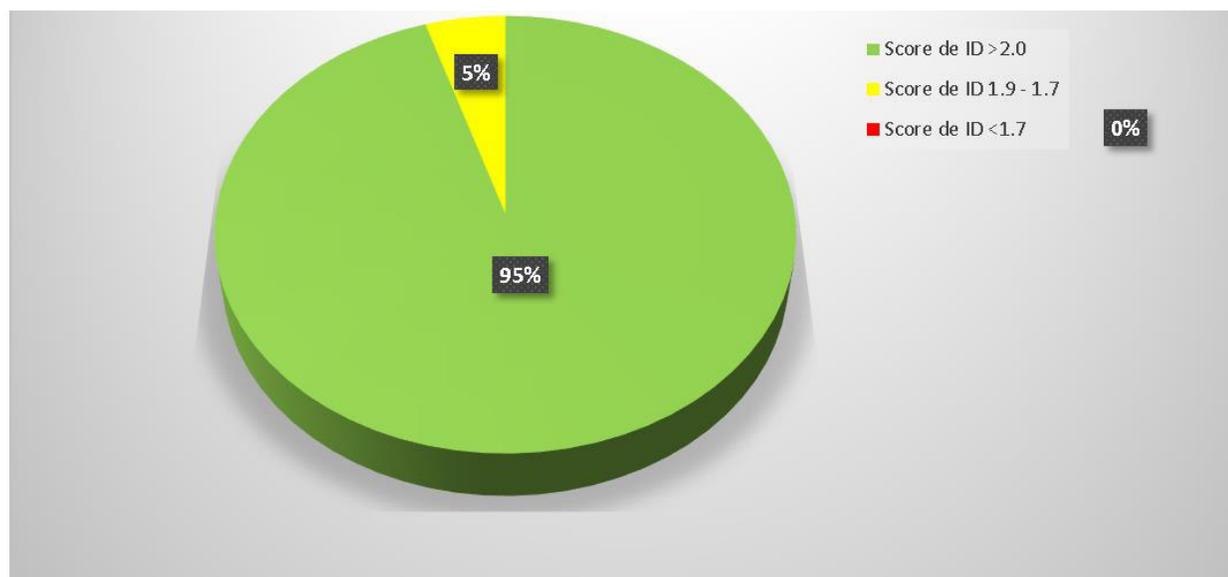


Figura 2.

Porcentaje de score de la identificación por MALDITOF



En la investigación se tuvo como referencia los parámetros establecidos en el estudio de validación del CIM simplificado de Jing et al. (2018). Dichos parámetros manifiestan que Halos ≤ 22 mm son interpretados como un resultado positivo, halos de 23 a 25 mm como resultado indeterminado, halos ≥ 26 mm se consideró como un resultado negativo.

Teniendo en cuenta lo mencionado, de las 82 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 42 presentaban el gen *bla* IMP, 39 el gen *bla* VIM y 1 tenía ambos genes. Todos dieron como resultado positivo a la prueba del CIMs a partir de subcultivos de corta incubación ya que presentaron halos menores a 20 mm.

Tabla 2.

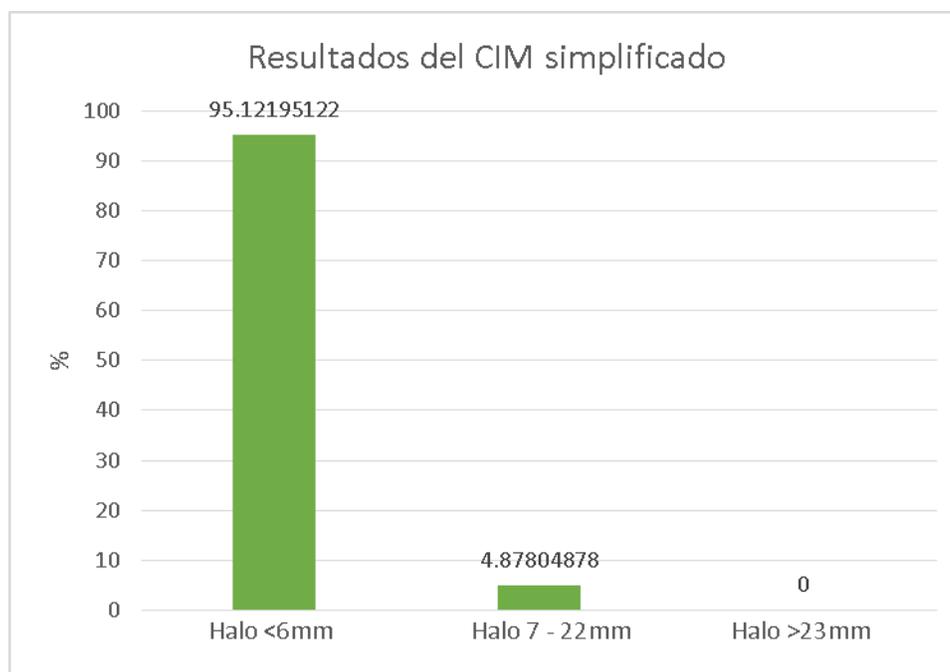
Resultados del CIM simplificado

DETECCION DE PAE PRODUCTORA DE CARBAPENEMASAS MEDIANTE EL CIMs A PARTIR DE SUBCULTIVOS DE CORTA INCUBACION				
Tipo de Carbapenemasa de la PAE (PCR)	N°	CIMs POSITIVO		CIMs INDETERMINADO O NEGATIVO
		Halo ≤ 6 mm	Halo 7 - 22 mm	Halo ≥ 23 mm
Gen <i>bla</i> IMP	42	40	2	0
Gen <i>bla</i> VIM	39	38	1	0
Gen <i>bla</i> IMP+VIM	1	1	0	0
TOTAL	82	100.00%		0%

En el estudio se observó que dentro de los resultados positivos al CIM simplificado, 78 cepas (95.1%) brindaron halos de 6 mm desde las 6 horas de incubación y tan solo 4 cepas (4.8%) dieron halos entre 7 a 22 mm (Fig. 3).

Figura 3.

Resultados de los diámetros mostrados en el CIM simplificado.



Los resultados obtenidos fueron satisfactorios tanto para la de identificación como las de detección de carbapenemasas mediante el uso del CIM simplificado a partir de subcultivos de corta incubación (5horas).

Se pudo evidenciar que con el algoritmo de la investigación se disminuyó el tiempo del reporte de un hemocultivo positivo cuya información contenga tanto la identificación como el mecanismo de resistencia productor de carbapenemasa. Dicho reporte puede ser brindado a partir de las 11 horas posteriores a la positividad del frasco de hemocultivo.

V. DISCUSION DE RESULTADOS

Diversos estudios han propuesto métodos directos de hemocultivos para acortar los tiempos de reporte de resultados, sin embargo estas técnicas presentan numerosos lavados, centrifugaciones y aditivos adicionales que generan demanda de costos y complicaciones en el proceso, por esta razón la investigación tuvo como finalidad proponer una alternativa que acelere el reporte de hemocultivos positivos tanto en la identificación como la detección de la producción de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* sin necesidad de realizar procedimientos engorrosos ni usar reactivos o aditivos costosos, tan solo usando la tecnología MALDITOF y CIM simplificado a partir de subcultivos de corta incubación. Si bien anteriormente se ha probado el método de identificación por MALDITOF desde subcultivos de corta incubación, tales como el estudio de Idelevich et al. (2014) donde previo a la lectura por la espectrofotometría de masas, se adicionó el reactivo de ácido fórmico al 100% a todas las cepas de los subcultivos en el extendido directo de la placa del MALDITOF. Estos subcultivos fueron controlados en periodos de 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 12 horas. Sus resultados evidenciaron que la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* se presentó con mayor éxito en subcultivos con una incubación mayor a las 3 horas.

Ballester-Téllez et al. (2017), realizaron un estudio similar, pero cambiando la incubación de los subcultivos a un periodo de 4 horas, dando muy buenos resultados en la identificación de bacilos gram negativos con una concordancia del 95.65%.

Verroken et al., en el 2015, presentaron un estudio también con el uso de subcultivos de 5 horas de incubación en el cual sus resultados en la identificación de no fermentadores fueron de 92,7%.

En nuestra investigación el 100% de los subcultivos con 5 horas de incubación, fueron identificadas con un alto score (<1.7) y sin haber adicionado el reactivo de ácido fórmico que describieron los otros estudios previos.

Con respecto al CIM simplificado, estudios previos han mostrado la buena performance que presenta en la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, no ha sido evaluado el uso de esta metodología en subcultivos de corta incubación por lo que nuestro estudio quiso demostrar la efectividad del CIMs en subcultivos de 5 horas de incubación.

Se usó el disco de antibiótico imipenem por la mayor sensibilidad mostrada del uso de imipenem como sustrato en el método CIM, en lugar de meropenem para la detección de carbapenemasas, aumenta tanto la sensibilidad como la especificidad (sensibilidad del 90,1% y especificidad del 98,9% para imipenem versus sensibilidad de 85,5% y especificidad de 95,7% para meropenem (Gutiérrez et al., 2019). En el 2020, Wang D. et al. indicaron que CIMs usando disco de meropenem es inadecuado para la detección de actividad carbapenemasa en PAE; sin embargo, el disco de imipenem es recomendado ya que con este disco de antibiótico el resultado del método CIMs tuvo muy buena performance.

Si bien 78 cepas estudiadas dieron un halo de 6mm al CIMs desde la primera lectura de las 6h hasta la lectura de las 12 horas sin notarse cambio alguno en el tamaño. Las otras 4 cepas que

generaron halos de 10, 16, 17 y 20mm, solo 2 de ellas presentaron cambios en el tamaño de halo en las lecturas posteriores, pero brindando una lectura como tamaño máximo de halo de 20 mm., evidenciando así que se puede reportar un resultado positivo desde la primera lectura.

Una limitación de nuestro estudio fue que solo se trabajó con *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas con los genes *bla* VIM y *bla* IMP por lo que no se pudo comprobar la utilidad de esta técnica en los otros tipos de genes de resistencia a carbapenems.

VI. CONCLUSIONES

- Se demostró que los subcultivos de hemocultivos con *Pseudomonas aeruginosa* de tan solo 5 horas de incubación pueden ser trabajados y ser identificados satisfactoriamente con la metodología MALDITOF de manera directa y sin ningún aditivo adicional.
- El uso del CIM simplificado en subcultivos de *Pseudomonas aeruginosas* productoras de carbapenemasas con tan solo un periodo de 5 horas de incubación presenta muy buena performance en la detección del mecanismo de resistencia a carbapenems.
- Se evidenció que los halos obtenidos mediante el CIM simplificado no mostraron variación significativa en las lecturas de las 6, 8, 10 y 12 horas por lo que el reporte se puede realizar desde la primera lectura.
- Con esta investigación se puede concluir que la rápida identificación y detección de hemocultivos con *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas es posible mediante el uso de subcultivos de corta incubación (5 horas), tecnología MALDITOF y el CIM simplificado, el uso de este algoritmo nos permite obtener el reporte del hemocultivo desde las 11 horas posteriores a la positividad del frasco del hemocultivo generando de esta manera un ahorro desde 24 a 36 horas en la emisión de información relevante para la ayuda al clínico a brindar al paciente un tratamiento óptimo y oportuno.

VII. RECOMENDACIONES

- Los resultados de esta investigación contribuyen en la implementación de un nuevo algoritmo para identificación y detección de hemocultivos con *Pseudomonas aeruginosas* productoras de carbapenemasas en un tiempo mucho más corto sin necesidad de usar procedimientos engorrosos ni aditivos costosos.
- Nuestra investigación ha demostrado una vez más, tal como estudios anteriores que el uso de subcultivos de corta incubación es una alternativa muy adaptable, sencilla y beneficiosa de poner en práctica en nuestras rutinas de laboratorio.
- El CIM simplificado brinda resultados muy confiables por lo que es una metodología que puede ser considerada dentro de nuestros protocolos de trabajo en la búsqueda y detección de resistencias a carbapenems en casos en los que se necesite un reporte de manera muy urgente.
- Es necesario seguir investigando y probando nuevas alternativas que puedan reducir el tiempo de reporte de los hemocultivos positivos para así poder frenar la alta tasa de mortalidad de bacteriemias con el uso de un tratamiento correcto, eficaz y oportunamente.

VIII. REFERENCIAS

- Abad, M., Procopio, N., Hurtado, P., Corral, A., & Francisco, R. (2019). *Bacteriemias en pacientes oncológicos del Instituto del Cáncer SOLCA . Cuenca , 2011- 2016*. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca. Vol. 37, 31 – 41.
- Adrianzén, D., Arbizu, Á., Ortiz, J., & Samalvides, F. (2013). *Mortalidad por bacteriemia causada por Escherichia coli y Klebsiella spp. productoras de beta lactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 18–25. <https://doi.org/10.1590/s1726-46342013000100004>
- Al-Otaibi, F. E., Bukhari, E. E., Badr, M., & Alrabiaa, A. A. (2016). *Prevalence and risk factors of Gram-negative bacilli causing blood stream infection in patients with malignancy*. *Saudi Medical Journal*, 37(9), 979–984. <https://doi.org/10.15537/smj.2016.9.14211>
- Angles-Yanqui, E., Huaranga-Marcelo, J., Sacsquispe-Contreras, R., & Pampa-Espinoza, L. (2020). *Panorama de las carbapenemasas en Perú*. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.61>

Antequera M, A., Saez B, C., Ciudad S, M., Garcia B, M. J., Moyano V, B., Rodriguez C, P., Roy V, E., Aguilera G, M., Alonso N, E., Cardenas I, M. J., Castro G, S., Domingo G, D., & Barrios B, A. (2020). *Epidemiologia, Tratamiento y mortalidad en pacientes infectados por enterobacterias productoras de carbapenemasas*. 37(3), 295–303.

Baeza, A., & Sandoval, C. (2019). *Frecuencia de Aislamientos Microbiológicos en Hemocultivos Recolectados en un Hospital de Alta Complejidad durante 2011 - 2012*. J. health med. Sci., 5(2), 119–123.

Ballester-Téllez, M., Recacha, E., de Cueto, M., & Pascual, Á. (2017). Identificación y determinación de sensibilidad a antibióticos de aislados de hemocultivos a partir de subcultivos de corta incubación. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(9), 582–585. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.01.007>

Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Fossati L, Cavallo R, Costa C. (2020). *Direct β lactam inactivation method: a new low-cost assay for rapid detection of carbapenemase- or extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacterales directly from positive blood culture bottles*. J Clin Microbiol 58:e01178-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01178-19>.

Bogiel, T., Rzepka, M., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). An Application of Imipenem Discs or *P. aeruginosa* ATCC 27853 Reference Strain Increases

Sensitivity of Carbapenem Inactivation Method for Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 10(7), 875.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics10070875>

Bolukçu S, Gülay O. (2021). *Frequencies and Antibiotic Susceptibilities of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. Isolated from Blood Culture: A 7-year Trend Analysis of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. Bacteremias*. *Haydarpasa Numune Med J*; 61(1):100–104 doi: 10.14744/hnhj.2020.38039

Bousquet, A., Malfuson, J. V., Sanmartin, N., Konopacki, J., Macnab, C., Souleau, B., de Revel, T., Elouennass, M., Samson, T., Soler, C., Foissaud, V., & Martinaud, C. (2014). *An 8-year survey of strains identified in blood cultures in a clinical haematology unit*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(1).
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12294>

Carvajal Aballe, M., & Aguirrechu Caballero, I. (2020). Sepsis en pacientes con tumores sólidos en quimioterapia. *Ciencia y Salud*, 4(3), 53–61.
<https://doi.org/10.22206/cysa.2020.v4i3.pp53-61>

Casellas, J. M. (2011). *Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología*. 30(6), 519–528.

Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Centers for Disease Control and Prevention (USA). <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>.

Cercenado, E. (2015). Laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Bacteriología. *Rev Esp Quimioter*, 28, 8–11.

De La Rosa, G., León, A. L., & Jaimes, F. (2016). Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 33(2), 141–149. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200003>

Durand, C., Boudet, A., Lavigne, J. P., & Pantel, A. (2020). Evaluation of Two Methods for the Detection of Third Generation Cephalosporins Resistant Enterobacterales Directly From Positive Blood Cultures. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00491>

Falconí Sarmiento, A., Nolasco Mejia, M., Bedoya Rozas, A., Amaro Giraldo, C., & Málaga, G. (2018). Frequency and risk factors for bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in patients of a public hospital in Lima, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1), 62–67. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3601>

- Franco Marín, E. M. (2019) *Relación entre Antibioticoterapia Inicial Empírica y Mortalidad en Pacientes con Bacteriemia Hospitalizados en el Hospital III Daniel Alcides Carrión de Tacna de Agosto del 2017 a Agosto del 2018 [Tesis de bachiller]*, Universidad Privada de Tacna. Facultad de Ciencias de la Salud. Repositorio Institucional. <https://repositorio.upt.edu.pe/handle/20.500.12969/663>
- Gagetti, P., Pasteran, F., Ceriana, P., Prieto, M., Cipolla, L., Tuduri, E., Bruinsma, N., Galas, M., Ramón-Pardo, P., & Corso, A. (2020). Evolución del desempeño de Laboratorios de Referencia de América Latina en la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44, 1. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2020.42>
- García-Gómez, M., Guío, L., Hernández, J. L., Vilar, B., Pijoán, J. I., & Montejo, J. M. (2015). Bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and other beta-lactamases (ampC and carbapenemase) producing Enterobacteriaceae: association with health-care and cancer. *Revista Española de Quimioterapia: Publicación Oficial de La Sociedad Española de Quimioterapia*, 28(5), 256–262.
- García Lozano, T. (2017). Bacteriemia en pacientes oncológicos. Reflexiones sobre la importancia del uso de los hemocultivos. *Terapeía: Estudios y Propuestas En Ciencias de La Salud*, 9, 97–106.

- García Ordóñez, M. A., & Colmenero Castillo, J. D. (2006). Modelos pronósticos en bacteriemia y sepsis. *Anales de Medicina Interna*, 23(2), 53-55. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992006000200001&lng=es&tlng=es
- Guna Serrano, M. R., Larrosa Escartín, N., Marín Arriaza, M., & Rodríguez Díaz, J. C. (2019). Microbiological diagnosis of bacteraemia and fungaemia: Blood cultures and molecular methods. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(5), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.005>
- Gutiérrez, S., Correa, A., Hernández-Gómez, C., De La Cadena, E., Pallares, C., & Villegas, M. V. (2019). Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(10), 648–651. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.02.004>
- Guzmán, A. M., Sánchez, T., & de la Barra, R. (2012). Análisis de la monitorización de cinco indicadores de calidad del hemocultivo en un hospital universitario en Chile 2009-2011. *Revista Chilena de Infectología*, 29(4), 406–411. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000400007>
- Idelevich, E. A., Schüle, I., Grünastel, B., Wüllenweber, J., Peters, G., & Becker, K. (2014). Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by

MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), 1001–1006. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12640>

Islas-Muñoz, B., Volkow-Fernández, P., Ibanes-Gutiérrez, C., Villamar-Ramírez, A., Vilar-Compte, D., & Cornejo-Juárez, P. (2018). Bloodstream infections in cancer patients. Risk factors associated with mortality. *International Journal of Infectious Diseases*, 71, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.03.022>

Jáuregui-Rojas, P., Vásquez-Tirado, G., Rodríguez-Montoya, R., & Albínez-Pérez, J. (2021). Factores de riesgo para infección por pseudomonas aeruginosa multirresistente en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica de la unidad de cuidados intensivos. Estudio multicéntrico. *Revista Del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 14(1), 13–17. <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2021.141.862>

Jing, X., Zhou, H., Min, X., Zhang, X., Yang, Q., Du, S., Li, Y., Yu, F., Jia, M., Zhan, Y., Zeng, Y., Yang, B., Pan, Y., Lu, B., Liu, R., & Zeng, J. (2018). The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02391>

- Lisboa, L. F., Turnbull, L. A., Boyd, D. A., Mulvey, M. R., & Dingle, T. C. (2018). Evaluation of a modified carbapenem inactivation method for detection of carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(1), 1–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.01234-17>
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>
- March, G. A., & Eiros, J. M. (2012). Impacto De La Metodología Maldi-Tof En La Identificación Clínica De Agentes Infecciosos. *Electronic Journal of Biomedicine*, 1, 1–6. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=81282481&lang=es&site=ehost-live>
- Martín-Pujol, O., Tosco-Nuñez, T., & de Miguel-Martinez, I. (2019). Comparación de tres procedimientos para la identificación rápida de microorganismos causantes de bacteriemias. Evaluación de su eficacia y aplicabilidad en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(5), 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.06.018>
- Mayta-Barrios, M. M., Ramirez-Illescas, J. J., Pampa-Espinoza, L., & Yagui-Moscoso, M. J. A. (2021). Caracterización molecular de carbapenemasas en el Perú durante el

2019. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(1), 113–118.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.5882>

Mazzillo Vega, L., & Cabrera Bravo, N. (2020). Uso racional de antibióticos y tecnología FilmArray para identificación rápida de bacteriemias en unidad de cuidados intensivos pediátrica. *Revista Chilena de Pediatría*, 91(4).
<https://doi.org/10.32641/rchped.v91i4.1458>

Moreno-Monge, K. M. (2013). Terapéutica Médica Carbapenémicos: Tipos Y Mecanismos De Resistencia. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXX*, 608(608), 599–605. <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>

Oviaño, M. (2019) Rapid identification of microorganisms directly from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 37, Issue 5, Pages 287-289, ISSN 0213-005X,
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.12.007>

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

- Pérez, D. (2017). *Resistencia Antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud"*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 69(3). <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/263/182>
- Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39, 199–220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>
- Reinhart, K., Daniels, R., Kisson, N.; Machado, F.R., Schachter, R.D., & Finger, S. (2017). Recognizing Sepsis as a Global Health Priority – A WHO Resolution. *New England Journal of Medicine*, 377(5), 414-417. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170>
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- Riojas Hernández, M. P., Pérez Cavazos, S., De la Peña Aguilar, G., Vaquera Aparicio, D. N., Castillo Bejarano, J. I., Mascareñas de los Santos, A. H., & De la O Cavazos, M. E. (2021). Bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* en niños: perfil de

resistencia antimicrobiana. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 34(1), 34–40. <https://doi.org/10.35366/99826>

Ruiz-Aragón, J., Ballester-Téllez, M., Gutiérrez-Gutiérrez, B., de Cueto, M., Rodríguez-Baño, J., & Pascual, Á. (2018). Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(8), 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.08.012>

Salvador-Luján, G., Ramírez-Illescas, J., Delgado-Flores, M., Núñez-Llanos, A., & Mayta-Barrios, M. (2021). Primer reporte de carbapenemasa tipo KPC en *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(3), 474–475. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.383.7044>

Sánchez-pardo, S., Ochoa-díaz, A. F., Mauricio, R., Marina, E., Alfonso, R., Interna, P. D. M., Santander, H. U. De, & Santander, U. I. De. (2016). *Investigación Clínica Factores relacionados con letalidad en pacientes con bacteriemia hospitalizados por patología médica en una institución de tercer nivel en 2014–2016*. *Revista chilena de infectología*, 37(5), 515-522. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000500515>

- Sierra, E., Maldonado, N., Arroyave, B., Robledo, C., & Robledo, J. (2019). Identificación directa de microorganismos a partir de muestras de orina y hemocultivos utilizando MALDI-TOF. *Infectio*, 23(4), 364. <https://doi.org/10.22354/in.v23i4.812>
- Sierra, J., Díaz, M. V., de Jesús García, M., Finello, M., Suasnabar, D. F., Richetta, L., Toranzo, A., Hernández, D., Cometto, M. A., Vázquez, S. M., Caeiro, J. P., & Saad, E. J. (2020). Infecciones del torrente sanguíneo en pacientes oncológicos. *Medicina*, 80(4), 329–338.
- Siller-Ruiz, M., Hernández-Egido, S., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2017). Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(5), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.010>
- Suárez Trueba, B., Hart Casares, M., Espinosa Rivera, F., & Salazar Rodríguez, D. (2012). Detección de mecanismos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidrogosresistentes. 51(3), 228–238.
- Tofas, P., Samarkos, M., Piperaki, E.-T., Kosmidis, C., Triantafyllopoulou, I.-D., Kotsopoulou, M., Pantazatou, A., Perlorentzou, S., Poulli, A., Vagia, M., & Daikos, G. L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in patients with hematologic malignancies: risk factors, treatment and outcome. *Diagnostic Microbiology and*

Infectious Disease, 88(4), 335–341.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.003>

Valderrama, S. L., González, P. F., Caro, M. A., Ardila, N., Ariza, B., Gil, F., & Álvarez, C. (2016). Factores de riesgo para bacteriemia adquirida en el hospital por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en un hospital colombiano. *Biomédica*, 36. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2784>

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

Vashchyk, Y., Morozenko, D., Seliukova, N., Zakhariev, A., Dotsenko, R., Zemlianskyi, A., Shapovalova, O., & Dotsenko, E. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* as a priority group representative of bacteria with multiple antibiotic resistance. *ScienceRise: Biological Science*, (3 (28), 33–40. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2021.241238>

Velásquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo, Y., Sacsquispe, R., Suárez, L., & Fernández, N. (2013). *Klebsiella pneumoniae* resistente a los

carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Soc Peru Med Interna*, 26(4), 193.

Velázquez-Acosta, C., Cornejo-Juárez, P., & Volkow-Fernández, P. (2018). Cepas E-ESKAPE multidrogorresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer. *Salud Publica de Mexico*, 60(2), 151–157. <https://doi.org/10.21149/8767>

Verroken, A., Defourny, L., Lechgar, L., Magnette, A., Delmée, M., & Glupczynski, Y. (2015). Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(2), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2242-4>

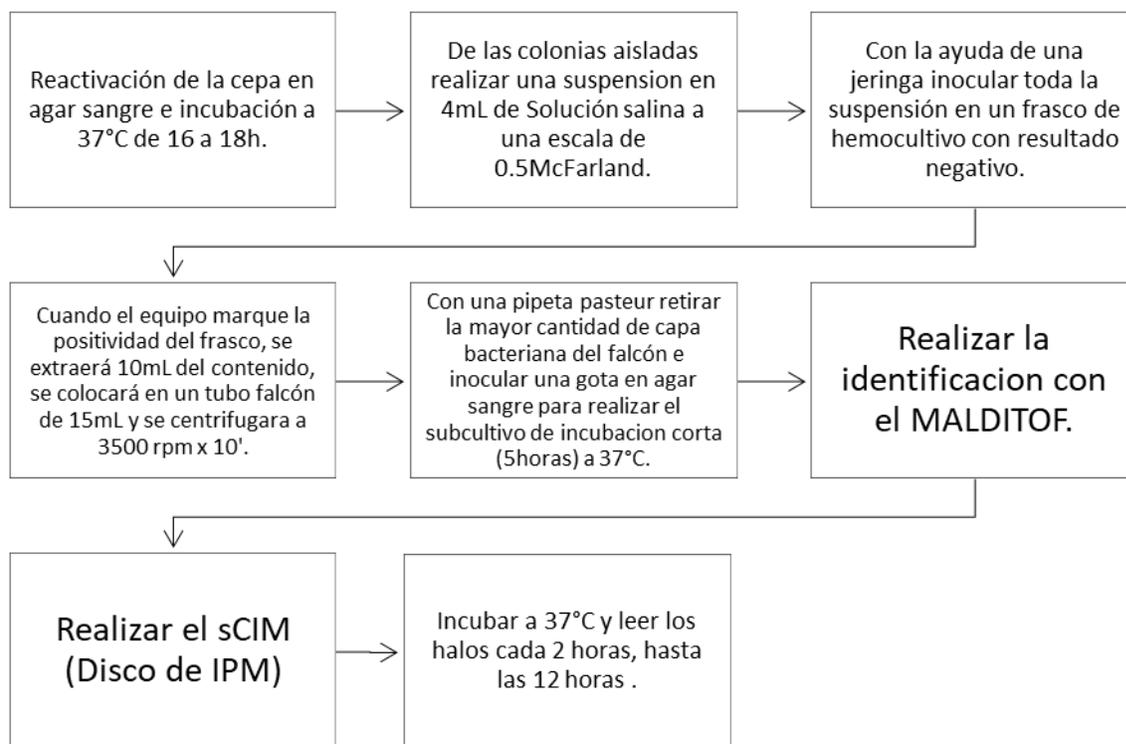
Wan, D., Jing, X., Zhou, H., Min, X., Zhang, X., Wu, T., Liu, R., & Zeng, J. (2020). Differences between meropenem and imipenem disk to detect carbapenemase in gram-negative bacilli using simplified carbapenem inactivation method. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(6), 636–639. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.02.012>

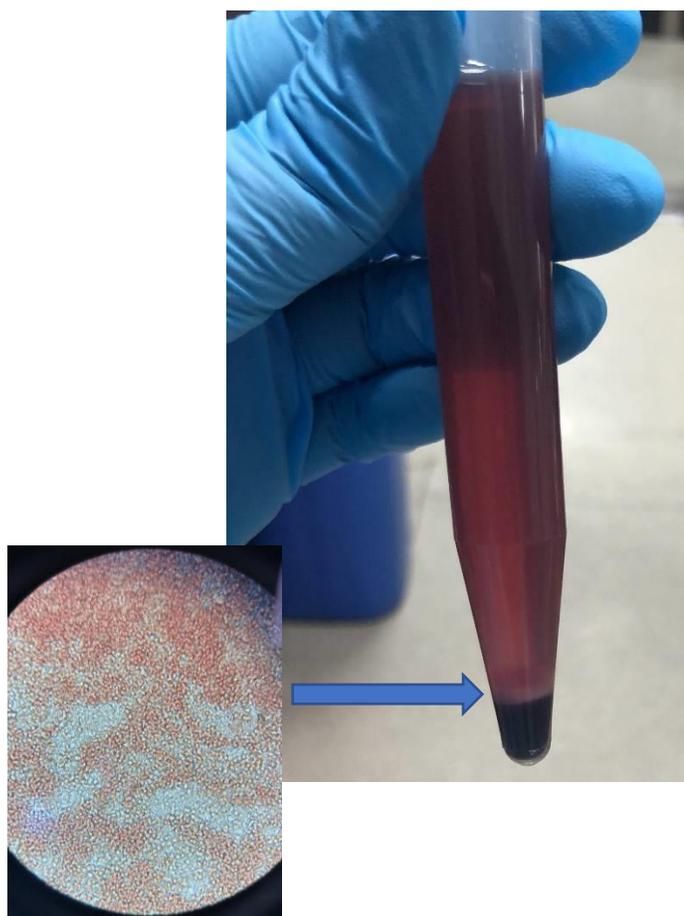
World Health Organization. (2017). *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311820>.

IX. ANEXOS

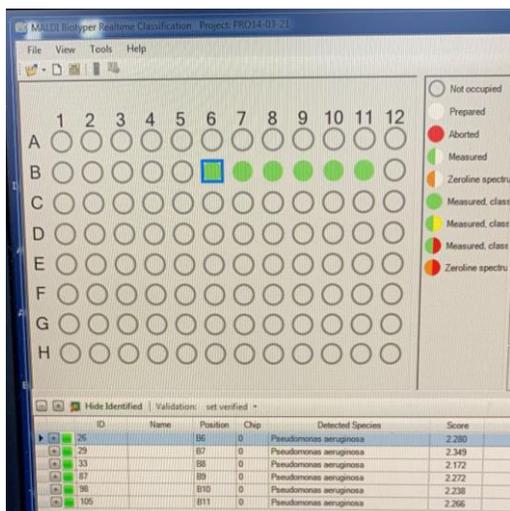
ANEXO A: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: <i>Rápida identificación y detección de hemocultivos con Pseudomonas aeruginosas productoras de carbapenemasas</i>				
Problema	Objetivo	Variables	Indicadores	Metodología
<p>Problema General ¿Se podrá lograr una rápida identificación y detección de <i>Pseudomonas aeruginosas</i> productoras de carbapenemasas en hemocultivos, a partir de subcultivos de corta incubación?</p> <p>Problemas Específicos • ¿Será útil el MALDI-TOF para la identificación de las <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de carbapenemasas? • ¿Será de utilidad el Método de Inactivación simplificado (CIMS), para la detección e identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de carbapenemasas?</p>	<p>Objetivo General:</p> <p>Detectar rápidamente <i>Pseudomonas aeruginosas</i> productoras de carbapenemasas en hemocultivos a partir de subcultivos de corta incubación.</p>	Identificación de la cepa	Perfil proteico	Se recolectará 80 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacilos gram negativos con presencia de mecanismo de resistencia carbapenemasa, estos serán reactivados en agar sangre y serán incubados a 37°C por 16h. Posterior a esto se realizará una suspensión a una escala de 0.5 Mac Farland en solución salina el cual serán medidos en el nefelómetro BD PhoenixSpec™. En frascos de hemocultivo BD Bactec Plus Aerobic de pacientes cuyos cultivos de sangre fueron estudiados por 5 días y dando como resultado negativo, se inoculará la suspensión de 0.5 Mac Farland del microorganismo a estudiar con la ayuda de una jeringa. Los frascos se incubaran en un sistema de hemocultivo automatizado; después de que los hemocultivos indiquen la positividad, se extraerán 10 ml del líquido de hemocultivo y se colocará en un tubo falcón de 15mm los cuales se centrifugaran a 3500 rpm x 10 minutos para lograr una mayor concentración de carga bacteriana. Después de la centrifugación con la ayuda de una pipeta pasteur se extraerá la mayor cantidad de capa bacteriana. Estas serán sembradas en una placa de agar sangre y serán incubadas a 37°C por 5 horas. Pasado este tiempo con la capa de crecimiento se realizará la identificación del microorganismo con la metodología BD™ Bruker MALDI Biotyper™. Una vez identificado el bacilo gram negativo se procederá a la detección del mecanismo de Resistencia enzimática mediante la técnica de Método de inactivación de Carbapenems simplificado usando el disco de Imipenem. El procedimiento de inactivación de carbapenem simplificado consiste en untar directamente sobre los discos de antibióticos la cepa a estudiar con la ayuda de una asa de siembra y posteriormente, los discos y se aplicaran a placas de agar Mueller-Hinton recién inoculadas con una suspensión 0,5 McFarland de una cepa indicadora susceptible (<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922). Las placas se incubaran a 37°C durante 6h. Posterior a eso se hará la lectura del diámetro de los halos cada 2 horas hasta cumplir las 12 horas de incubación.
	<p>Objetivos Específicos:</p> <p>Determinar la utilidad del MALDITOF para identificar <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de carbapenemasas a partir de subcultivos de corta incubación.</p> <p>Determinar la fiabilidad del método de inactivación del carbapenem simplificado (CIMS), usando cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de corta</p>			

ANEXO B: FLUJO DE TRABAJO

ANEXO D: FOTO DE CAPA BACTERIANA A SEMBRAR

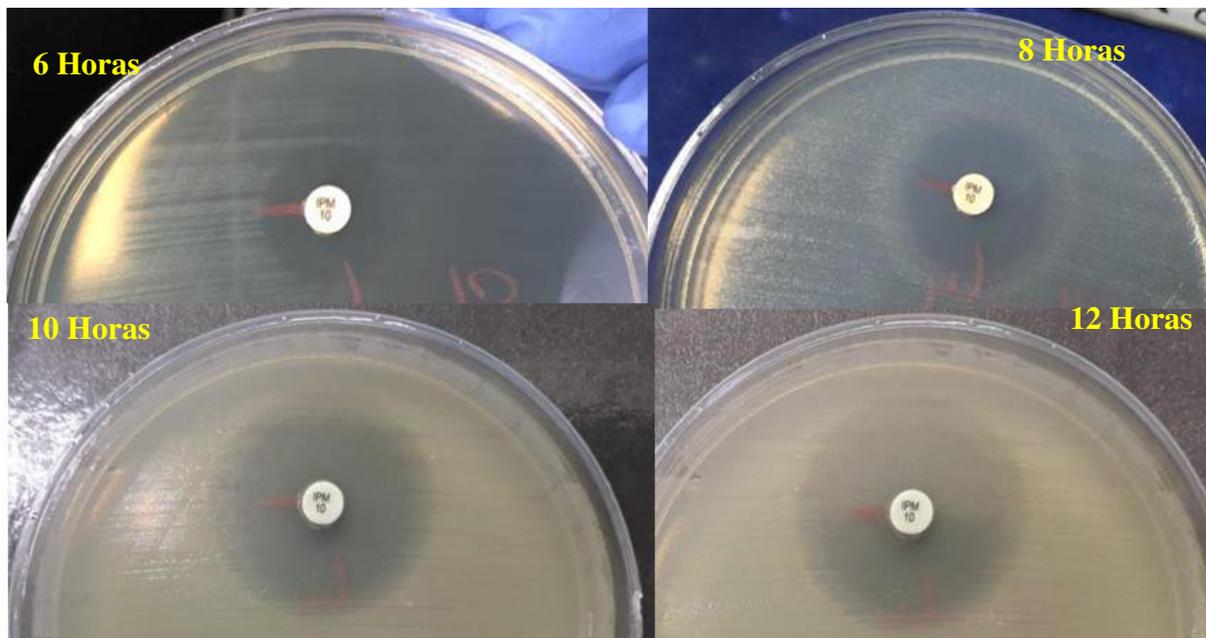
ANEXO E: FOTO DE IDENTIFICACION DE MALDI-TOF



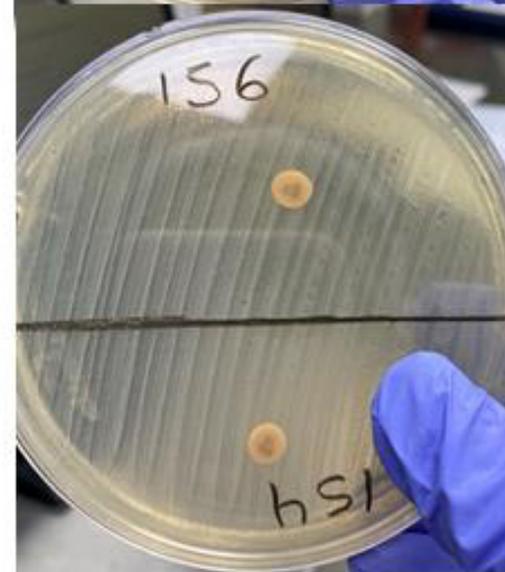
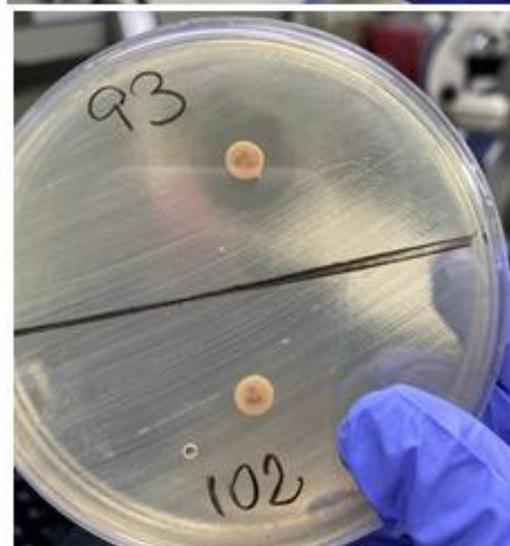
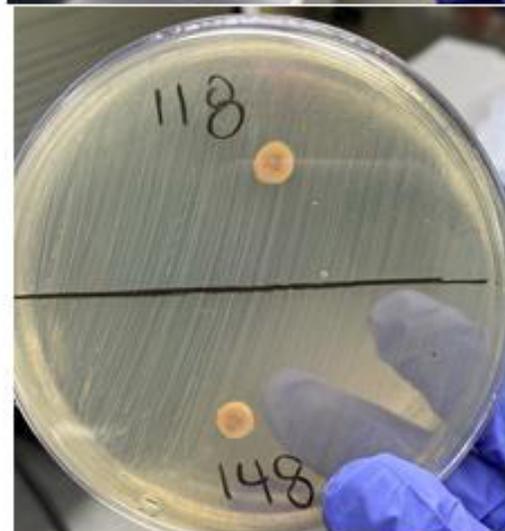
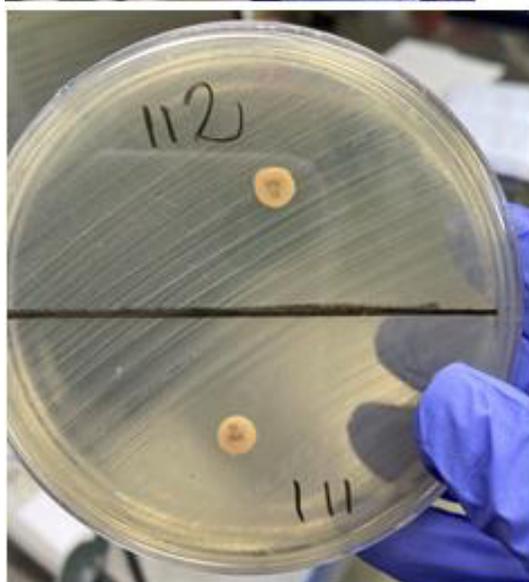
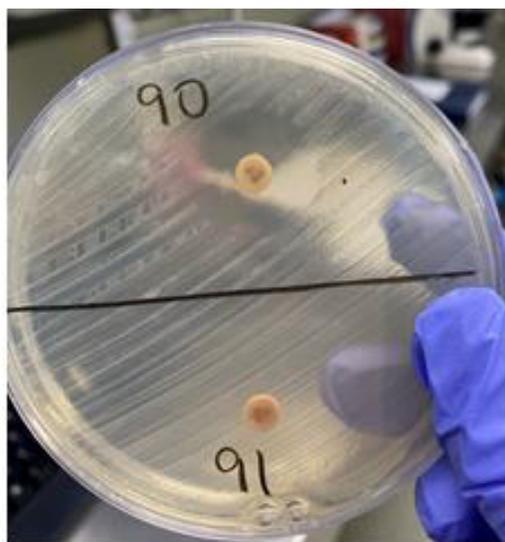
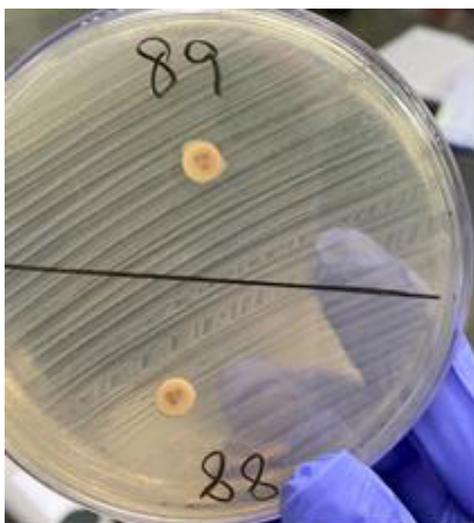
Position	Name	ID	Detected Species
E9		732	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
E10		733	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
E11		734	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
E12		731	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F1		744	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F2		750	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F3		752	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F4		756	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F5		761	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F6		765	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F7		766	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F8		769	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F9		770	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
F10		772	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

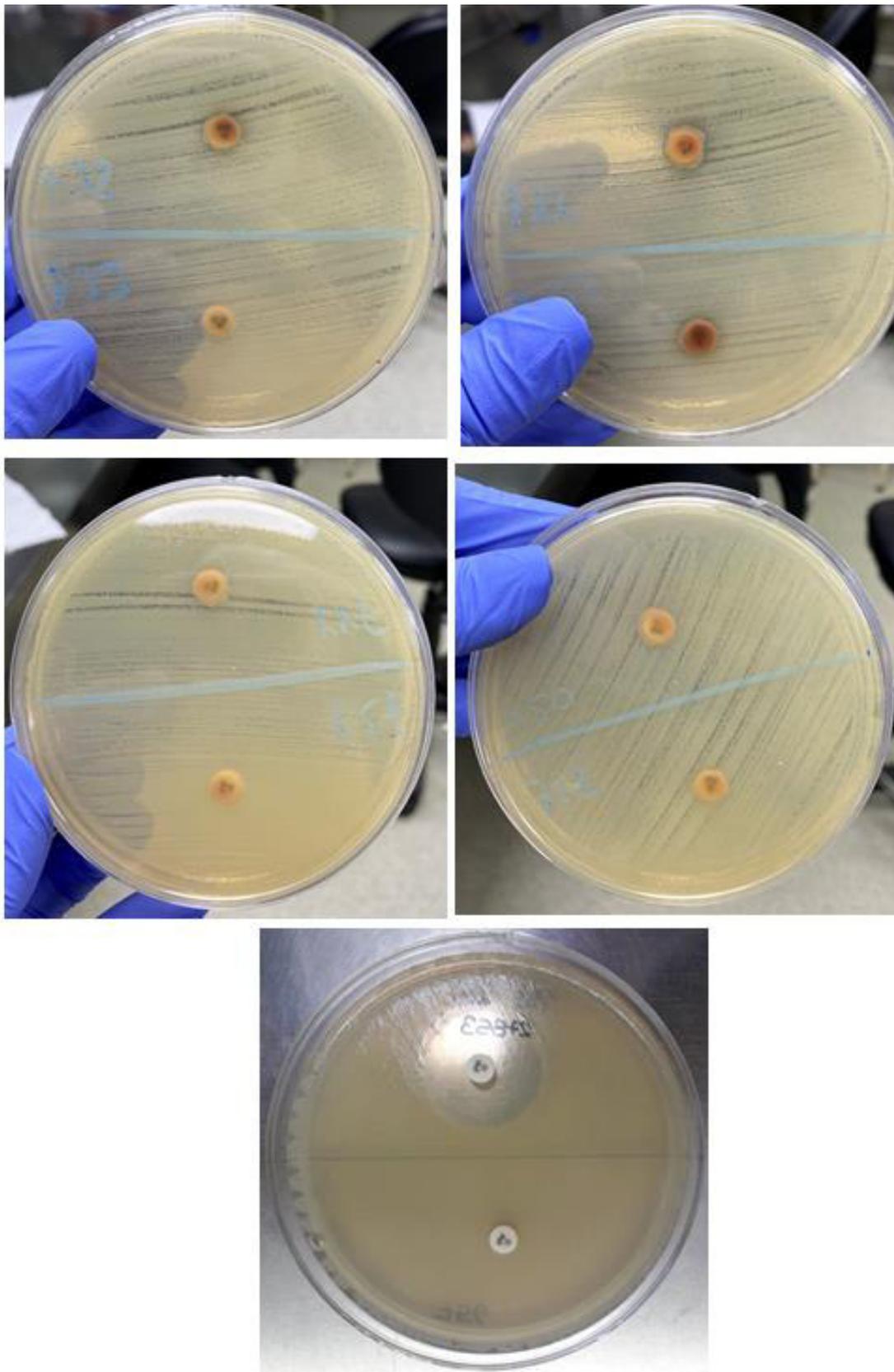
ANEXO F: FOTO DE LECTURA DE HALOS DEL CONTROL NEGATIVO

(ATCC PAE 27853) A LAS 6, 8, 10 Y 12 HORAS



ANEXO G: FOTOS DE LAS PRUEBA DEL CIM SIMPLIFICADO





ANEXO H: RESULTADOS GENERALES DEL ESTUDIO

N°	PAE-		ID MALDI- TOF	SCORE DE ID			LECTURA DE HALOS CIMs (mm)				INTERPRETACION DEL CIMs
	bla VIM	PAE-bla IMP		>2	1.9 - 1.7	<1.7	6 H	8 H	10 H	12 H	
1	(+)	(-)	PAE	2.27			6	6	6	6	POSITIVO
2	(-)	(+)	PAE	2.33			6	6	6	6	POSITIVO
3	(+)	(-)	PAE	2.24			6	6	6	6	POSITIVO
4	(-)	(+)	PAE	2.28			6	6	6	6	POSITIVO
5	(-)	(+)	PAE	2.27			6	6	6	6	POSITIVO
6	(-)	(+)	PAE	2.33			6	6	6	6	POSITIVO
7	(-)	(+)	PAE	2.27			6	6	6	6	POSITIVO
8	(-)	(+)	PAE	2.46			6	6	6	6	POSITIVO
9	(-)	(+)	PAE	2.39			6	6	6	6	POSITIVO
10	(-)	(+)	PAE	2.24			6	6	6	6	POSITIVO
11	(-)	(+)	PAE	2.43			6	6	6	6	POSITIVO
12	(-)	(+)	PAE	2.37			6	6	6	6	POSITIVO
13	(-)	(+)	PAE	2.3			6	6	6	6	POSITIVO
14	(-)	(+)	PAE	2.32			6	6	6	6	POSITIVO
15	(-)	(+)	PAE	2.14			6	6	6	6	POSITIVO
16	(-)	(+)	PAE	2.3			6	6	6	6	POSITIVO
17	(-)	(+)	PAE	2.27			17	20	20	20	POSITIVO
18	(-)	(+)	PAE	2.38			6	6	6	6	POSITIVO
19	(-)	(+)	PAE	2.41			16	20	20	20	POSITIVO
20	(-)	(+)	PAE	2.32			6	6	6	6	POSITIVO
21	(-)	(+)	PAE	2.42			6	6	6	6	POSITIVO
22	(-)	(+)	PAE	2.31			6	6	6	6	POSITIVO
23	(+)	(-)	PAE	2.28			20	20	20	20	POSITIVO
24	(-)	(+)	PAE	2.35			6	6	6	6	POSITIVO
25	(-)	(+)	PAE	2.17			6	6	6	6	POSITIVO
26	(-)	(+)	PAE	2.28			6	6	6	6	POSITIVO
27	(-)	(+)	PAE	2.24			6	6	6	6	POSITIVO
28	(+)	(-)	PAE	2.33			6	6	6	6	POSITIVO
29	(-)	(+)	PAE		1.86		6	6	6	6	POSITIVO
30	(+)	(-)	PAE	2.4			6	6	6	6	POSITIVO
31	(+)	(-)	PAE	2.27			6	6	6	6	POSITIVO
32	(+)	(-)	PAE	2.28			6	6	6	6	POSITIVO
33	(+)	(-)	PAE	2.24			6	6	6	6	POSITIVO
34	(-)	(+)	PAE	2.03			6	6	6	6	POSITIVO
35	(+)	(-)	PAE	2.35			6	6	6	6	POSITIVO
36	(+)	(-)	PAE	2.28			6	6	6	6	POSITIVO
37	(+)	(-)	PAE	2.28			6	6	6	6	POSITIVO
38	(-)	(+)	PAE	2.23			6	6	6	6	POSITIVO

N°	PAE- <i>blaVIM</i>	PAE- <i>blaIMP</i>	ID MALDI- TOF	SCORE DE ID			LECTURA DE HALOS CIMs (mm)				INTERPRETACION DEL CIMs
				>2	1.9 - 1.7	<1.7	6 H	8 H	10 H	12 H	
39	(-)	(+)	PAE	2.42			6	6	6	6	POSITIVO
40	(-)	(+)	PAE	2.29			6	6	6	6	POSITIVO
41	(+)	(-)	PAE	2.2			6	6	6	6	POSITIVO
42	(+)	(-)	PAE	2.26			6	6	6	6	POSITIVO
43	(+)	(-)	PAE	2.29			6	6	6	6	POSITIVO
44	(+)	(-)	PAE	2.05			6	6	6	6	POSITIVO
45	(+)	(-)	PAE	2.25			6	6	6	6	POSITIVO
46	(+)	(-)	PAE	2.35			6	6	6	6	POSITIVO
47	(+)	(-)	PAE	2.05			6	6	6	6	POSITIVO
48	(+)	(-)	PAE	2.09			6	6	6	6	POSITIVO
49	(+)	(-)	PAE	2.19			6	6	6	6	POSITIVO
50	(-)	(+)	PAE	2.05			6	6	6	6	POSITIVO
51	(-)	(+)	PAE		1.81		6	6	6	6	POSITIVO
52	(+)	(-)	PAE	2.05			6	6	6	6	POSITIVO
53	(+)	(-)	PAE		1.72		6	6	6	6	POSITIVO
54	(+)	(-)	PAE		1.89		6	6	6	6	POSITIVO
55	(+)	(-)	PAE	2.33			6	6	6	6	POSITIVO
56	(+)	(-)	PAE	2.15			6	6	6	6	POSITIVO
57	(+)	(-)	PAE	2.29			6	6	6	6	POSITIVO
58	(-)	(+)	PAE	2.22			6	6	6	6	POSITIVO
59	(-)	(+)	PAE	2.1			6	6	6	6	POSITIVO
60	(-)	(+)	PAE	2.3			6	6	6	6	POSITIVO
61	(-)	(+)	PAE	2.25			6	6	6	6	POSITIVO
62	(-)	(+)	PAE	2.04			6	6	6	6	POSITIVO
63	(+)	(-)	PAE	2.36			6	6	6	6	POSITIVO
64	(-)	(+)	PAE	2.19			6	6	6	6	POSITIVO
65	(+)	(-)	PAE	2.37			6	6	6	6	POSITIVO
66	(+)	(+)	PAE	2.31			6	6	6	6	POSITIVO
67	(-)	(+)	PAE	2.3			6	6	6	6	POSITIVO
68	(+)	(-)	PAE	2.29			6	6	6	6	POSITIVO
69	(+)	(-)	PAE	2.43			6	6	6	6	POSITIVO
70	(+)	(-)	PAE	2.36			6	6	6	6	POSITIVO
71	(+)	(-)	PAE	2.2			6	6	6	6	POSITIVO
72	(+)	(-)	PAE	2.32			6	6	6	6	POSITIVO
73	(+)	(-)	PAE	2.49			6	6	6	6	POSITIVO
74	(+)	(-)	PAE	2.24			6	6	6	6	POSITIVO
75	(-)	(+)	PAE	2.22			6	6	6	6	POSITIVO
76	(-)	(+)	PAE	2.38			6	6	6	6	POSITIVO
77	(-)	(+)	PAE	2.16			6	6	6	6	POSITIVO
78	(+)	(-)	PAE	2.36			10	10	10	10	POSITIVO
79	(+)	(-)	PAE	2.24			6	6	6	6	POSITIVO
80	(+)	(-)	PAE	2.36			6	6	6	6	POSITIVO
81	(-)	(+)	PAE	2.39			6	6	6	6	POSITIVO
82	(+)	(-)	PAE	2.26			6	6	6	6	POSITIVO
CONTROL NEGATIVO PAE ATCC 27853			PAE	2.35			23	25	26	26	NEGATIVO

**ANEXO I: CARTA DE APROBACION DE ESTUDIO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES NEOPLASICAS (INEN)**



PERÚ

Sector
Salud

Instituto Nacional de
Enfermedades Neoplásicas



"DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES"
"AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD"

Lima, 11 de diciembre 2020

CARTA N° 095-2020-CRPI-DI-DICON/INEN

T.M.
SHERLY ORTEGA AGUILAR
Investigadora Principal
Presente. -

De nuestra consideración:

Es grato dirigirnos a usted para saludarla cordialmente y a la vez informarle que el Comité Revisor de Protocolos de Investigación del INEN, han revisado y **APROBADO** el protocolo Titulado: **"IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN RÁPIDA DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA EN ENTEROBACTERIAS Y PSEUDOMONAS AERUGINOSA A PARTIR DE FRASCOS DE HEMOCULTIVO". INEN 20-80**

De acuerdo con las normas deberá presentar un informe por correo electrónico al término del protocolo o en su defecto el seguimiento a los 6 o 12 meses sobre los avances del mismo a esta Oficina.

Sin otro particular, quedamos de usted.

Atentamente,

M.C. Rossana Ruiz Mendoza
Presidenta del CRPI-INEN

Cc/Archivo
lc.



INEN
Av. Argemón Este 2520 -
Surquillo
Telf.: 201-6500
www.inen.gob.pe
Lima - Perú