



Universidad
Norbert Wiener

Powered by Arizona State University

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA
MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA

Tesis

Actividad in vitro de aztreonam/avibactam frente a Enterobacteriales productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022

Para optar el Título Profesional de

Licenciada en Tecnología Médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Presentado por:

Autora: Escobar Valdiviezo, Maira Alejandra

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5372-8159>

Asesor: Mg. Champi Merino, Roky Giovanni

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5275-4643>

Lima – Perú

2024

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01	FECHA: 08/11/2022

Yo, Maira Alejandra, Escobar Valdiviezo egresado de la Facultad de **Ciencias de la Salud** y Escuela Académica Profesional de **Tecnología Médica** de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo de investigación “Actividad in vitro de aztreonam/avibactam frente a Enterobacteriales productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.” Asesorado por el docente: Roky, Champi Merino DNI 09913796 ORCID 0000-0002-5275-4643 tiene un índice de similitud de (16) (dieciséis) % verificable oid:14912:385225372 en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



.....
 Firma de autor 1
 Maira Alejandra, Escobar Valdiviezo
 DNI: 77924568



 Mg. Roky Giovanni, Champi Merino
 DNI: 09913796

Lima, 07 de mayo de 2024

Dedicatoria:

Este trabajo está dedicado a Dios por bendecirme y darme las herramientas para salir adelante, a mi amada madre, y a las personas que confiaron y me apoyaron en este camino.

Agradecimiento

Agradezco infinitamente a Dios por iluminar mi camino, acompañarme y protegerme, al Mg. Roky Champi Merino, por aceptar ser mi asesor y brindarme su tiempo y apoyo el cual valoro en gran manera, al Mg. Arturo Gonzales y al Dr. Edgar Gonzales Escalante por su paciencia, apoyo incondicional en este trabajo de investigación y sobre todo por brindarme sus conocimientos, al Mg. José Matta por brindarme sus conocimientos y apoyo durante y después del internado, al Lic. Fuentes por su guía en este proceso, a mis docentes que han forjado mi carácter y han fortalecido mis conocimientos durante estos 5 años de formación y a mis amigos de toda la vida: Oscar Santisteban, Carmen Martínez, María Purihuaman, Eugenio Ugarte y Víctor Paz.

Índice

Declaración jurada de autoría y originalidad del trabajo	ii
Dedicatoria:	iii
Agradecimiento	iv
Índice.....	v
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción.....	xii
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2. Formulación del problema	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	3
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Justificación de la investigación	6
1.4.1. Teórica.....	6
1.4.2. Metodológica	7
1.4.3. Práctica	7

1.5. Limitaciones de la investigación.....	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1. Antecedentes de la investigación	8
2.2 Bases teóricas	10
2.2.1 <i>Enterobacteriales</i>	10
2.2.2 Mecanismos de resistencias de los <i>Enterobacteriales</i>	10
2.2.2.1 Inactivación enzimática	10
2.2.2.2 Modificación de la permeabilidad de la membrana.....	11
2.2.2.3 Eflujo activo de antibióticos o bombas de expulsión activa	11
2.2.2.4 Modificación del lugar de unión del antibiótico	11
2.2.3 <i>Enterobacteriales</i> Productores de Betalactamasa de espectro extendido.....	11
2.2.4 <i>Enterobacteriales</i> Productoras de carbapenemasas.....	12
2.2.5 Clasificación de las carbapenemasas.....	12
2.3 Las Metalobetalactamasas	13
2.3.1 Nueva Delhi Metalo-betalactamasa	13
2.4 Resistencia a los antimicrobianos en Perú	14
2.5 Ensayos Clínicos.....	14
2.5.1 Disco de Pre difusión rápida	14
2.5.2 Disco Combinado	14
2.5.3 Concentración mínima inhibitoria (CIM)	15

2.6 Formulación de hipótesis.....	15
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	16
3.1. Método de investigación	16
3.2. Enfoque investigativo	16
3.3. Tipo de investigación.....	16
3.4. Diseño de la investigación.....	16
3.5. Población, muestra y muestreo	16
3.6. Variables y operacionalización	166
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	18
3.7.1. Técnica	18
3.7.2. Instrumento de recolección	18
3.8. Procesamiento y análisis de datos.....	18
3.9. Aspectos éticos.....	25
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	27
4.1. Presentación y análisis de los resultados	27
4.1.1. Análisis descriptivo de resultados	32
4.1.2. Discusión de resultados	34

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1. Conclusiones	398
5.2. Recomendaciones	409
6. REFERENCIAS	40
ANEXOS	487
Anexo 1. Matriz de consistencia	487
Anexo 2. Instrumentos.....	498
Anexo 3. Aprobación del Comité de Ética Universidad privada Norbert Wiener	509
Anexo 4. Autorización de autores del estudio principal para uso de cepas y datos obtenidos..	50
Anexo 5. Aprobación del comité institucional de ética en investigación de la Universidad de Piura	521
Anexo 6: Reporte de similitud de Turnitin	532
Anexo 7. Evidencia fotográfica.....	543
Anexo 8. Distribución de Enzimas carbapenemasas y betalactamasas de espectro extendido observadas en Enterobacterales de pacientes hospitalizados. 2022.....	584

Lista de Tablas

Tabla 1. Características de *Enterobacterales* resistente a carbapenémicos según procedencia y tipo de aislamiento

Tabla 2. Frecuencia de aislamientos salvajes y no salvajes de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi Metallo-betalactamasa frente a la combinación de aztreonam/avibactam por tres metodologías.

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Frecuencia de enzimas carbapenemasas detectadas en *Enterobacterales* aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

Gráfico 2. Sensibilidad antimicrobiana de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

Gráfico 3. Frecuencia de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

Lista de Figuras

Figura 1. Protocolo de pre difusión rápida de ATM/AVI.

Figura 2. Método para disco combinado ATM/AVI.

Figura 3. Diluciones de ATM/AVI.

Figura 4. Dilución final para el método de CIM.

Figura 5. Diluciones finales para el método de CIM.

Figura 6. Inoculación de la bacteria en placas de agar Müller Hinton con ATM/AVI.

Resumen

Objetivo: El objetivo del estudio fue determinar la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa (NDM) aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

Metodología: Estudio de tipo descriptivo y de corte transversal. Se incluyeron 197 aislamientos de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPC) de tipo NDM y doble carbapenemasa que fueron obtenidas de muestras de sangre y orina de pacientes hospitalizados durante el 2022. Se determinó la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam utilizando tres métodos: pre difusión rápida, disco combinado y concentración mínima inhibitoria (CIM).

Resultados: Los aislamientos fueron resistentes en un 100% a ceftazidima/avibactam y el 74,1% se mostraron resistentes a Aztreonam (ATM). Se observó que avibactam (AVI) en combinación con ATM tuvo un buen efecto antimicrobiano en las cepas productoras de NDM y doble productoras de carbapenemasa. El método CIM evidenció gran capacidad bactericida de la combinación ATM/AVI en un 98.9 % de los aislamientos, con una $CIM \leq 4 \mu\text{g/ml}$. Los métodos en disco de pre difusión rápida (99%) y disco combinado (100%) presentaron resultados similares.

Conclusiones: Se evidenció una buena actividad antimicrobiana de la combinación de ATM/AVI frente a *Enterobacterales* productores de NDM y de portadores de doble carbapenemasa por los tres métodos empleados.

Palabras clave: NDM, carbapenemasa, *Enterobacterales*, Actividad antimicrobiana, Avibactam, Aztreonam.

Abstract

Objective: The objective of the study was to determine the *in vitro* activity of aztreonam/avibactam against *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM)-producing *Enterobacteriales* isolated from hospitalized patients, 2022.

Methodology: Descriptive and cross-sectional study. A total of 197 *NDM* and double carbapenemase-producing *Enterobacterial* (EPC) isolates were obtained from blood and urine samples from hospitalized patients during 2022. The *in vitro* activity of aztreonam/avibactam was determined using three methods: rapid prediffusion, combined disc, and minimum inhibitory concentration (MIC).

Results: The isolates were 100% resistant to ceftazidime/avibactam and 74.1% were resistant to Aztreonam (ATM). Avibactam (AVI) in combination with ATM was found to have a good antimicrobial effect on NDM-producing and dual carbapenemase-producing strains. The MIC method showed a high bactericidal capacity of the ATM/AVI combination in 98.9% of the isolates, with an MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$. The fast prediffusion (99%) and combined disc (100%) methods showed similar results.

Conclusions: A good antimicrobial activity of the ATM/AVI combination against NDM-producing *Enterobacteriales* and double carbapenemase carriers was evidenced by the three methods used.

Key words: NDM, carbapenemase, *Enterobacteriales*, Antimicrobial activity, Avibactam, Aztreonam.

Introducción

El exponencial aumento de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es uno de los principales problemas de salud pública ^{1,2}. Sobre todo si hablamos de los *Enterobacterales* productores de carbapenemasas que en los últimos años no solo fueron causa de infecciones nosocomiales sino también de infecciones esporádicas¹.

Las enterobacterias cuentan con mecanismos de resistencia las cuales les permiten evadir la acción de los antibióticos³. Hasta hace un poco más de 20 años la preocupación se centraba en *Enterococcus* resistente a vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, hoy en día numerosos estudios afirman que las enterobacterias resistentes a múltiples grupos antibióticos llamados también MDR por sus siglas en inglés (“Multi-Drug Resistant”) denominadas de esta manera únicamente cuando presenten resistencia a tres o más clases de antimicrobianos, representan el mayor problema y los programas de desarrollo de medicamentos no son suficientes para otorgar una cobertura en 10 o 20 años ⁴. Entre estos Microorganismos de mayor importancia clínica capaces de transferir genes de resistencia a través de elementos genéticos encontramos a *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.^{4,5}

Las carbapenemasas son enzimas que confieren la capacidad de resistencia a carbapenémicos; estas se encuentran en aumento, además cuentan con un alto impacto de morbimortalidad en los pacientes y, a su vez, limitan las opciones de tratamiento. Se estima que la RAM causará 10 millones de muertes en el mundo para el año 2050; de estas, gran parte serán causadas por bacilos gram negativos⁶.

Dentro de las carbapenemasas, las de clase B de tipo Metalobetalactamasas (MBL) encontramos a Nueva Delhi metalo-betalactamasa (NDM) un tipo de enzima que posee la capacidad de hidrolizar todos los betalactámicos a excepción del aztreonam (ATM)⁷.

Los carbapenémicos, son fármacos antibacterianos en donde encontramos a imipenem, doripenem, ertapenem y meropenem. Y dentro de los monobactámicos encontramos a ATM, estudios recientes afirman que la mejor terapia antibiótica para una bacteria productora de carbapenemasa es la combinación de un carbapenémico o monobactámico junto a un inhibidor de la betalactamasa⁷.

Aztreonam es un antibacteriano que se usa desde hace mucho tiempo, fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y las autoridades reguladoras europeas en el año 1986⁸. ATM ha sido empleado mayormente para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, respiratorio inferior e infecciones intraabdominales, así como septicemia, endometritis, celulitis pélvica, e infecciones de la piel y la estructura de la piel debido a organismos aerobios gramnegativos⁸. En los últimos años, el uso de este medicamento se limitó por la propagación de *Enterobacterales* productores de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y AmpC. Avibactam (AVI) es uno de los inhibidores de β -lactamasa, con una potente actividad contra las β -lactamasas de clase A y los determinantes de tipo AmpC, disponible desde 2015 en combinación con ceftazidima (CAZ)⁸. Actualmente, se están haciendo investigaciones que aprueben el uso de AVI en combinación con ATM para potencializar su efecto antibacteriano⁸.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La resistencia antimicrobiana (RAM) se ha convertido en la actualidad en un desafío para la salud pública. Una de las principales preocupaciones es la diseminación de la resistencia a los carbapenémicos por parte de enterobacterias, debido a la producción de carbapenemasas^{1,2}.

La prevalencia de EPC varía según el espacio geográfico; en Islandia, hasta el año 2019 no se notificaron reportes a pesar de la vigilancia activa, sin embargo, en otros países, como Italia y Grecia, la situación es endémica⁹.

Las carbapenemasas son enzimas que pertenecen al grupo de las betalactamasas y son capaces de degradar a los carbapenémicos, hidrolizando prácticamente a todos los antibióticos betalactámicos. Las betalactamasas, según su naturaleza, se clasifican en: A, B, C y D; las que pertenecen a las clases A, C y D poseen un residuo de serina en su sitio activo, llamadas también serin-betalactamasas (SBLs). Las betalactamasas de clase B, son metaloenzimas dependientes de zinc, por lo que también se denominan MBL, las cuales presentan actividad hidrolítica en los antibióticos betalactámicos a excepción de los monobactámicos¹⁰.

Dentro de las MBL, uno de los tipos que presenta mayor diseminación es la NDM, descrita por primera vez en el 2008, en un paciente sueco proveniente de la India. Reportado en Latinoamérica en el año 2011, en pacientes pediátricos en Guatemala demostrando múltiple resistencia a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas y sus derivados¹⁰.

Las infecciones bacterianas invasivas producidas por MBL se asocian a tasas de mortalidad mayores al 30%, sobre todo en los ambientes hospitalarios donde están involucrados pacientes gravemente enfermos^{11, 12}. A pesar que ATM es un antibiótico activo frente a las MBL, la prevalencia de β -lactamasas de clase A o determinantes de tipo AmpC

dentro de MBL, hacen posible que ATM solo sea una terapia oportuna para un tercio de los casos⁸.

Entre el periodo de 2020 a 2022, en América Latina diversos países emitieron alertas epidemiológicas sobre el incremento de aislamientos de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, entre ellas destacan aislamientos productores de doble carbapenemasas de tipo KPC y NDM (*K. pneumoniae*), y de KPC y OXA-48 (*Escherichia coli*)⁶.

Son escasas las publicaciones sobre aislamientos productores de carbapenemasas en Perú; los reportes de genotipo son principalmente de hospitales de la capital del país⁶. En 2019, el Instituto Nacional de Salud reportó 80 aislamientos de aislamientos productores de carbapenemasas del cual el 17.6% correspondió a *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (KPC) (1=0.8%), NDM (*K. pneumoniae*) (44=35.2%), NDM (*Escherichia coli*) (9=7.2%), NDM (*Providencia rettgeri*) (2=1.6%), NDM (*Pseudomonas aeruginosa*) (2=1.6%)⁶.

No cabe duda que los antibióticos durante décadas han sido aliados en la terapia contra los microorganismos, el uso indiscriminado, la administración de dosis subóptimas y la automedicación han promovido la aparición de microorganismos MDR, algunos autores llaman a este período como “la era post-antibiótica”.

Actualmente, diversos inhibidores de β -lactamasas se han sintetizado (relebactam, vaborbactam, avibactam), sin embargo, su actividad frente a bacterias productoras de MBL es limitada¹³. En este punto, diversos autores han sugerido la terapia combinada de aztreonam y ceftazidima/avibactam¹². Ya que estudios *in vitro* afirman la eficacia *in vivo* de ATM contra estos gérmenes gracias a la inhibición realizada por el avibactam ante las β -lactamasas no MBL (BLEE, AmpC, entre otros)⁸. Es por ello que es importante introducir ensayos microbiológicos que evalúan la acción combinada del aztreonam y avibactam frente a este grupo de CPE⁸.

Como consecuencia a tal problemática en los últimos años se han realizado diversos estudios que evalúan la combinación de antibióticos de amplio espectro e inhibidores de betalactamasas buscando opciones terapéuticas óptimas; sin embargo, todavía se necesitan más estudios que confieran una mayor seguridad al momento de administrar estos fármacos^{8, 14, 15}.

Este proyecto de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana de aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa (NDM) aislados de pacientes hospitalizados durante el 2022, mediante 3 metodologías *in vitro*.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

- ¿Cuál es la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados durante el 2022?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál es la frecuencia de los aislamientos salvajes y no salvajes de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa frente a la combinación de aztreonam/avibactam aislados de pacientes hospitalizados durante el 2022?
- ¿Cuál será la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam con el método de la concentración mínima inhibitoria, frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi Metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022?

- ¿Cuál será la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam con el método disco de Predifusión, frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022?
- ¿Cuál será la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam con el método de disco preparado aztreonam/avibactam, frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

- Determinar la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de aislamientos salvajes y no salvajes de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi Metalo-betalactamasa frente a la combinación de aztreonam/avibactam aislados de pacientes hospitalizados durante el 2022.
- Determinar la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam con el método de la concentración mínima inhibitoria, frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi Metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.
- Determinar la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam con el método disco de Predifusión, frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

- Determinar la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam con el método de disco preparado aztreonam/avibactam, frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1. Teórica

La diseminación global de los gram negativos productores de metalobetalactamasa es un grave problema de salud pública^{1,2}. Se han descrito diversos grupos de MBL, siendo las: imipenemasas (IMP), *Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase* (VIM) y NDM las de mayor frecuencia e importancia clínica⁷. Las MBL son transferibles en elementos genéticos móviles, lo cual confiere a las bacterias portadoras, resistencia a múltiples antibióticos⁷.

Entre los EPC, la mayor prevalencia encontramos en *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *Escherichia coli*¹⁶. Las enzimas carbapenemasas tienen la capacidad de degradar a los antibióticos carbapenémicos, hidrolizando prácticamente a todos los betalactámicos^{8, 17}.

Las NDM, han demostrado múltiple resistencia a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas y derivados¹⁷. Entre el periodo de 2020 a 2022, en América Latina diversos países emitieron alertas epidemiológicas sobre el incremento de aislamientos de enterobacterias MDR, destacando aislamientos productores de doble carbapenemasas de tipo KPC y NDM (*K. pneumoniae*), y KPC y OXA-48 (*Escherichia coli*)⁶.

La RAM es un problema creciente en el ámbito de la salud, y los *Enterobacterales* productores de NDM representan una amenaza significativa¹⁰. La evaluación de la actividad in vitro de ATM/AVI contra estos patógenos es crucial, sobre todo en nuestro país donde las investigaciones sobre este tema son casi nulas⁶. Esta investigación proporcionará datos objetivos sobre la efectividad de esta combinación de antibióticos. Los resultados obtenidos serán fundamentales y contribuirán a la generación de evidencia sólida en el campo de la microbiología clínica.

1.4.2. Metodológica

El resultado de esta investigación permite describir el comportamiento *in vitro* de aztreonam (monobactámico) y avibactam (inhibidor de betalactamasas) lo cual contribuye a los datos obtenidos bibliográficamente en donde se ha observado en la mayoría de ellos la eficacia de esta combinación antibiótica.

1.4.3. Práctica

La proliferación de los *Enterobacterales* resistentes como consecuencia del uso de antibióticos es un proceso natural que gracias a la aplicación no óptima de ciertos antibacterianos se ha acelerado. Sin embargo, aun siendo un problema inevitable la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) han propuesto implementar estrategias que ayudaran en la prevención y solución o que mínimo puedan retrasar los procesos de multirresistencia¹⁰. En respuesta se ha impulsado una ardua labor de investigación para la búsqueda, identificación y desarrollo de nuevos agentes bactericidas y la modificación o implementación de nuevas técnicas y métodos para evaluar adecuadamente su efectividad¹⁷.

1.5. Limitaciones de la investigación

La mayor limitación en este proyecto ha sido los puntos de corte para estas técnicas utilizadas ya que no están estandarizados por instituciones como el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y por la *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) con respecto a los resultados en conjunto de aztreonam/avibactam por lo que se usó puntos de corte que se publicaron en el centro de referencia regional el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr Carlos G. Malbrán”¹⁸.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Guoping et al (2022) Determinaron la actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de ceftazidime /avibactam (CZA) solo y en conjunto con ATM contra KPC, NDM, IMP, KPC/IMP, KPC/NDM. Los resultados *in vitro* mostraron que CZA tuvo un buen efecto antimicrobiano en las cepas productoras de KPC y productoras de OXA. CZA combinado con ATM mostró actividad bacteriostática o bactericida sinérgica contra productoras de NDM, IMP, KPC + IMP-, KPC + NDM. La combinación de CZA y ATM redujo la mortalidad y la vida útil prolongada de ratones infectados con las productoras de NDM, IMP, KPC/IMP y KPC/NDM, esto proporciona un conocimiento fundamental para mejorar las estrategias de tratamiento e inicializar ensayos clínicos ¹⁹.

Miles et al. (2022) Desarrollaron un estudio donde determinaron la CIM de los aislados productores de NDM clínicos para ATM solo y CAZ/AVI+ATM usando dilución en caldo donde de 43 aislamientos, 33 (77%) fueron resistentes a ATM. La adición de CAZ/AVI restauró el punto de corte ATM (MIC <4 mg/L) en 9 de 33 aislamientos resistentes (89 %). En general, el método E-test/disco se correlacionó con los resultados de la dilución en caldo en 35 de 43 casos (81 %). La sensibilidad de E-test/disco fue del 77% y la especificidad del 85%. El valor predictivo positivo fue del 92% y el valor predictivo negativo fue del 61%. Demostrando CAZ/AVI+ATM una sinergia significativa en la mayoría de las *Enterobacterales* productoras de NDM resistentes a ATM²⁰.

Sader et al. (2021) Evaluaron la actividad *in vitro* de ATM/AVI frente a aislados clínicos de 8787 *Enterobacterales* consecutivamente de 64 centros médicos ubicados en Europa Occidental como resultado obtuvieron que el 99,9% de los aislamientos fueron inhibidos a una CIM de ATM/AVI de ≤ 8 mg/l, incluido el 99,7% de los resistentes a carbapenémicos y 99,7% de aislados MDR (n = 1706). Las tasas de enterobacterias resistentes

a carbapenémicos (CRE) fueron 1,2%, 12,9%, 5,2% y 5,8%, respectivamente (4,5 %). Se identificó un CP en el 90,2% de los aislamientos de (CRE). Los CP más comunes fueron variantes de KPC (35,9% de CRE), NDM (29%) y OXA-48 (26,8%). El valor más alto de CIM de ATM/AVI entre los productores de MBL fue de 2mg/l los hallazgos adquiridos en esta investigación respaldaron el uso clínico de ATM/AVI para abordar infecciones originadas por *Enterobacterales*, incluidos los productores de MBL²¹.

Terrier et al. (2022) Evaluaron *in vitro* la respuesta de aztreonam diferentes inhibidores de la β talactamasa. La tasa de susceptibilidad para ATM fue del 17,1% entre *Enterobacterales* productores de MBL, mientras que fue muy alta con ATM/zidebactam (98,4%), y en menor medida con aztreonam/nacubactam (84,4%) y ATM/taniborbactam (75%), en comparación con ATM/AVI (70,3%) y cefiderocol (39,1%). Entre los aislados de *P. aeruginosa* productores de MBL, las tasas de susceptibilidad fueron del 53,8% con ATM, del 66,7% con combinaciones de ATM/nacubactam y ATM/taniborbactam, y del 69,2% con aztreonam/avibactam, ATM/zidebactam y cefiderocol resultados mostraron que las combinaciones que incluyen aztreonam y nuevos inhibidores de la betalactamasa, como zidebactam, nacubactam o taniborbactam, tienen una actividad *in vitro* muy significativa contra aislados clínicos de *Enterobacterales* productores de MDR MBL, siendo la combinación aztreonam/zidebactam la mejor opción²².

Falcone et al. (2021) Realizaron un estudio científico cuyo propósito consistió en contrastar los hallazgos de individuos afectados por infecciones en el flujo sanguíneo. (BSI) causadas por *Enterobacterales* productores de MBL tratados con CAZ-AVI más ATM u otros antibióticos activos (OAA) se incluyó a pacientes ingresados de 3 hospitales en Italia y Grecia en total 102 pacientes con BSI; 82 tenían infecciones causadas por cepas productoras de NDM (79 *Klebsiella pneumoniae* y 3 *Escherichia coli*) y 20 por cepas productoras de VIM (14 *K. pneumoniae*, 5 especies de *Enterobacter*, 1 *Morganella morganii*). La tasa de

mortalidad a los 30 días fue del 19,2% en el grupo CAZ-AVI + ATM frente al 44% El análisis ajustado por propensión score mostró que el uso de CAZ-AVI + ATM se asoció con una menor mortalidad a los 30 días del tratamiento ²³.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Enterobacterales*

Las enterobacterias (del orden *Enterobacterales*) son bacterias Gram negativas que pertenecen a la clase Gammaproteobacteria (especies clínicamente importantes), su principal característica es que no forman esporas tienen forma de bacilo o cocobacilo, fermentan la glucosa y pueden ser móviles o no móviles. Algunas especies son catalasa-positivas oxidasa negativas y reducen nitratos a nitritos ²⁴.

Los microorganismos que están implicados con mayor frecuencia en las infecciones en el hombre son *Escherichia coli* y varias especies incluidas en los géneros *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Providencia*²⁵. Los *Enterobacterales* a menudo se relacionan con una amplia gama de patologías como abscesos, neumonía, meningitis, infecciones del tracto urinario y bacteriemia ²⁵.

2.2.2 Mecanismos de resistencias de los *Enterobacterales*

Entre los mecanismos más estudiados tenemos:

2.2.2.1 Inactivación enzimática

La inactivación enzimática es un mecanismo muy común a través de la producción de enzimas que tienen la propiedad de neutralizar ciertos antibióticos, así como su acción antibacteriana un ejemplo son las enzimas betalactamasa producidas por algunas bacterias que está mediada por plásmidos este es el principal mecanismo en las enterobacterias²⁶.

2.2.2.2 Modificación de la permeabilidad de la membrana

La alteración en la permeabilidad de la membrana está ligada a las bacterias gram negativas en donde la membrana pierde o disminuye las porinas por ende la permeabilidad con el antimicrobiano se ve ralentizada. Aunque esta también puede verse afectada por una mutación que afecta a los lipo polisacáridos en las bacterias²⁶.

2.2.2.3 Eflujo activo de antibióticos o bombas de expulsión activa

Es una propiedad que adquieren las bacterias para expulsar hacia el exterior a los antibióticos de una manera activa a través de bombas de expulsión activas, contribuyendo así a que la dosis de antibiótico ingresado no sea efectiva²⁶.

2.2.2.4 Modificación del lugar de unión del antibiótico

Los antibacterianos se unen a las bacterias en sitios específicos. En este mecanismo la bacteria tiene la capacidad de alterar o modificar este sitio dejando al antibiótico sin efecto. Esta alteración es físico-química, disminuye la afinidad del fármaco por el lugar y por lo tanto pérdida de la actividad antimicrobiana. Esta modificación puede ser parcial o total dependiendo del tipo de resistencia que haya adquirido el microorganismo²⁶.

2.2.3 *Enterobacterales* Productores de Betalactamasa de espectro extendido

Los *Enterobacterales* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) contienen enzimas capaces de hidrolizar los fármacos betalactámicos inactivando su función²⁷.

El mecanismo de resistencia a los betalactámicos en las enterobacterias es la producción de betalactamasas es el más importante. Muchas enterobacterias poseen betalactamasas cromosómicas naturales, que derivan de sus propias proteínas fijadoras de penicilina (PBP, del inglés *penicillin binding protein*), con las que tienen analogía secuencial y estructural. Los genes que codifican estas enzimas se pueden hallar en el cromosoma o en elementos genéticos móviles, y su producción puede ser constitutiva o inducible. Las BLEE se

conceptúan como enzimas con la habilidad de hidrolizar las penicilinas, a la familia de las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y los monobactámicos, pero no los carbapenémicos²⁸.

2.2.4 *Enterobacteriales* Productoras de carbapenemasas

Los EPC se caracterizan por ser responsables de infecciones asociadas a la atención de salud o infecciones intrahospitalarias; sin embargo, en los últimos años su propagación comunitaria es más común. La resistencia a los carbapenémicos se presenta mediante alteraciones a la PBP de la pared celular bacteriana, un aumento en las bombas de eflujo o una disminución en la permeabilidad de la membrana y también por la producción de enzimas carbapenemasas²⁹.

Las carbapenemasas son una amplia y diversa familia de β -lactamasas que poseen la capacidad de hidrolizar e inactivar una gran variedad de antibióticos dentro de estos encontramos a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos²⁹. Estas enzimas funcionan uniéndose al antibacteriano rompiendo el enlace amida de un anillo de azetidiona de cuatro miembros y evitando que se una a la PBP de la pared celular bacteriana. Según el sistema de clasificación Ambler, las carbapenemasas se encuentran dentro de las betalactamasas de clase A, B y D, con una heterogeneidad geográfica sustancial en las clases entre regiones globales y con varios modos de transmisión³⁰.

2.2.5 Clasificación de las carbapenemasas

Las carbapenemasas se clasifican en dos grandes grupos; serino betalactamasa y metalobetalactamasas:

Serino betalactamasas: KPC, OXA, NMC, IMI, GES, SME

Metalobetalactamasas: IMP, VIM, SPM, SPM, GIM, AIM, DIM, NDM.

Tanto las metaloenzimas como las serinoenzimas son detectadas fundamentalmente en *Enterobacterales* y bacilos no fermentadores, en la actualidad aún no se ha determinado una antibioterapia de elección creando así una complejidad terapéutica frente a dichos microorganismos, los cuales tienen la capacidad de generar multirresistencia contra; piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. La fosfomicina disódica endovenosa ha mostrado ser efectiva frente a productores de KPC, otras posibles opciones terapéuticas son tigeciclina, colistina y aztreonam, en monoterapia o con más efectividad combinados³¹.

Las Serino betalactamasas son enzimas de la clase A o D de Ambler y tienen menor actividad hidrolítica que las metalobetalactamasas, no hidrolizan aztreonam, pueden ser inhibidas por inhibidores de betalactamasas³¹.

2.3 Las Metalobetalactamasas

Pertenecen a la clase B de Ambler, y al grupo 3 de la clasificación de Bush, constituyen las carbapenemasas adquiridas de mayor importancia clínica cuentan con la capacidad de hidrolizar casi todos los antibióticos β -lactámicos, con excepción de aztreonam y no ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas³¹.

2.3.1 Nueva Delhi Metallo-betalactamasa

La Nueva Delhi Metallo-betalactamasa (NDM) es una de las últimas betalactamasas en ser descubierta, pertenece a la clase B molecularmente transferible. A diferencia de las betalactamasas de clase A, C y D, NDM-1 tiene iones de zinc en su sitio activo³².

Las bacterias que poseen el mecanismo de resistencia NDM no responden a una amplia variedad de antimicrobianos y llevando varios mecanismos resistencia adicionales, por ejemplo, a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos y sulfonamidas, haciendo muy difícil encontrar varias opciones terapéuticas³³. Se sospecha que la fuente original del gen

*bla*_{NDM-1} podría provenir de un cromosoma de patógenos vegetales, como *Pseudoxanthomonas* y bacterias relacionadas que están muy extendidas en el medio ambiente³³.

2.4 Resistencia a los antimicrobianos en Perú

La primera EPC reportada en Perú fue una KPC en el año 2013 en el Hospital Arzobispo Loayza³⁴, mientras que en el Hospital Nacional Dos de Mayo se reportaría en el año 2017 el primer caso de NDM³⁵ a partir de aquí su diseminación ha ido en aumento siendo según estudios las productoras de NDM las enterobacterias más predominantes en nuestro país, a diferencia de otros países de América latina en donde predominan las KPC³⁵.

2.5 Ensayos Clínicos

En la actualidad se han reportado muchos ensayos clínicos *in vitro* y también estudios *in vivo* que demuestran la efectividad de ATM y AVI como terapia combinada contra las enzimas NDM^{20, 21, 22, 23, 24}.

2.5.1 Disco de Pre difusión rápida

Es un método, el cual consiste en depositar sobre la superficie de agar en una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, un disco de papel secante impregnado con un antibiótico que posteriormente se retira para poner en su lugar un antibiótico diferente¹⁸.

2.5.2 Disco Combinado

El método del disco combinado es una técnica, la cual consiste en utilizar discos de papel filtro impregnados con las diferentes cefalosporinas y un inhibidor de β -lactamasas, como el ácido clavulánico o avibactam³³. La principal dificultad de los discos combinados es

su adquisición, ya que pocas casas comerciales distribuyen estos discos a nivel local³³. Sin embargo, se pueden preparar en el laboratorio teniendo en cuenta la concentración comercial.

2.5.3 Concentración mínima inhibitoria (CIM)

La CIM es la concentración más baja (en 2µg/ml) de uno o más antibióticos capaz de inhibir el crecimiento de una bacteria. Cada antibiótico tiene una CIM distinta. La elección de un antibiótico se basa en el CIM, el lugar de la infección y el valor crítico de un antibiótico o punto de corte. A la hora de decidir cuál es el antibiótico óptimo se deben proporcionar los valores de la CIM³⁶.

2.6 Formulación de hipótesis

No aplica hipótesis por el tipo de investigación.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Método de investigación

El método de investigación es deductivo, observacional, descriptivo, de corte transversal³⁸.

3.2. Enfoque investigativo

El enfoque de la investigación es cuantitativa³⁸.

3.3. Tipo de investigación

Por la naturaleza del estudio se define la investigación como básica³⁸.

3.4. Diseño de la investigación

Por su diseño, el estudio es de un diseño no experimental³⁸.

3.5. Población, muestra y muestreo

La población de interés en esta investigación fue compuesta por el total de aislamientos de *Enterobacteriales* obtenidos del proyecto de investigación 2307: “Epidemiología y actividad *in vitro* de cefiderocol, ceftazidima/avibactam, aztreonam/avibactam e imipenem/relebactam frente a *Enterobacteriales* productores de carbapenemasas recuperados de muestras de sangre y orina de pacientes hospitalizados durante el 2022”, aprobado por el comité institucional de ética en investigación de la Universidad de Piura, el cual incluyó cepas obtenidas de tres hospitales (Hospital Nacional Hipólito Unanue, Hospital de Emergencias Ate Vitarte, Hospital Nacional Guillermo Almendra) y un laboratorio privado (Laboratorio ROE) de la ciudad de Lima.

Muestra: La muestra estuvo compuesta por 197 cepas, 187 fueron aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo NDM y 10 de tipo KPC/NDM.

Muestreo: La selección de las muestras se llevó a cabo mediante un método de conveniencia, incluyendo las cepas de enterobacterias de tipo NDM provenientes de muestras clínicas de orina y sangre.

3.6. Variables y operacionalización

Variables	Definición	Dimensión	Indicador	Naturaleza y escala	Escala de Valoración
<i>Enterobacteriales</i> productores de Nueva Delhi metalo-beta lactamasa	Son <i>Enterobacteriales</i> aislados de sangre y orina productores de NDM, confirmadas fenotípica y molecularmente.	Género bacteriano	Viraje de color	Cualitativa/nominal	Crecimiento
					Sin crecimiento
Actividad <i>in vitro</i> de la Combinación aztreonam/avibactam mediante método de predifusión	Respuesta de las enterobacterias frente a dos antibióticos utilizando el método de predifusión rápida	Salvaje	Diámetro de halo de	Cuantitativo/nominal	mayor a 17 mm
		No salvaje	Inhibición (medido en mm.)		menor a 15 mm
Actividad <i>in vitro</i> de la Combinación aztreonam/avibactam con el método de MIC	concentración más baja de aztreonam y avibactam que inhibe a los <i>Enterobacteriales</i> productores de NDM	crecimiento en diluciones seriadas	Dilución seriada con la concentración mínima del antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano	Cuantitativa/nominal	menor o igual a 4 ug/ml
					mayor que 4ug/ml
Actividad <i>in vitro</i> de la Combinación aztreonam/avibactam con disco preparado en el laboratorio.	respuesta de los <i>Enterobacteriales</i> a la combinación de aztreonam y avibactam en un solo disco	Cuantitativa	Diámetro de halo de Inhibición (medido en mm. Y según las pautas de Duraffourd)	Cuantitativa/nominal	mayor o igual a 17 mm

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

La técnica utilizada para el desarrollo de la investigación fue la observación, dado que a partir de los procedimientos realizados se identificaron los resultados sobre las variables de estudio.

3.7.2. Instrumento de recolección

Se elaboró como instrumento para la investigación, una ficha de recolección de datos, donde se indican las variables de nuestro estudio (Anexo 2).

3.8. Procesamiento y análisis de datos

3.8.1 Procedimientos

- **Preparación de los medios de cultivo**

Se preparó los medios de cultivo agar Mueller Hinton y CHROMagar siguiendo las indicaciones por el fabricante. En frascos de 500 ml se prepararon 350 ml de agar realizando los cálculos necesarios dependiendo del agar, se mezcló y luego se calentó el tiempo necesario hasta disolver por completo, luego se llevó a la autoclave a 121°C de temperatura y presión de 15 libras durante 15 minutos, dejando enfriar aproximadamente entre 40-50 °C para seguidamente plaquear. Para preparar el Agar Mueller Hinton se tuvo en cuenta el volumen para determinar el espesor de entre 3.5 a 4.5 mm por placa. Teniendo en consideración las recomendaciones del CLSI para el control de calidad de las placas, se colocó el 5% de cada lote a 35-37°C durante 24 horas para descartar contaminación, y el resto se guardó a 4°C para su posterior uso³⁹.

- **Reactivación de las cepas**

Los aislamientos conservados en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el cepario de la Universidad de Piura, fueron reactivados en medio de cultivo CHROMagar™ Orientación. Para evaluar la pureza de la cepa a partir de estas colonias se hicieron diluciones en solución salina estéril al 0.9% en tubos de vidrio estériles de medidas 13x100, se hizo dilución de 0.5 Mc Farland con la ayuda de asas estériles, a partir de estas diluciones se procedió a realizar las tres técnicas.

- **Disco de pre difusión rápida**

Se usó como referencia los puntos de corte publicados en la investigación de Pasteran y col¹⁸ para el método de disco de pre difusión rápida. A partir de una suspensión al 0.5 Mc Farland, se realizó la técnica de Kirby Bauer hisopando sobre la superficie de agar Müeller Hinton en tres direcciones distintas; posteriormente se colocó el disco combinado de ceftazidima/avibactam (CAZ-AVI, 14 μg) dejándolo difundir en el medio a temperatura ambiente durante 15 minutos, culminado el tiempo se retiró el disco de manera aséptica colocando en el mismo lugar un disco de aztreonam de 30 μg , para luego ser incubado durante 16-18 horas a 35°C a partir de este tiempo medimos los halos en milímetros y realizamos el reporte de los resultados. Como control de calidad interno, se usó la cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 cuyo rango de referencia es de 18-24 milímetros para aztreonam/avibactam. (Figura 1)

Figura 1. Protocolo de predifusión rápida de ATM/AVI ¹⁸.

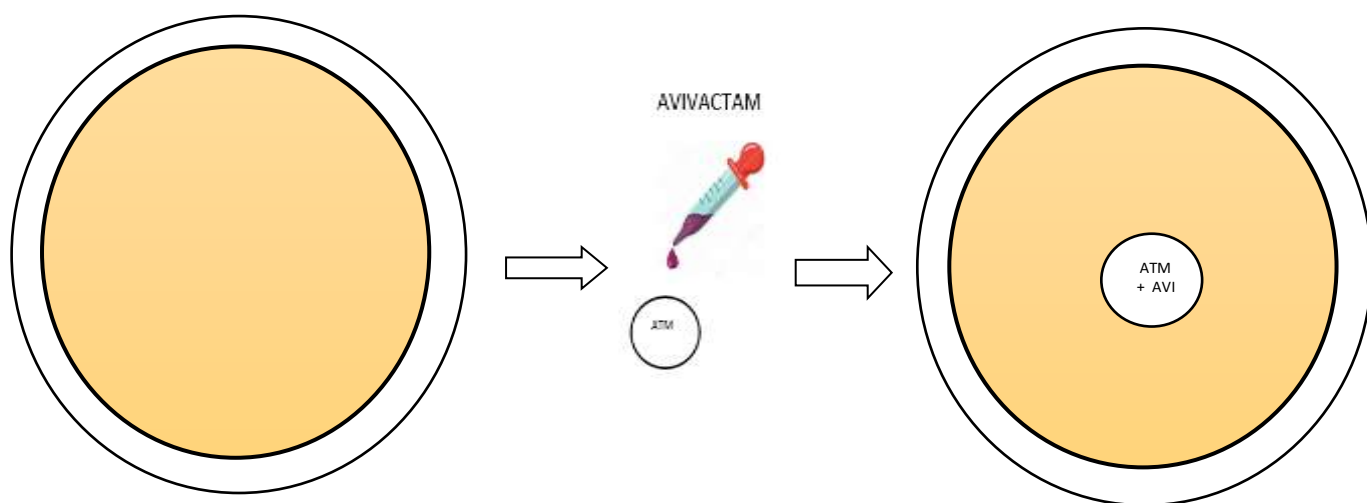


- **Metodología para Disco combinado**

Para la metodología del disco combinado se tomó como referencia resultados de las investigaciones detalladas en los antecedentes^{19, 20, 21, 22, 23}.

A partir de un crecimiento no mayor a 4 horas en CHROMagar se realizó una dilución al 0,5 de la escala de McFarland colocando con un hisopo sobre la superficie de agar Müeller Hinton en tres direcciones distintas, posteriormente se colocó el disco de aztreonam suplementado con 4 µl de avibactam; para luego ser incubado durante 16-18 horas a 35°C en donde posteriormente se midieron los halos y se realizó el reporte de los resultados. (Figura 2)

Figura 2. Método para disco combinado aztreonam/avibactam (ATM/AVI)



Paso 1: En una placa con agar Müller Hinton se inoculó la enterobacteria a estudiar

Paso 2: En un disco de aztreonam de 30µg se añadió 4µl de avibactam, en cual luego se colocó en la placa de Müller Hinton que previamente fue inoculada, incubándose a 35-37°C durante 18-24 horas.

- **Metodología CIM**

Para realizar la CIM se prepararon placas de Müller Hinton con concentraciones seriadas de antibiótico ATM/AVI, las diluciones iniciaron desde 64/4 hasta 0.03/4 con una placa sin antibiótico que se utilizó como control de calidad. Se realizaron separaciones de 25 cuadrantes y en cada cuadrante se suspendió 10µl de la bacteria a estudiar en una dilución de 1/100 a partir de una escala 0.5 de Mc Farland, usando en el cuadrante 25 una cepa control (*E. coli* ATCC 25922) se incubó a 35°C durante 4 horas buscando crecimiento bacteriano, reportando como CIM la concentración próxima al último crecimiento de cada cepa.

Cálculos para Avibactam

Se utilizó la siguiente formula : $C1 \times V1 = C2 \times V2$

Donde:

La concentración inicial = $C1= 1000 \mu\text{g/ml}$

$V1 =$ desconocido

$C2= 80\mu\text{g/ml}$

$V2= 6250\mu\text{l}$

$V1=80 \times 6250 / 1000 = 500$

Se prepararon 9 grupos de 12 diluciones

Cada grupo necesito de $6250 \mu\text{l}$ de avibactam

Entonces $80 \times 6250 / 1000 = 500 \mu\text{g} = 5.0 \text{ mg}$ de avibactam + $6250\mu\text{l}$ de agua de inyección.

- **Cálculos para Aztreonam**

Se utilizó la siguiente formula: $C1 \times V1 = C2 \times V2$

Donde la concentración inicial = $C1= 1000\mu\text{g/ml}$

$V1=$ desconocido

$C2 = 1280 \mu\text{g/ml}$

$V2= 1000 \mu\text{l}$

$1280 \times 1000 / 1000 = 1280 \mu\text{l} = 1.28 \text{ mg}$

Para cada grupo con 12 diluciones se necesitan $1000 \mu\text{l}$ de aztreonam a $1.280 \mu\text{g/ml}$

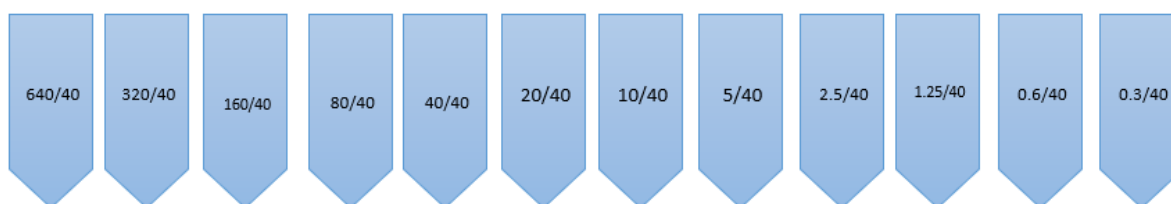
Para 9 grupos necesitamos $9000 \mu\text{l}$ de solución aztreonam

Entonces $9 \times 1000 = 9000$

$1280 \times 9000 / 1000 = 11580 \mu\text{g} = 11.58 \text{ mg}$ de aztreonam a 1 g/ml

Se colocaron 12 Crioviales estériles rotulados de la siguiente manera en diluciones decrecientes (figura 3).

Figura 3: Diluciones de aztreonam/avibactam



Se agregó $500 \mu\text{l}$ de agua de inyección estéril a partir del criovial 2 (320/40) hasta el criovial N° 12 (0.3/40) paso seguido se agregó $500 \mu\text{l}$ de aztreonam de 1.28 mg/ml al criovial N°1 (640/40) y $500 \mu\text{l}$ al criovial N° 2 (320/40) a partir del criovial dos se homogenizo con la ayuda de la pipeta retirando $500 \mu\text{l}$ de la mezcla para agregarlo al criovial N° 3 repitiendo el mismo procedimiento hasta llegar al criovial N°12, en este último homogenizamos y descartamos $500 \mu\text{l}$ de la mezcla, añadimos $500 \mu\text{l}$ de avibactam $80 \mu\text{g/ml}$ a cada uno de los crioviales, con la ayuda de un vórtex se homogenizo todos los crioviales, paso seguido en placas Petri estériles rotuladas desde la dilución 64/4 hasta 0.03/4 se trasvasa el antibiótico en cada una de las placas y se añade 9 ml de agar Mueller Hinton obteniendo una dilución 1/10.(Figura 5 y Figura 6)

Figura 4: Dilución final para el método de CIM

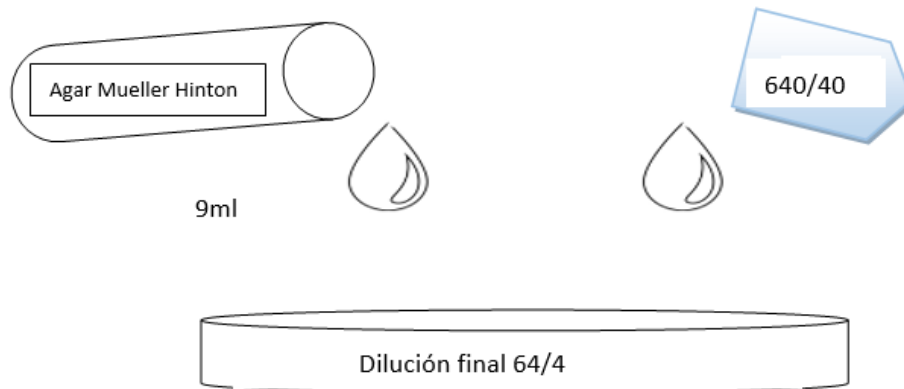


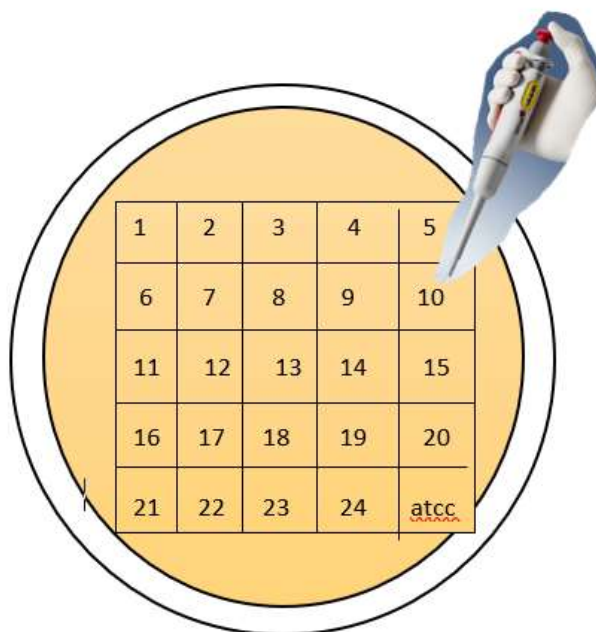
Figura 5: Diluciones finales para el método de CIM



Una vez preparado el agar se divide la placa en 25 cuadrantes y a partir de un crecimiento en CHROMagar de cada enterobacteria, se hace una dilución en escala 0.5 de McFarland, en un criovial estéril se rotulo el número de la cepa y se agregó 990 μ l de solución salina y 10 μ l de la cepa de estudio al 0.5 McFarland, con la ayuda de un vortex se homogenizo para una mezcla optima, paso seguido con la ayuda de una pipeta se agregó 10 μ l de esta dilución 1/100 a las placas con antibiótico se llevó a 35-37 °C durante 4 horas y se anotaran los resultados. (Figura 6)

*Dividimos cada placa en 5 cuadrantes y cada cuadrante colocaremos la bacteria a estudiar diluida 1/100, incubamos a 35-37 °C durante 18-24 horas

Figura 6: Inoculación de la bacteria en placas de agar Müeller Hinton con ATM/AVI.



3.8.2 Análisis de Datos

Se generó una base de datos donde se incluyó los datos obtenidos en el estudio de origen utilizando el programa Excel 2019. Las variables (CIM, Predifusión, Disco combinado, sensibilidad antibiótica, origen de la enterobacteria, genes de resistencia y sexo) fueron expresados en frecuencias absolutas y relativas. La variable edad fue expresada mediante mediana y rango intercuartílico. Además, se evaluó la asociación entre las variables de CIM, pre difusión y disco combinado.

3.9. Aspectos éticos

Se trabajó con aislados bacterianos y no se consideró el nombre del paciente ni la historia clínica, por lo que no se consideró necesario el consentimiento informado. Se solicitó la autorización de los autores del estudio principal para el uso de los aislamientos bacterianos

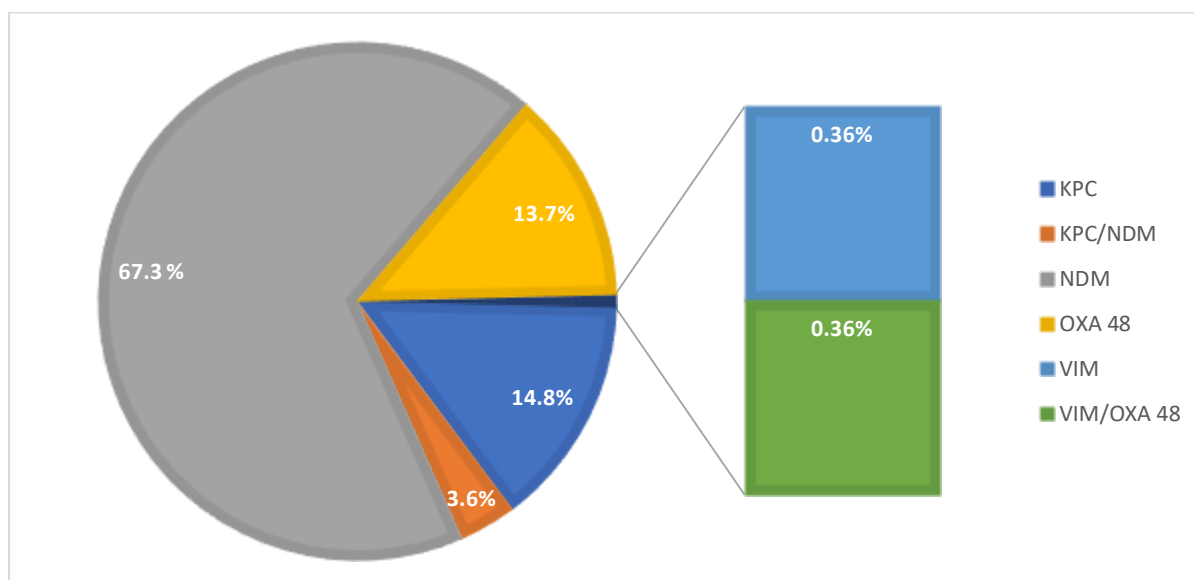
y de los datos obtenidos (Anexo 4). Así como, la autorización del Comité de ética de investigación de la Universidad de Piura (Anexo 5). El estudio sigue los lineamientos de las buenas prácticas y de ética en investigación biomédica.

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Presentación y análisis de los resultados

En la población de estudio de *Enterobacteriales* aisladas de hospitales y un laboratorio privado a partir de 278 aislamientos fueron detectadas por métodos moleculares las enzimas carbapenemasas, las que presentaron la siguiente distribución: la población mayor fueron los productores de NDM con 67.3% (187), en segundo lugar los productores de KPC con una frecuencia de 14.8 % (41), seguido de OXA-48 quien representa el 13.7% (38) del total, una población de doble carbapenemasa de KPC/NDM conformo el 3.6% (10), seguido de un aislamiento con doble carbapenemasa de VIM/OXA-48 0.36% (1), y por ultimo una cepa portadora de VIM que representa al 0.36% (1) de las carbapenemasas. (Grafico 1)

Gráfico1. Frecuencia de enzimas carbapenemasas detectadas en *Enterobacteriales* aislados de pacientes hospitalizados, 2022.



En nuestro estudio se incluyeron solo los aislamientos que presentaron enzimas carbapenemasas de tipo Nueva Dehli Metalocarbapenemasa. Por lo que se trabajó con 197 cepas de *Enterobacterales*, 187 productoras de carbapenemasas de tipo NDM y 10 productoras de doble carbapenemasa NDM/KPC, todas cepas aisladas de pacientes hospitalizados durante el año 2022. De los tres métodos usados para determinar el comportamiento *in vitro* de ATM/AVI.

Se observó que, de los 197 aislamientos, 135 (69%) se recuperaron de muestras de orina, mientras que 62 (31%) fueron aisladas de muestra de sangre. También se identificó la procedencia de origen donde 93 (47%) fueron obtenidas del Hospital Nacional Guillermo Almenara, 57(29%) procedieron del Hospital Nacional Hipólito Unanue, 32 (16%) provinieron del Laboratorio Roe, y finalmente 15 (7.6%) del Hospital de Emergencias Ate Vitarte. Las características demográficas de los pacientes de donde se aislaron los microorganismos, muestran una mediana de edad que fue 58 años (RIQ: 41–72) y siendo las muestras obtenidas en su mayoría del sexo masculino 86 (61%), como se puede apreciar en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de *Enterobacteriales* resistente a carbapenémicos según procedencia y tipo de aislamiento

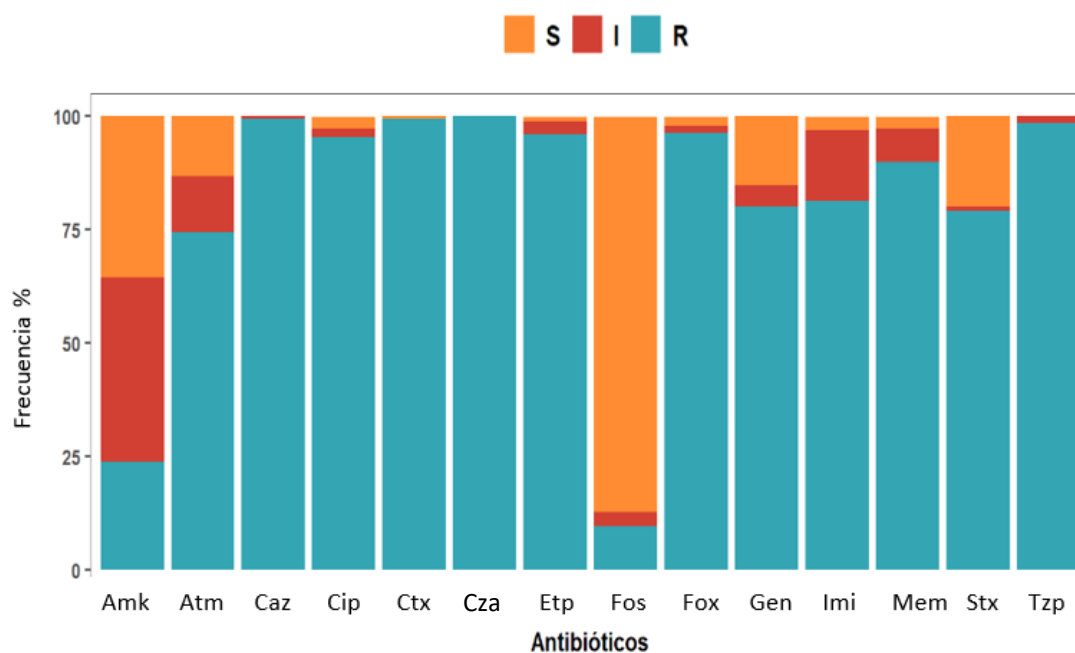
Características		N° (%)
Procedencia	Hospital Guillermo Almenara	93 (47%)
	Hospital Hipólito Unanue	57 (29%)
	Laboratorios ROE	32 (16%)
	Hospital de emergencias Ate Vitarte	15 (7.6%)
Sexo	Femenino	56 (39%)
	Masculino	86 (61%)
	sin datos	55
Edad		58 (41, 72)*
Tipo de muestra	Sangre	62 (31%)
	Orina	135 (69%)
Principales resistencias antimicrobianas		
Caz/avi	Sensible	0 (0%)
	Intermedio	0 (0%)
	Resistente	197 (100%)
Aztreonam	Sensible	26 (13%)
	Intermedio	25 (12%)
	Resistente	146 (74%)
Meropenem	Sensible	5 (2.5%)
	Intermedio	15 (7.6%)
	Resistente	177 (90%)
Imipenem	Sensible	6 (3.0%)
	Intermedio	31 (16%)
	Resistente	160 (81%)

* **Nota:** La edad esta expresada en media y rango intercuartílico

Nueva Delhi metalo-betalactamasas aislados de pacientes hospitalizados, se evidencio un gran índice de resistencia a CAZ-AVI 197 (100%), aztreonam mostro resistencia en 146 cepas (74%), 4 (12%) se interpretaron como intermedio y 6 (13%) se reportaron como sensibles.

177 (90%) fueron resistentes a meropenem, mientras que 160 (81%) fueron resistentes a imipenem (Gráfico 2).

Gráfico 2. Sensibilidad antimicrobiana de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasas aislados de pacientes hospitalizados, 2022.

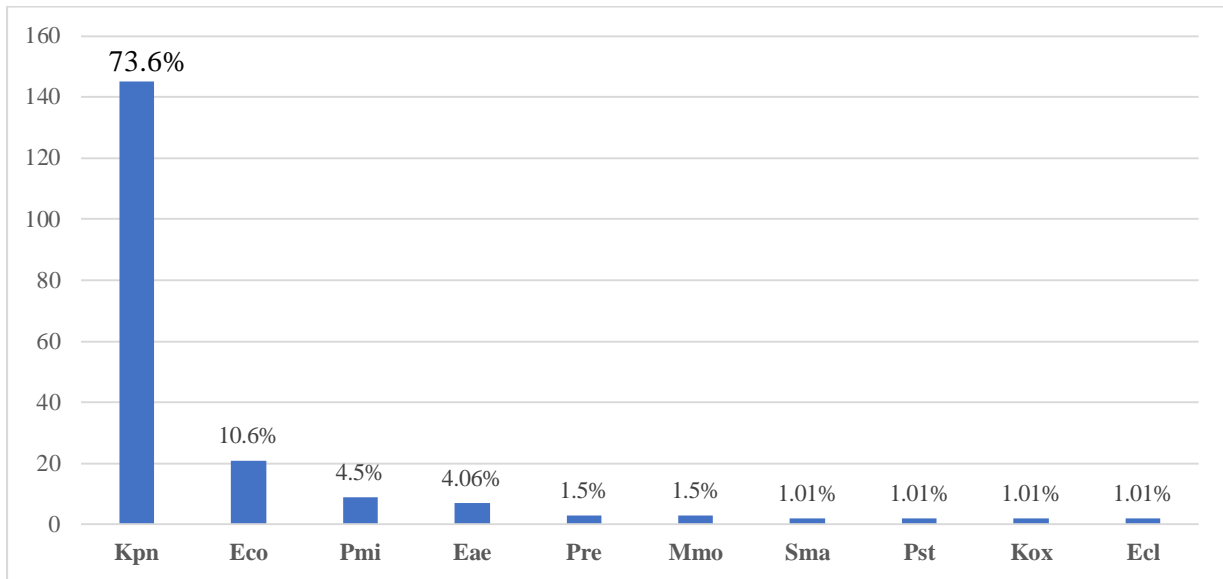


S: sensible, I: intermedio, R: resistente

Amk: amikacina, Atm: aztreonam, Caz: ceftazidima, Cip: ciprofloxacina, Ctx: cefotaxima, Cza: ceftazidima/avibactam, Etp: ertapenem, Fos: fosfomicina, Fox: cefoxitina, Gen: gentamicina, Imp: imipenem, Mem: meropenem, Sxt: sulfametoxazol/trimetoprima, Tzp: piperacilina/tazobactam.

Con respecto a la identificación del microorganismo de los 197 aislados, 145 (73.6%) pertenecen a *Klebsiella pneumoniae*, 1 (10.6%) corresponden a *Escherichia coli*, 9 aislamientos correspondieron a *Proteus mirabillis* representando un 4.5%, 8 aislamientos (4.1%), se identificaron como *Klebsiella aerogenes* mientras que el 7% restante comprendieron aislamientos de otras enterobacterias como: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*. En el Gráfico 3, se puede observar la frecuencia de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa

Gráfico 3. Frecuencia de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.



Eae: *Klebsiella aerogenes*, Ecl: *Enterobacter cloacae*, Eco: *Escherichia coli*, Kox: *Klebsiella oxitoca*, Kpn: *Klebsiella pneumoniae*, Mmo: *Morganella morganii*, Pmi: *Proteus mirabilis*, Pre: *Providencia rettgeri*, Sma: *Serratia marcescens*.

4.1.1. Análisis descriptivo de resultados

Para el análisis de la determinación *in vitro* de aztreonam/avibactam se recuperaron 197 aislamientos (100%), 187 (94.9%) contenían el mecanismo de resistencia de producción de enzimas NDM, 10 (5.07%) fueron de tipo KPC/NDM (doble carbapenemasas). Se realizaron los 3 métodos descritos a todos los aislamientos obteniendo los siguientes resultados: 10 (100%) cepas que presentaban doble carbapenemasa se reportaron como salvajes mediante los tres métodos: pre difusión rápida, disco combinado y CIM. Las 187 (100%) cepas que contenían el gen NDM se reportaron como salvajes mediante el método de disco combinado, a diferencia del disco de pre difusión en el cual 01 cepa se reportó como no salvaje, y 186 fueron reportadas como salvajes. Por el método de CIM, 185 cepas fueron reportadas como salvajes y dos cepas de este grupo se reportaron como no salvajes, cabe recalcar que estas cepas reportadas como no salvajes se les repitió la prueba, confirmando este resultado (Tabla 2). La sinergia clínica con CIM por debajo del punto de corte ATM según las definiciones EUCAST (susceptible, $S \leq 1$ mg /L; susceptible con dosificación optimizada [intermedia], 1–4 mg/L; resistente, $R > 4$ mg/L)³⁷.

Tabla 2. Frecuencia de aislamientos salvajes y no salvajes de *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi Metallo-betalactamasa frente a la combinación de aztreonam/avibactam por tres metodologías.

Métodos	KPC/MBL, N = 10^I N° (%)	MBL, N = 187^I N° (%)
CIM ATM/AVI		
No salvaje	0 (0%)	2 (1.1%)
Salvaje	10 (100%)	185 (98.9%)
Pre difusión rápida		
No salvaje	0 (0%)	1 (0.5%)
Salvaje	10 (100%)	186 (99.5%)
Disco combinado		
Salvaje	10 (100%)	187 (100%)

Los valores de CIM de ATM/AVI revelaron que 185 cepas productoras de NDM y 10 cepas productoras de doble carbapenemasa fueron $\leq 4\mu\text{g} / \text{ml}$. Solamente cepas productoras NDM tuvieron una CIM mayor o igual que $8 \mu\text{g}/\text{ml}$.

4.1.2. Discusión de resultados

Los estudios de resistencia a los antimicrobianos han sido temas muy estudiados por los profesionales del área de la salud dedicados a la microbiología desde la aparición de los antibióticos, lamentablemente han ido cobrando mayor importancia en los últimos años con la aparición de aislamientos mutantes con diferentes mecanismos de resistencia que los propone como muy difíciles de tratar. En este estudio hemos podido observar la gran resistencia antimicrobiana que poseen las especies de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas, así como también evidenciamos un alto nivel de resistencia a diferentes grupos de antibióticos no betalactámicos como: quinolonas (ciprofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina y amikacina) y sulfonamidas. Sin embargo, para nuestra tranquilidad la combinación de los antibióticos ATM/AVI usados en este proyecto han dado resultados que concuerdan con otros reportes^{19,20,21}.

En este estudio también evidenciamos un ambiente hospitalario en nuestro país, con una frecuencia importante de aislamientos productores de carbapenemasas del tipo NDM, en una época aún crítica de la pandemia durante el año 2022.

Hasta donde se conoce en la actualidad, en el Perú no hay estudios donde describan la actividad *in vitro* de ATM en combinación con AVI, y existen muy pocas publicaciones acerca de presencia de enzimas carbapenemasas⁶. En este estudio evidenciamos la frecuencia significativa de esta clase de microorganismos con resistencia importante en nuestros hospitales, también podemos observar que hay una alta frecuencia de carbapenemasas en muestras de orina, aunque la cantidad de estos microorganismos en muestras de sangre son poco tranquilizantes.

En cuanto a la prevalencia de *Enterobacterales* productores de carbapenemasa varias fuentes afirman que *Klebsiella spp.* Tiene una prevalencia superior a *Escherichia coli*, nuestro

estudio presenta una prevalencia de *Klebsiella* spp. de 74% superior a *E. coli* (11%), lo que concuerda con Guoping et al¹⁹. quienes reportan una prevalencia de *Klebsiella* spp de 59.7% por encima de *E. coli* (16.4%), Falcone et al²³. quienes muestran una prevalencia de *Klebsiella* spp de 77.4% por encima de *E. coli* (2.9%). Sin embargo, nuestros resultados difieren con el estudio de Le Terrier et al²². quienes reportaron una mayor prevalencia de *E. coli* (40.9%), frente a *Klebsiella* spp (20.4%).

En nuestro estudio la población total de los *Enterobacterales* productores de carbapenemasa fueron de 278 aislamientos, mientras que los portadores de carbapenemasa de tipo NDM ascendían a 187 representando una frecuencia de 67.3%, el cual es similar a lo reportado por Guoping et al¹⁹. quienes observaron una frecuencia de 67% en productores de carbapenemasa de tipo NDM, Miles et al²⁰. observaron una frecuencia en portadores de NDM del 70.4 %, Le Terrier et al²². Reportaron en su estudio una frecuencia del 77.1% en *Enterobacterales* de tipo NDM, por otro lado Falcone et al²³. reportaron un 80.3% de productores de carbapenemasa de tipo NDM, estos datos son discordantes con lo reportado por Sader et al²¹. que observan una frecuencia mayor en los *Enterobacterales* de tipo KPC y OXA-48, y en menor cantidad a las de tipo NDM con una frecuencia de 29 %.

Con respecto al objetivo principal, se logró determinar la actividad *in vitro* de ATM/AVI frente a *Enterobacterales* productores de NDM aislados de pacientes hospitalizados durante el año 2022. Nuestros resultados al ser comparados con los antecedentes de este estudio evidencian una relación bastante estrecha. Teniendo como resultados en los métodos de CIM, predifusión rápida y disco combinado una eficacia del 98.9%, 99.5% y 100% respectivamente, esta frecuencia pertenece al grupo de *Enterobacterales* identificados como salvajes, y en los aislados identificados como no salvajes obtuvimos una frecuencia de 1.1%, 0.5% y 0% respectivamente.

Al determinar la actividad *in vitro* de la combinación ATM/AVI mediante el método de CIM nuestros resultados reflejan en *Enterobacterales* productores de NDM una actividad efectiva del 98.9% y 100% en *Enterobacterales* productores de doble carbapenemasa KPC/NDM con una CIM <4 mg/L. Asimismo, se observó que el 1.1% de *Enterobacterales* productores de NDM reportados como no salvaje, presentaron una MIC mayor a 8 mg/L; lo cual coincide con los reportes de las investigaciones de otros autores. Con respecto al método de CIM Guoping et al¹⁹ observaron una efectividad del 100 % en 37 aislamientos productores de NDM, al inicio observaron que al realizar la CIM de CAZ-AVI obtuvieron valores mayores de 128 mg/L, al realizar el mismo procedimiento y combinar CZA y ATM la CIM del total de los productores de NDM fue ≤ 4 mg/L. Del mismo modo el estudio publicado por Miles et al²⁰. observaron una actividad bactericida del 93.1% con el método de CIM y una eficacia del 97.7% con el método de disco de pre difusión/E-test modificado en 43 aislamientos de *Enterobacterales* productores de NDM, en donde solo 3/43 aislamientos permanecieron resistentes con la adición de CZA restaurando el punto de corte de ATM (CIM <4 mg/L), asimismo con el método de E-test modificado, de 43 aislamientos solo uno fue reportado como intermedio y 1 aislamiento se reportó como resistente, en este estudio describen el método de E-test modificado como un método de laboratorio rápido y práctico para detectar sinergia clínicamente relevante entre CAZ/AVI+ATM en *Enterobacterales* productores de NDM. Otro estudio que afianza nuestros resultados, fue el publicado por Sader et al²¹. quienes observaron que el 99.9 % de 8787 aislamientos de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas recolectados en varios países del mundo estos fueron inhibidos a una CIM de ATM/CZA ≤ 8 mg/l, incluido el 99.7 % de los resistentes a carbapenems y 99.7% de aislados multirresistentes. Estos resultados de investigación internacional respaldan el desarrollo clínico de ATM/AVI para el tratamiento de infecciones por *Enterobacterales*, incluidas aquellas infecciones causadas por cepas productoras de NDM.

Adicionalmente, es necesario mencionar que el método de CIM es un prueba clínicamente relevante y significativa; sin embargo, para su realización esta prueba demanda un mayor tiempo en el procesamiento.

La terapia combinada de ATM/CZA ha sido efectiva en estudios *in vivo* como lo muestra el estudio de Falcone et al²³. donde describen su eficacia en 82 pacientes con infecciones del torrente sanguíneo causadas por *Enterobacterales* productoras de NDM, con una menor tasa de mortalidad y menor tasa de fracaso frente a pacientes tratados con antimicrobianos que *in vitro* resultaban sensibles a la bacteria (colistina, fosfomicina, tigeciclina), mostrando a la terapia con ATM/CZA más oportuna, y con menos efectos adversos. Sin embargo, avibactam no es el único inhibidor para realizar terapia combinada con aztreonam, el estudio de Le Terrier et al²². comparo la actividad entre aztreonam y otros inhibidores de la betalactamasa como zidebactam, nacubactam y taniborbactam, observando una actividad *in vitro* más efectiva, en comparación a la combinación aztreonam y avibactam.

Cabe recalcar que los estudios descritos como antecedentes, han utilizado la combinación CAZ/AVI + ATM. En nuestro estudio para realizar la CIM y disco combinado se preparó y utilizó individualmente cada uno: avibactam (inhibidor) y aztreonam (antibiótico). Sin embargo, para el disco de pre difusión rápida se utilizó disco de CAZ/AVI +ATM, otra de las diferencias de nuestro estudio a los anteriores es que para la técnica de CIM se realizó en placa a diferencia de la micro dilución en caldo, nuestros resultados muestran una similitud en cuanto a la eficacia de esta combinación.

Por otro lado, al determinar la actividad *in vitro* de la combinación de ATM/AVI mediante el método de pre difusión rápida, se observó una sensibilidad del 99% y 100% en *Enterobacterales* productores de NDM y doble carbapenemasa KPC/NDM, y solo un aislamiento se presentó como no salvaje. Al determinar la actividad *in vitro* de la combinación de ATM/AVI mediante el método de disco combinado observamos que el 100%

de los aislamientos tanto de portadores de NDM como de doble carbapenemasa se reportaron como cepas salvajes (>19 mm de diámetro). Es importante indicar que los diámetros de halos entre el disco de pre difusión y el disco combinado en el 90% de los aislamientos mostraron una diferencia en el diámetro del halo (≥ 2 mm). Al parecer la diferencia podría deberse a la pre difusión del disco, frente al disco combinado; donde avibactam está en contacto en el agar más tiempo (18 horas), mientras que el disco de pre difusión CAZ-AVI tiene solo un tiempo de difusión de 15 minutos.

Los métodos utilizados en este estudio, podrían ser empleados de manera practica en los laboratorios públicos o privados, dado que observamos una adecuada correlación en sus resultados. Como lo sugieren otros investigadores, Por lo realizado, se podría sugerir sin duda, el uso de la combinación de antimicrobianos ATM y AVI como una opción que debe tomarse en cuenta en la terapia contra la presencia de aislamientos bacterianos productores de metalo carbapenemasas como NDM e incluso los productores de doble carbapenemasa.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La combinación de aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022 presento una excelente actividad antimicrobiana *in vitro*.
- Los *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados frente a la combinación de aztreonam/avibactam presentaron una frecuencia de 98% de aislamientos salvajes.
- Por la metodología de concentración mínima inhibitoria, la actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados fue del 98.9%.
- Por el método de pre difusión rápida con discos la combinación aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados presento una alta actividad antimicrobiana *in vitro* del 99.5%.
- La actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam por el método de disco preparado frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados fue del 100%.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda ampliar la investigación utilizando nuevos inhibidores de betalactamasas, y nuevas técnicas microbiológicas.
- Se recomienda el uso de nuevas técnicas como el método de disco de pre difusión y disco combinado en los laboratorios de microbiología de nuestro país para el estudio de sensibilidad frente a *Enterobacterales* productores de carbapenemasas de tipo NDM o doble carbapenemasa por ser rápidas, reproducibles y confiables.
- Se debe considerar los hallazgos de *Enterobacterales* no salvajes como hallazgos de alto riesgo, requiriendo el máximo esfuerzo de los equipos de salud, sobre todo del área de microbiología y detección molecular.
- Nuestros resultados *in vitro* mostraron buena actividad de avibactam en combinación con aztreonam para *Enterobacterales* clínicamente relevantes, por lo que es recomendable su desarrollo para tratar infecciones causadas los productores de enzimas Nueva Delhi metalo-betalactamasa y doble productores de carbapenemasas.

6. REFERENCIAS

1. Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014 ene 1;32(S4):17-23. doi: 10.1016/S0213-005X(14)70170-3
2. Salgado P, Gilsanz F, Maseda E. Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas [Therapeutic options for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae]. *Rev Esp Quimioter*. 2015 Sep;28 Suppl 1:12-5. Spanish. PMID: 26365727.
3. Moreno M Claudia, González E Rubén, Beltrán Constanza. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* [Internet]. 2009Ago[citado2024Feb20];69(2):185-192. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>.
4. Kumarasamy, Karthikeyan K et al. “Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study.” *The Lancet. Infectious diseases* vol. 10,9 (2010): 597-602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2
5. Jiménez Pearson, María Antonieta et al. “Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes” [Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens. Consenso latino-americano para definição, categorização e notificação de patógenos multirresistentes, com resistência ampliada ou panresistentes]. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health* vol. 43 e65. 22 Aug. 2019, doi:10.26633/RPSP.2019.65

6. Angles-Yanqui E, Huaranga-Marcelo J, Sacsquispe-Contreras R, Pampa-Espinoza L. Panorama de las carbapenemasas en Perú [Panorama of carbapenemases in PeruUm panorama das carbapenemases presentes no Peru]. *Rev Panam Salud Publica*. 2020 Sep 23;44: e61. Spanish. doi: 10.26633/RPSP.2020.61. PMID: 32973907; PMCID: PMC7498286.
7. Lipari Flavio G., Hernández Daniela, Vilaró Mario, Caeiro Juan P., Saka Héctor Alex. Caracterización clínica, epidemiológica y microbiológica de bacteriemias producidas por enterobacterias resistentes a carbapenems en un hospital universitario de Córdoba, Argentina. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2020 Ago [citado 2023 Mar 26]; 37(4): 362-370. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000400362>.
8. Mauri, Carola et al. “The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases.” *Antibiotics(Basel, Switzerland)*vol.10,81012.20Aug.2021, doi:10.3390/antibiotics10081012
9. González-Rubio, R et al. “Evolución de la incidencia de pacientes con colonización e infección por bacterias productoras de carbapenemasas VIM en un hospital pediátrico en España” [Evolution of the incidence of colonized and infected patients by VIM carbapenemase-producing bacteria in a pediatric hospital in Spain]. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia* vol. 32,1 (2019): 60-67.
10. Correa, C., Castro, E., Salamanca, D., Bustacara, L., & Lemos, E. (2017). *Escherichia coli* productora de Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en Colombia: reporte de caso. *Infectio: revista de la Asociación Colombiana de Infectología*, 21(2). doi:10.22354/in.v21i2.658
11. Spyropoulou A, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Marangos M, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, Christofidou M. The first NDM metallo- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in a University Hospital of Southwestern Greece. *J Chemother*. 2016

Aug;28(4):350-1. doi: 10.1179/1973947815Y.0000000003. Epub 2016 May 27. PMID: 25671611.

12. Stone NR, Woodford N, Livermore DM, Howard J, Pike R, Mushtaq S, Perry C, Hopkins S. Breakthrough bacteraemia due to tigecycline-resistant *Escherichia coli* with New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-1 successfully treated with colistin in a patient with calciphylaxis. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Nov;66(11):2677-8. doi: 10.1093/jac/dkr337. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21846669.

13. Snyder BM, Montague BT, Anandan S, Madabhushi AG, Pragasa AK, Verghese VP, Balaji V, Simões EAF. Risk factors and epidemiologic predictors of blood stream infections with New Delhi Metallo-b-lactamase (NDM-1) producing Enterobacteriaceae. *Epidemiol Infect.* 2019 Jan;147:e137. doi: 10.1017/S0950268819000256. PMID: 30869056; PMCID: PMC6518792.

14. Stone NR, Woodford N, Livermore DM, Howard J, Pike R, Mushtaq S, Perry C, Hopkins S. Breakthrough bacteraemia due to tigecycline-resistant *Escherichia coli* with New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-1 successfully treated with colistin in a patient with calciphylaxis. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Nov;66(11):2677-8. doi: 10.1093/jac/dkr337. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21846669.

15. Eficacia y seguridad de ceftazidima-avibactam para el tratamiento de pacientes adultos con neumonía intrahospitalaria asociada a ventilación mecánica causada por bacterias gram negativas productoras de carbapenemasas y resistentes a colistina *Essalud* 2021 Disponible en: http://www.essalud.gob.pe/ietsi/pdfs/directivas/DICT_011_DETS_2021.pdf

16. Pintos-Pascual, I., Servicio de Medicina Interna. Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Cantero-Caballero, M., Muñoz Rubio, E., Sánchez-Romero, I., Asensio-Vegas, Á., & Ramos-Martínez, A. (2020). *Epidemiology and clinical of infections and*

colonizations caused by Enterobacterales producing carbapenemases in a tertiary hospital. *Revista Espanola de Quimioterapia: Publicación Oficial de La Sociedad Española de Quimioterapia*, 33(02), 122–129. doi:10.37201/req/086.2019.

17. De la Fuente-Salcido Norma Margarita, Villarreal-Prieto Jesús Ma., Díaz León Miguel Ángel, García Pérez Ada Patricia. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev. mex. cienc. farm* [revista en la Internet]. 2015 Jun [citado 2023 Dic 19]; 46(2): 7-16. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S18701952015000200007&lng=es.

18. Protocolo Predifusión Rápida Aztreonam-Avibactam [Internet]. Com.ar. [citado el 26 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2021/02/protocolo-predifusion-rapida-aztreonam-avibactam/>

19. Lu, Guoping et al. “In vitro and in vivo Antimicrobial Activities of Ceftazidime/Avibactam Alone or in Combination with Aztreonam Against Carbapenem-Resistant Enterobacterales.” *Infection and drug resistance* vol. 15 7107-7116. 5 Dec. 2022, doi:10.2147/IDR.S385240

20. Rawson, Timothy Miles et al. “A practical laboratory method to determine ceftazidime-avibactam-aztreonam synergy in patients with New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-producing Enterobacterales infection.” *Journal of global antimicrobial resistance* vol. 29 (2022): 558-562. doi:10.1016/j.jgar.2022.01.025

21. Sader, Helio S et al. “Aztreonam/avibactam activity against clinical isolates of Enterobacterales collected in Europe, Asia and Latin America in 2019.” *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 76,3 (2021): 659-666. doi:10.1093/jac/dkaa504

22. Le Terrier, Christophe et al. “In vitro activity of aztreonam in combination with newly developed β -lactamase inhibitors against MDR Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*

producing metallo- β -lactamases.” *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 78,1 (2022): 101-107. doi:10.1093/jac/dkac360

23. Falcone, Marco et al. “Efficacy of Ceftazidime-avibactam Plus Aztreonam in Patients With Bloodstream Infections Caused by Metallo- β -lactamase-Producing Enterobacterales.” *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 72,11 (2021): 1871-1878. doi:10.1093/cid/ciaa586

24. Yauri Condor, Katherine Silvia. "Desempeño de cinco métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en bacilos gram negativos tipificados genotípicamente." (2016). Disponible en: <https://www.grafiati.com/en/literature-selections/bacilos-gram-negativos/>.

25. Henry, John Bernard. Henry el laboratorio en el diagnóstico clínico: homenaje a Todd-Sanford & Davidsohn. Marbán, 2005. Disponible en: <https://dokumen.tips/documents/henry-el-laboratorio-en-el-diagnostico-clinico-parte-1-pag-3-179.html?page=1>

26. Gonzales-Escalante Edgar, Vicente-Taboada William, Champi-Merino Roky, Soto-Pastrana Javier, Flores-Paredes Wilfredo, Lovera-García Margarita et al. Metallo- β -lactamasas en aislamientos clínicos de pseudomonas aeruginosa en Lima, Perú. *Rev. Perú. med. exp. salud publica* [Internet]. 2013 abr [citado 2023 Mar 26]; 30(2): 241-245. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342013000200013&lng=es

27. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Flores Clavo R, Serquén López L, Arce Gil Z. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2015 [citado el 8 de marzo de 2024];32(4):752–5. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000400018

28. García CS, de la Gándara MP, García FJC. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010;28(S1):12–8. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2008-bacteriologia1.pdf>
29. Tompkins, Kathleen, and David van Duin. “Treatment for carbapenem-resistant Enterobacterales infections: recent advances and future directions.” *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* vol. 40,10 (2021): 2053-2068. doi:10.1007/s10096-021-04296-1
30. Bush, Karen, and Patricia A Bradford. “Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens.” *Clinical microbiology reviews* vol. 33,2 e00047-19. 26 Feb. 2020, doi:10.1128/CMR.00047-19
31. Kazmierczak, Krystyna M et al. “Epidemiology of Carbapenem Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible *Enterobacterales* Collected as Part of a Global Surveillance Program, 2012 to 2017.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 65,7 (2021): e0200020. doi:10.1128/AAC.02000-20
32. Stone NR, Woodford N, Livermore DM, Howard J, Pike R, Mushtaq S, Perry C, Hopkins S. Breakthrough bacteraemia due to tigecycline-resistant *Escherichia coli* with New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-1 successfully treated with colistin in a patient with calciphylaxis. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Nov;66(11):2677-8. doi: 10.1093/jac/dkr337. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21846669.
33. Chien JM, Koh TH, Chan KS, Chuah TH, Tan TT. Successful treatment of NDM-1 *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in a neutropenic patient. *Scand J Infect Dis.* 2012 Apr;44(4):312-4. doi: 10.3109/00365548.2011.633549. Epub 2011 Nov 29. PMID: 22126430.

34. Velásquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsquispe R, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Soc Perú Med Interna* 2013; 26 (4): 192-6.
35. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo JJ, Chiappe-Gonzalez A, Vargas-Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori DH, Huaroto-Valdivia LM. *Klebsiella pneumoniae* Nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017;34(2):261-267. doi: 10.17843/rpmesp.2017.342.2615.
36. Camacho-Molina L, Perozo-Mena A, Castellano-González M, Bermúdez-Navarro E, Harris-Socorro B. Métodos fenotípicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [Internet]. 2004 Ene [citado 2023 Dic 02]; 24(1-2): 98-103. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100018&lng=es.
37. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters." *EUCAST Clinical Breakpoint Tables* 12 (2015).
38. Hernández-Sampieri, Roberto, and Christian Mendoza. "Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta." (2020). Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/64591365/Metodolog%C3%ADa_de_la_investigaci%C3
39. Clinical and laboratory standards institute "performance standards for antimicrobial susceptibility testing CLSI M100 (2024) Disponible en: https://clsi.org/media/pjfbviql/m100ed34e_sample.pdf.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

Problemas de la Investigación	Objetivos de la investigación	Variables	Dimensión	Indicador	Tipo de investigación	Nivel de investigación	Población, muestra y muestreo
Problema General	Objetivo General	Dependiente	Cuantitativa	Diámetro de halo de inhibición (mm)	El presente proyecto pertenece al tipo de investigación básica de diseño no experimental, prospectivo de corte transversal y enfoque cuantitativo	La presente investigación es de tipo descriptiva	<p>La población de interés en esta investigación está compuesta por el total de Aislamientos de <i>Enterobacteriales</i> obtenidos del proyecto "Epidemiología y actividad <i>in vitro</i> de cefiderocol, ceftazidima/avibactam, aztreonam/avibactam e imipenem/rellebactam frente a <i>Enterobacteriales</i> productores de carbapenemasas recuperados de muestras de sangre y orina de pacientes Hospitalizados durante el 2022".</p> <p>Muestra: se trabajaron con 187 aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo NDM y 10 de tipo KPC/NDM del cepario del proyecto ya PI 2307 del cepario de la Universidad de Piura.</p> <p>Muestreo: La selección de las muestras se llevará a cabo mediante un método de conveniencia, incluyendo cepas de enterobacterias de tipo NDM y que provengan de muestras clínicas de orina y sangre</p>
¿Cuál será la actividad <i>in vitro</i> de la combinación aztreonam/avibactam frente a enterobacteriales productores de nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022?	Determinar la actividad <i>in vitro</i> de aztreonam/avibactam frente a <i>Enterobacteriales</i> productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.	Actividad <i>in vitro</i> de la Combinación aztreonam/avibactam					
Problemas Específicos	Objetivos específicos	Independiente	Cuantitativa	Crecimiento bacteriano			
¿Cuál es la frecuencia de los aislamientos salvajes y no salvajes de <i>Enterobacteriales</i> productores de NDM frente a la combinación de aztreonam/avibactam aislados de pacientes hospitalizados durante el 2022?	Determinar la frecuencia de aislamientos salvajes y no salvajes de <i>Enterobacteriales</i> productores de NDM frente a la combinación de aztreonam/avibactam aislados de pacientes hospitalizados durante el 2022.						
¿Existe correlación entre las diversas metodologías descritas para la determinación de la actividad <i>in vitro</i> de aztreonam/avibactam frente a <i>Enterobacteriales</i> productores de Nueva Delhi Metalo-betalactamasa (NDM)?	Determinar la actividad <i>in vitro</i> de aztreonam/avibactam con el método de la concentración mínima inhibitoria (CIM), frente a <i>Enterobacteriales</i> productores de Nueva Delhi Metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.						
	Determinar la actividad <i>in vitro</i> de aztreonam/avibactam con el método disco de Predifusión, frente a <i>Enterobacteriales</i> productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.	Enterobacteriales productores de NDM					
	Determinar la actividad <i>in vitro</i> de aztreonam/avibactam con el método de disco preparado ATM/AVI, frente a <i>Enterobacteriales</i> productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022.						

Anexo 2. Instrumentos

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE AISLAMIENTOS DE *Enterobacterales* de pacientes hospitalizados en el 2022

Código	<input type="text"/>	Servicio/consultorio	<input type="text"/>
Edad	<input type="text"/>	Sexo	<input type="text"/>
Tipo de muestra	<input type="text"/>	Tipo de aislamiento	<input type="text"/>
Gen de Resistencia	Positivo	Negativo	
blaNDM	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
blaKPC	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
CIM ATM/AVI		<input type="text"/>	
Predifusión ATM/AVI		<input type="text"/>	
Disco combinado ATM/AVI		<input type="text"/>	

Anexo 3. Aprobación del Comité de Ética Universidad privada Norbert Wiener



COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Lima, 31 de julio de 2023

Investigador(a)
Maira Alejandra Escobar Valdiviezo
Exp. N°: 0808-2023

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que el Comité Institucional de Ética para la investigación de la Universidad Privada Norbert Wiener (CIEI-UPNW) **evaluó y APROBÓ** los siguientes documentos:

- Protocolo titulado: **“Actividad in vitro de la combinación aztreonam/avibactam frente a Enterobacteriales productores de nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022” Versión 01 con fecha 22/07/2023.**

El cual tiene como investigador principal al Sr(a) Maira Alejandra Escobar Valdiviezo y a los investigadores colaboradores (no aplica)

La APROBACIÓN comprende el cumplimiento de las buenas prácticas éticas, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo de investigación y la confidencialidad de los datos, entre otros.

El investigador deberá considerar los siguientes puntos detallados a continuación:

1. **La vigencia** de la aprobación es de **dos años** (24 meses) a partir de la emisión de este documento.
2. **El Informe de Avances** se presentará cada 6 meses, y el informe final una vez concluido el estudio.
3. **Toda enmienda o adenda** se deberá presentar al CIEI-UPNW y no podrá implementarse sin la debida aprobación.
4. Si aplica, **la Renovación** de aprobación del proyecto de investigación deberá iniciarse treinta (30) días antes de la fecha de vencimiento, con su respectivo informe de avance.

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines pertinentes.

Atentamente,



Yenny Marisol Bellido Fuente
Presidenta del CIEI- UPNW

Anexo 4. Autorización de autores del estudio principal para el uso de cepas y datos obtenidos

Declaración de consentimiento de uso de material biológico para estudios de investigación

Yo, Arturo Octavio Gonzales Rodríguez, identificado con DNI 44157359, investigador principal del proyecto de código PI2307, titulado: **Epidemiología y actividad *in vitro* de cefiderocol, ceftazidima/avivactam, aztreonam/avivactam e imipenem/relebactam frente a *Enterobacterales* productores de carbapenemasas recuperados de muestras de sangre y orina de pacientes hospitalizados durante el 2022**, autorizo a la Bachiller en Tecnología Médica, Escobar Valdiviezo Maira Alejandra, identificada con DNI 77924568 para que pueda hacer uso de las cepas obtenidas del proyecto antes mencionado, almacenadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de Piura, para la realización de la tesis titulada **Actividad *in vitro* de aztreonam/avibactam frente a *Enterobacterales* productores de Nueva Delhi metalo-betalactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022**.

Lima 10 de agosto 2023



Arturo Octavio Gonzales Rodriguez

DNI:44157359

Anexo 5. Aprobación del comité institucional de ética en investigación de la universidad de Piura



El Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de Piura

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación ***Actividad in vitro de aztreonam/avibactam frente a Enterobacterales productores de Nueva Delhi metallo-beta lactamasa aislados de pacientes hospitalizados, 2022*** con expediente N° E0124-01, presentado por: *Maira Alejandra Escobar Valdiviezo*; fue **APROBADO** en la sesión plenaria del 21 de febrero de 2024. Esta aprobación se otorga por su validez científica, respeto de las normas legales vigentes y satisfacción de los requisitos exigidos por la Ética en Investigación.

El presente certificado tendrá una vigencia de 01 año a partir de la fecha de esta constancia y obliga al investigador responsable de notificar al CIEI la fecha de inicio de la ejecución del proyecto, así como la presentación de informes semestrales al siguiente correo: secretaria.ciei@udep.edu.pe. Adicionalmente, según nuestro Reglamento (13.10), el CIEI puede solicitar la revisión del proyecto a lo largo de su desarrollo.

Dado en Lima, jueves, 22 de Febrero de 2024



Anexo 6. Reporte de similitud de Turnitin

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**Informe final Tesis Alejandra Escobar 06
-05-2024.docx**

AUTOR

Alejandra Escobar Valdiviezo

RECUENTO DE PALABRAS

10775 Words

RECUENTO DE CARACTERES

66120 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

68 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.4MB

FECHA DE ENTREGA

May 7, 2024 12:33 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 7, 2024 12:35 AM GMT-5

● 16% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 15% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Anexo 7. Evidencia fotográfica

Foto 1.

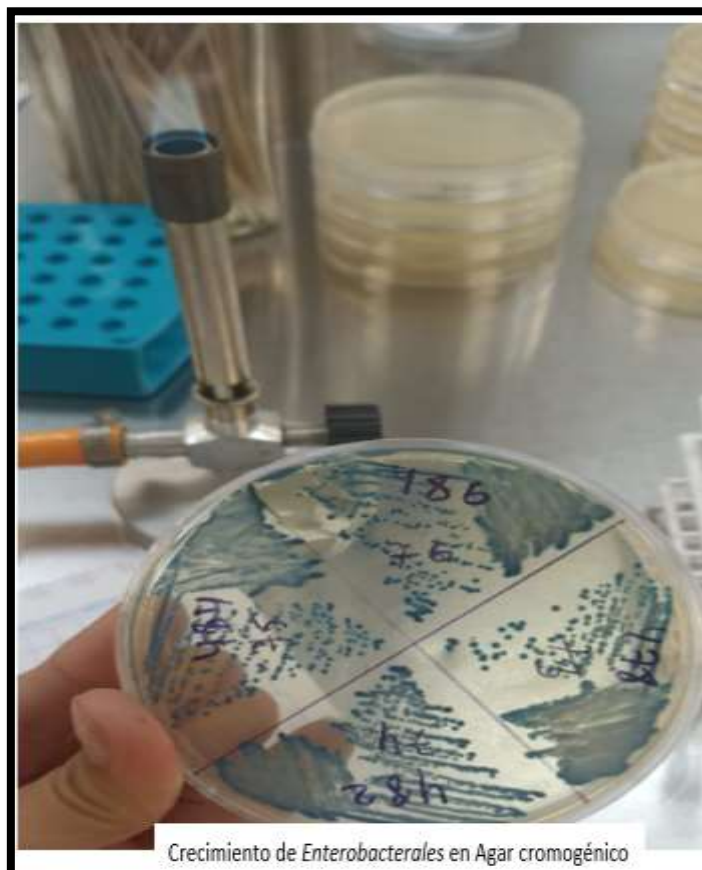
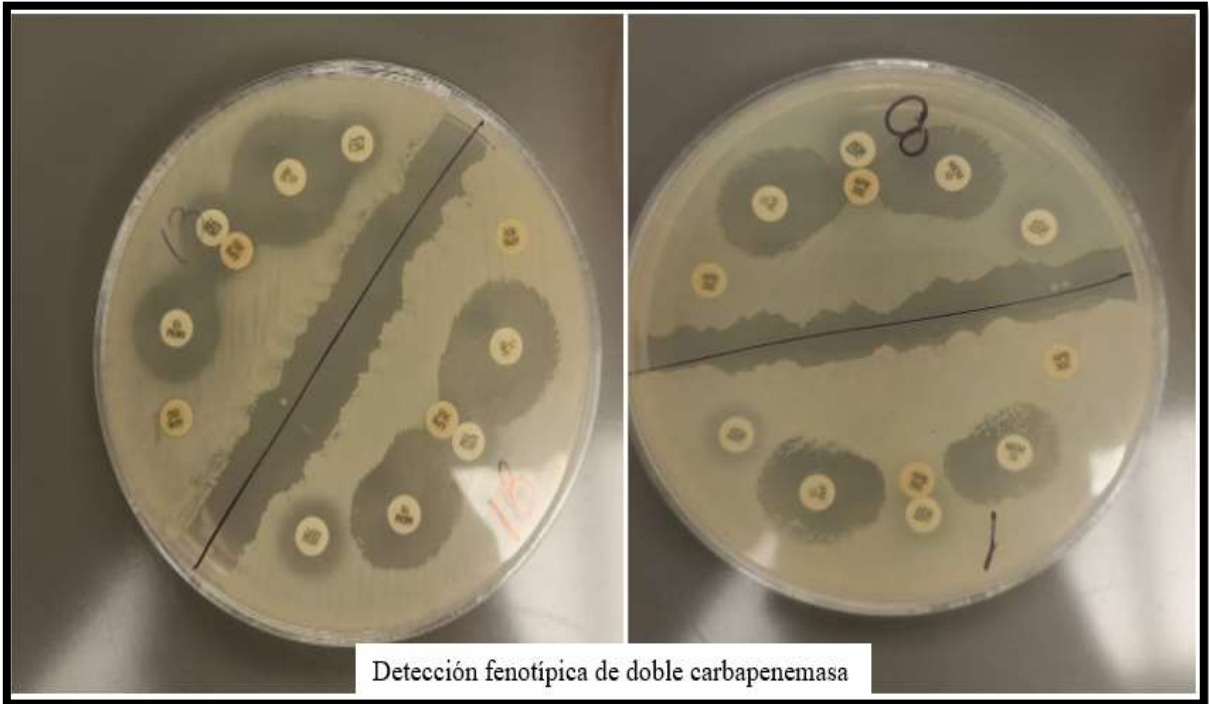


Foto
2.



Foto 3.

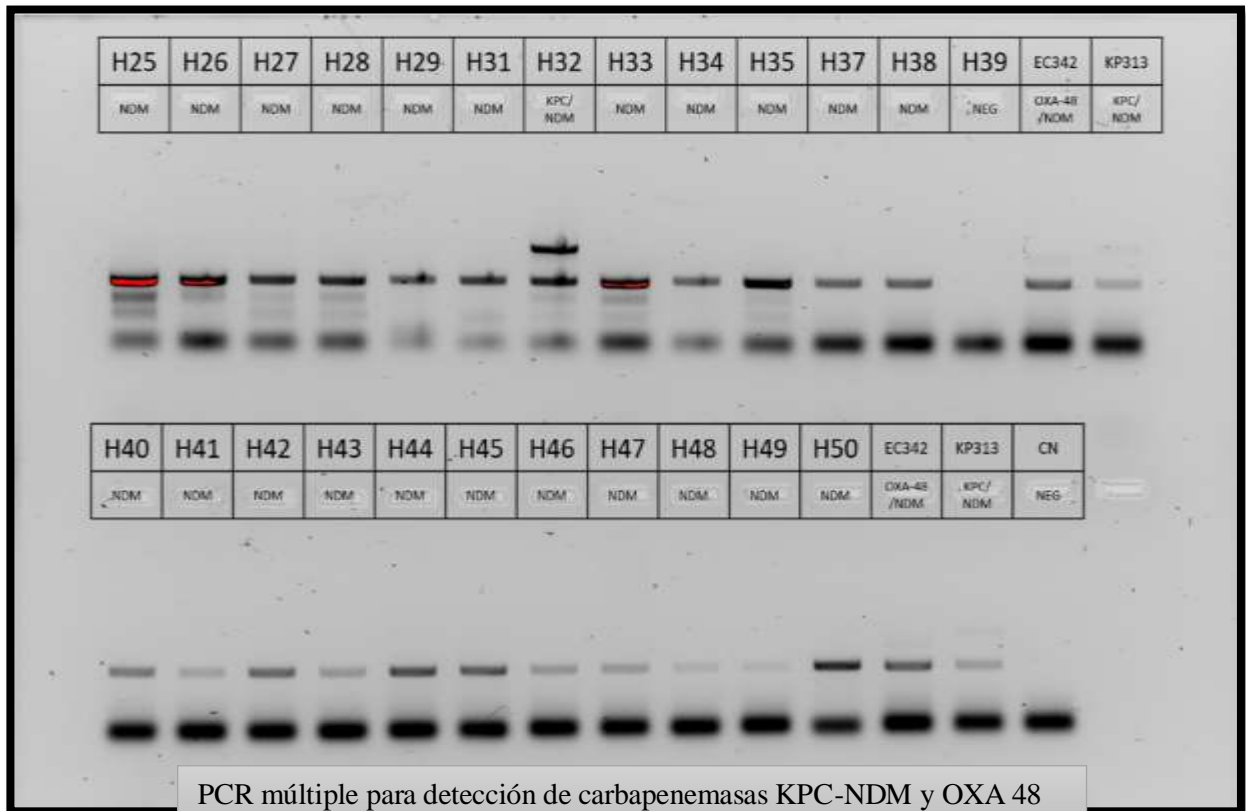
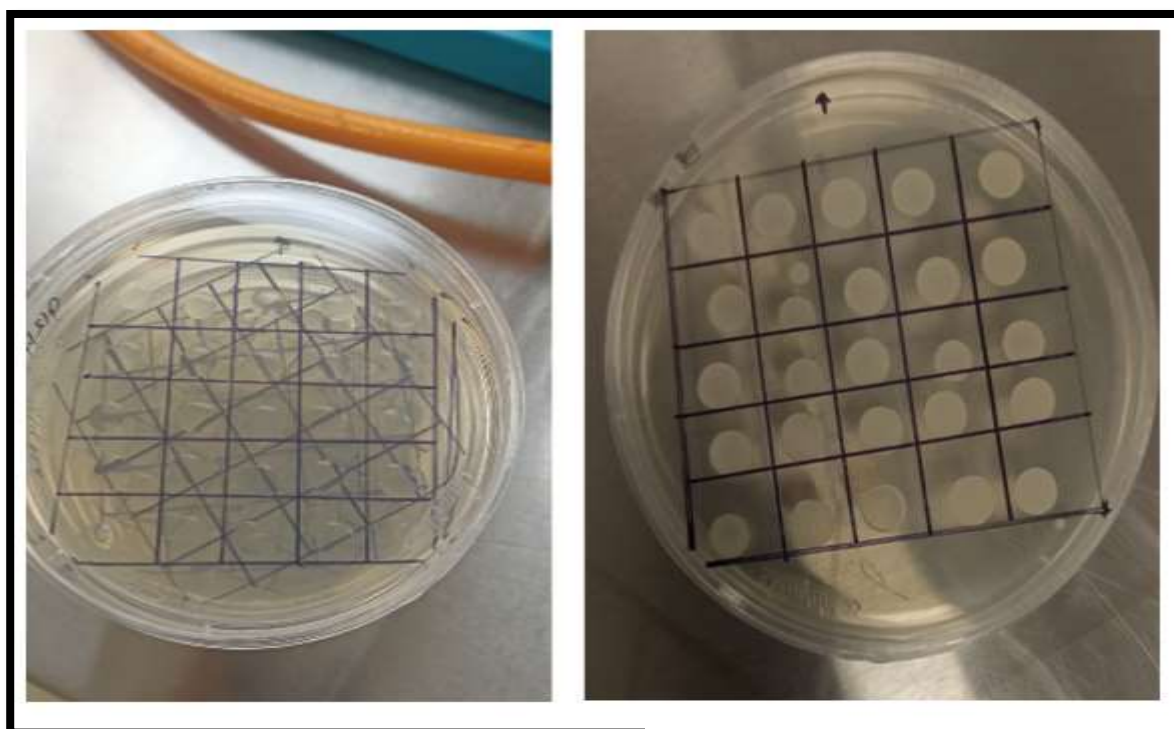


Foto 4.

Foto 5.

*Klebsiella pneumoniae* 700603Cepa de estudio *Proteus mirabilis* productora de NDM

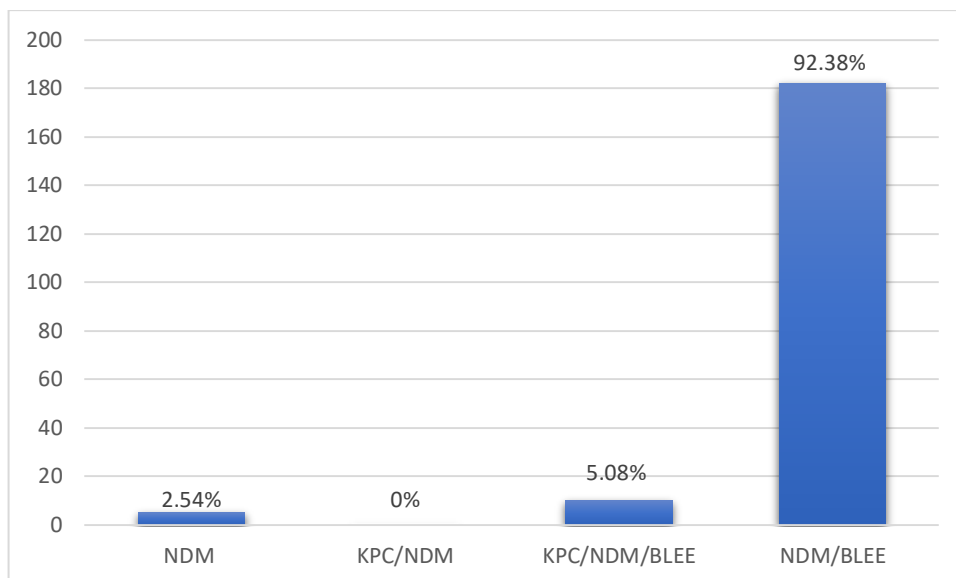
Foto 6.



Placas de Mueller Hinton con ATM/AVI recién inoculadas

Crecimiento en placa Mueller Hinton con ATM/AVI 0.03 mg/l

Anexo 8. Distribución de Enzimas carbapenemasas y betalactamasas de espectro extendido observadas en Enterobacterales de pacientes hospitalizados. 2022.



● 16% de similitud general

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 15% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

FUENTES PRINCIPALES

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	repositorio.uwiener.edu.pe Internet	2%
2	cybertesis.unmsm.edu.pe Internet	2%
3	repositorio.ug.edu.ec Internet	1%
4	uwiener on 2023-05-18 Submitted works	<1%
5	core.ac.uk Internet	<1%
6	hdl.handle.net Internet	<1%
7	researchgate.net Internet	<1%
8	fdocuments.ec Internet	<1%