



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

Patrón de clonalidad en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021

Para optar el Título Profesional de
Licenciada en Tecnología Médica en Laboratorio Clínico y Anatomía
Patológica

Presentado por:

Autora: Ramírez Huamaní, Lizzy Judith

Asesor: Dr. Benites Azabache, Juan Carlos

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7632-7593>

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 |

Yo, Lizzy Judith Ramírez Huamaní egresada de la Facultad de Ciencias de la Salud y Escuela Académica Profesional de Tecnología Médica/ Escuela de Posgrado de la Universidad privada Norbert Wiener

Declaro que el trabajo académico: “PATRÓN DE CLONALIDAD EN AISLAMIENTOS DE ACINETOBACTER BAUMANNII RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS PROVENIENTES DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO, 2021”

Asesorado por el docente: Dr. Juan Carlos Benites Azabache DNI 25587488 ORCID 0000-0001-7632-7593 tiene un índice de similitud de 15 (quince) % con código oid:14912:302280968 verificable 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.




.....
 Bach. Lizzy Judith Ramírez Huamaní
 DNI: 46285276




Dr. Juan Carlos Benites Azabache
 DNI: 25587488

Lima, 30 de junio del 2024

DEDICATORIA

A Dios por guiar mi camino y darme sabiduría, paciencia, salud y fuerzas para seguir adelante cuando más lo necesitaba.

A mis padres, quienes han sido mi pilar emocional y moral en cada etapa de mi vida y por supuesto a lo largo de toda mi carrera, su dedicación y amor han sido la fuerza impulsora detrás de cada logro. Este trabajo está dedicado a ustedes, quienes han sido mi inspiración detrás de cada meta alcanzada y lo seguirán siendo por siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Helí Barrón Pastor

Docente de la Facultad de Medicina de San Fernando y miembro del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición; por las facilidades que me dio para poder realizar parte de mi trabajo en las instalaciones del laboratorio de investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y por compartir sus amplios conocimientos. Su colaboración y contribuciones han enriquecido significativamente mi investigación.

Al Dr. Juan Carlos Benites Azabache

Director de la EAP. Tecnología Médica de la Universidad Norbert Wiener, por aceptar ser mi asesor y apoyarme con su asesoramiento.

Al Lic. Carlos Suarez Rojas

Tecnólogo Médico del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Dos de Mayo, por poner la primera piedra en la construcción y desarrollo de este trabajo de tesis, y por haber podido contar con su apoyo cada vez que lo requería por más mínimo que fuese.

Un agradecimiento especial para

Todas esas personas que de alguna u otra manera me apoyaron y pusieron un grano de arena, ya sea con algún consejo o simplemente con alguna palabra de aliento que me ayudase a no rendirme y poder cumplir esta meta que tenía pendiente. Espero poder retribuirles en algún momento de la misma forma que ellos lo hicieron conmigo

ÌNDICE

CAPITULO I: EL PROBLEMA

| | |
|--|---|
| 1.1 Planteamiento del problema | 1 |
| 1.2 Formulaci3n del problema | 3 |
| 1.2.1 Problema general | 3 |
| 1.2.2 Problemas especÌficos | 3 |
| 1.3 Objetivos de la investigaci3n | 3 |
| 1.3.1 Objetivo general | 3 |
| 1.3.2 Objetivos especÌficos | 3 |
| 1.4 Justificaci3n de la investigaci3n | 4 |
| 1.4.1 Te3rica | 4 |
| 1.4.2 Metodol3gica | 4 |
| 1.4.3 Pr3ctica | 5 |
| 1.5 Delimitaciones de la investigaci3n | 5 |
| 1.5.1 Temporal | 5 |
| 1.5.2 Espacial | 5 |
| 1.5.3 Recursos | 5 |

CAPITULO II: MARCO TEORICO

| | |
|--------------------------|----|
| 2.1 Antecedentes | 6 |
| 2.2 Bases te3ricas | 9 |
| 2.3 Hip3tesis | 15 |

CAPITULO III: METODOLOGIA

| | |
|---|----|
| 3.1 M3todo de la investigaci3n | 15 |
| 3.2 Enfoque de la investigaci3n | 15 |
| 3.3 Tipo de investigaci3n | 15 |
| 3.4 Dise1o de la investigaci3n | 15 |
| 3.5 Poblaci3n, muestra y muestreo | 16 |
| 3.6 Variables y operacionalizaci3n | 16 |
| 3.7 T3cnicas e instrumentos de recolecci3n de datos | 18 |
| 3.7.1 T3cnica | 18 |

| | |
|---|----|
| 3.7.2 Descripción de instrumentos | 18 |
| 3.7.3 Validación | 18 |
| 3.7.4 Confiabilidad | 19 |
| 3.8 Procesamiento y análisis de datos | 19 |
| 3.9 Aspectos éticos | 21 |

CAPITULO IV: PRESENTACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 4.1 Resultados..... | 22 |
| 4.1.1 Análisis descriptivo de resultados | 22 |
| 4.1.2 Discusión de resultados | 27 |

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

| | |
|---------------------------|----|
| 5.1 Conclusiones | 30 |
| 5.2 Recomendaciones | 31 |

| | |
|-------------------|----|
| REFERENCIAS | 32 |
|-------------------|----|

| | |
|-------------|----|
| ANEXOS..... | 37 |
|-------------|----|

Anexo 1: Matriz de consistencia

Anexo 2: Instrumento

Anexo 3: Aprobación del comité de ética del hospital de referencia

Anexo 4: Carta de aprobación del hospital de referencia

Anexo 5: Informe del asesor (Túrnitin)

INDICES DE TABLAS

Tabla 1. Preparación del master mix PCR BIO Taq Mix Red

Tabla 2. Secuencia de primers (REP-PCR)

Tabla 3. Perfil de susceptibilidad de *A. baumannii*

Tabla 4. Frecuencia por tipo de muestra

Tabla 5. Asociación entre grupos clonales y perfil de resistencia de *A. baumannii*

RESUMEN

Las infecciones asociadas a la atención en salud causadas por *Acinetobacter baumannii*. han ido en aumento, así como su resistencia a los antimicrobianos. Esta bacteria es prevalente en las unidades de cuidados intensivos generando diversas infecciones tales como bacteriemia, infecciones urinarias y neumonía.

Objetivo: Identificar los patrones de clonalidad de aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.

Materiales y métodos: Estudio de tipo analítico, cuantitativo, de diseño descriptivo y observacional de corte transversal. La población de estudio fue conformada por 54 aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos obtenidos de muestras recolectadas durante el primer semestre del año 2021. Se empleó una ficha simple para recolectar datos relacionados al perfil de susceptibilidad, este instrumento no requirió la aplicación de pruebas de validez ni confiabilidad, dado que no fue utilizado en personas. La información fue extraída exclusivamente a través de la observación.

Resultados: La investigación revela la presencia de seis grupos clonales en el hospital nacional de referencia, destacando un elevado grado de similitud y la predominancia de un grupo clonal más extenso, denominado clon A1, distribuido en las cuatro unidades de cuidados intensivos. Además, se observa una marcada resistencia antibiótica en los aislamientos analizados, evidenciando una notable resistencia a diversos antibióticos, mientras que se registra una sensibilidad del 100% frente a colistina. En consecuencia, se notifica una presencia significativa de aislamientos extremadamente resistentes (XDR), los cuales están asociados a los clones identificados en el estudio.

Conclusiones: Se observó un aumento en la aparición de grupos clonales entre marzo y mayo, especialmente en las UCI B y C, sugiriendo posible transmisión cruzada debido a la proximidad geográfica de estas unidades. Los resultados respaldan la relevancia de *A. baumannii* en neumonías asociadas a ventilación mecánica, evidenciado por la predominancia de muestras respiratorias, principalmente aspirado bronquial. Sin embargo, se señala como limitación la falta de datos clínicos de los pacientes. Además, se destaca la resistencia a múltiples antibióticos en los aislamientos, subrayando la necesidad de promover el uso racional de antimicrobianos y la adopción de medidas para controlar las infecciones y prevenir la propagación de aislamientos extremadamente resistentes en el entorno hospitalario.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, patrones de clonalidad, grupo clonal, REP-PCR, transmisión cruzada

ABSTRACT

Healthcare-associated infections caused by *Acinetobacter baumannii*. have been on the rise, as well as their resistance to antimicrobials. This bacterium is prevalent in intensive care units, generating various infections such as bacteremia, urinary tract infections and pneumonia.

Objective: To identify the clonality patterns of carbapenem-resistant *A. baumannii* strains isolated from the Intensive Care Unit of the Dos de Mayo National Hospital, 2021.

Materials and methods: Analytical, quantitative study, with a descriptive and observational cross-sectional design. The study population was made up of 54 carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates obtained from samples collected during the first half of 2021. A simple data collection form related to the susceptibility profile was used; this instrument did not require the application of validity or reliability tests; given that it was not used in people. The information was extracted exclusively through observation.

Results: The research reveals the presence of six clonal groups in the national referral hospital, highlighting a high degree of similarity and the predominance of a larger clonal group, called clone A1, which is distributed in the four intensive care units. In addition, a marked antibiotic resistance was observed in the isolates analyzed, evidencing a notable resistance to various antibiotics, while a sensitivity of 100% against colistin was recorded. Consequently, a significant presence of extremely resistant isolates (XDR) is reported, which are associated with the clones identified in the study.

Conclusions: An increase in the occurrence of clonal clusters was observed between March and May, especially in ICUs B and C, suggesting possible cross-transmission due to the geographic proximity of these units. The results support the relevance of *A. baumannii* in pneumonias associated with mechanical ventilation, evidenced by the predominance of respiratory samples, mainly bronchial aspirate. However, the lack of clinical data on patients is pointed out as a limitation. In addition, resistance to multiple antibiotics in isolates is highlighted, underlining the need to promote the rational use of antimicrobials and the adoption of measures to control infections and prevent the spread of extremely resistant isolates in the hospital environment.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, clonality patterns, clonal group, REP-PCR

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii como patógeno nosocomial emergente, está causando una gran preocupación en el sector sanitario, por su capacidad de desarrollar resistencia a varios medicamentos, además de su rápida propagación lo que representa una incidencia significativa como patógeno oportunista y causante de muerte en unidades críticas. Este estudio emplea la técnica REP-PCR para identificar los patrones de clonalidad de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos.

La comprensión de diversidad genómica e identificación de posibles rutas de transmisión son fundamentales para abordar eficazmente la propagación de esta bacteria multirresistente, por ello en el capítulo 2 se mencionan antecedentes internacionales y nacionales, haciendo mayor énfasis en los antecedentes internacionales ya que no existen muchos estudios a nivel nacional donde se haya aplicado esta técnica molecular en cepas de *Acinetobacter*. Además, se explica brevemente acerca de los mecanismos de resistencia de esta bacteria.

En el capítulo 3 se menciona acerca de la metodología de investigación usada, además del tamaño muestral. También se mencionan las técnicas moleculares utilizadas y se describen a detalle cada uno de los procedimientos realizados.

En el capítulo 4 se presentan los resultados encontrados que dan respuesta a los objetivos establecidos en este estudio. En este apartado, se presenta un dendograma que ilustra los grupos clonales que existen en la unidad del hospital de referencia, además de tablas con referencia al perfil de susceptibilidad, etc.

Por último, se mencionan las conclusiones y recomendaciones, destacando que este trabajo aportará una visión más completa sobre la diseminación de *A. baumannii* en entornos hospitalarios, lo cual nos hace pensar que es importante tomar estrategias de control y prevención, para impedir la rápida diseminación bacteriana.

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Las infecciones originadas por *Acinetobacter spp.* se han incrementado últimamente; y a su vez, también aumentó la resistencia a diferentes antimicrobianos¹. *Acinetobacter baumannii* se distingue como la bacteria más frecuentemente aislada y de gran relevancia clínica en los últimos 20 años, especialmente en las unidades críticas; la cual ha generado una diversidad de infecciones, tales como bacteriemia relacionada al uso de catéter venoso, infecciones urinarias asociadas al uso de sondas uretrales y neumonía durante la ventilación mecánica^{2, 3}.

En un estudio realizado por Reyes Roque se resalta que la presencia de *A. baumannii* se detectó en la totalidad de las muestras analizadas del suelo y agua. Esto sugiere que diversos equipos médicos como: ventiladores mecánicos, tubos endotraqueales, catéteres, entre otros equipos podrían fungir como reservorios ambientales una vez son contaminados con polvo y/o agua ambiental. La contaminación cruzada de manos con microorganismos en el personal de salud ocurre en un 3 a 30%, y en el 7.5% de los casos se aisló *A. baumannii*, es así que esta bacteria puede diseminarse a través del contacto manual del personal de salud con el ambiente hospitalario. Por ello, los pacientes hospitalizados tienen una mayor propensión a ser colonizados por este microorganismo al entrar en contacto con estos equipos medicos⁴.

A nivel internacional, se ha registrado la presencia de *A. baumannii* en informes provenientes de 75 países, posicionándolo como el quinto patógeno más frecuentemente aislado en las unidades críticas, con una prevalencia del 3.7% en la región de Norteamérica⁵. En Latinoamérica, la incidencia es aún más significativa, superando el 10% de todas las bacterias aisladas asociadas a infecciones nosocomiales⁶. En el caso específico de Perú, *Acinetobacter spp.* se aisló en un preocupante 28% de los cultivos de secreciones endotraqueales en dichas unidades, con un alto perfil de resistencia antimicrobiano⁷. A nivel nacional, el análisis de la Situación Epidemiológica de las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) realizado por el Centro de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC, 2021) revela que *A. baumannii* se identifica como agente causal en un 24.9%, 32.1% y 5.53% de las infecciones del torrente sanguíneo, neumonía e infección del tracto urinario, respectivamente, en las unidades de cuidados intensivos destinadas a pacientes adultos⁸.

La capacidad de sobrevivir y la resistencia a antibióticos de *A. baumannii* son las principales características de esta bacteria. Si bien estas propiedades son comunes en diversas regiones, esta situación está influenciada por las particularidades hospitalarias, culturales y por el uso de diferentes antibióticos. Por lo tanto, resulta indispensable vigilar el incremento de la resistencia antibiótica en cada país, establecer una casuística propia y evaluar las medidas apropiadas para disminuir su propagación⁹.

El Hospital Nacional Dos de Mayo (HNDM) alberga un servicio de cuidados intensivos compuesto por cinco unidades diferenciadas. Estas incluyen la UCI A, designada para la atención de pacientes portadores de COVID-19; la UCI B, destinada como unidad general de cuidados intensivos; la UCI C, orientada a pacientes politraumatizados; la UCI D, dedicada a la atención de pacientes en cuidados intermedios; y la UCI E, especializada en cuidados intensivos pediátricos. Cabe señalar que, para este estudio, solo se consideraron muestras provenientes de las unidades de cuidados intensivos para adultos, excluyendo la UCI E. Un informe microbiológico comparativo del periodo 2015 al 2017 en Lima, realizado en este nosocomio revela que el 21.8% de los aislamientos de microorganismos en la UCI corresponden a *Acinetobacter baumannii*, posicionándose como la segunda bacteria aislada con mayor frecuencia¹¹. Sin embargo, no existen registros de estudios de clonalidad para esta bacteria, pese a que en la *Guía Técnica para la Vigilancia, Prevención y Control de Microorganismos Multirresistentes* señala la diseminación clonal como fuente moderadamente significativa, la cual puede ocurrir mediante transmisión cruzada o mediante un reservorio común¹⁰, entre las unidades comprendidas en este servicio hospitalario.

La utilización de técnicas moleculares como la Amplificación de secuencias Palindrómicas Repetitivas (REP-PCR) posibilita identificar la transmisión de clones epidémicos mediante el análisis comparativo de patrones de clonalidad. Este enfoque ofrece una evaluación más precisa, facilitando la implementación de intervenciones oportunas para prevenir una potencial propagación en las áreas críticas de este importante hospital de Lima.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuáles son los patrones de clonalidad de aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuáles son los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021?
- ¿Cuál es la distribución de los grupos clonales de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021?
- ¿Cuál es la relación entre el perfil de susceptibilidad y los grupos clonales de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021?

1.3. Objetivos de la investigación:

1.3.1. Objetivo general

Identificar los patrones de clonalidad de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.

1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.
- Determinar la distribución de los grupos clonales de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.

- Determinar la relación entre los perfiles de susceptibilidad y los grupos clonales de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1. Teórica

Esta investigación tiene como propósito caracterizar los patrones de clonalidad de *A.baumannii* y aportar al conocimiento de la epidemiología de esta bacteria, lo cual es importante para fortalecer las estrategias de control y prevención en ambientes hospitalarios y comunitarios. El análisis abordará la distribución de los clones y los perfiles de resistencia antibiótica dentro de las unidades críticas del centro hospitalario de referencia con el fin aportar conocimientos sobre la diseminación de esta bacteria y facilitar la implementación medidas para prevenir su propagación. Finalmente, el análisis de la clonalidad y su asociación con los perfiles de resistencia contribuye al entendimiento de la dinámica y la evolución de esta bacteria aportando información relacionada a la diversidad genética y su papel en la persistencia de este agente infeccioso, proporcionando las bases genético moleculares para evaluar la presencia de algún clon en específico.

1.4.2. Metodológica

La utilización de la técnica REP-PCR como instrumento de evaluación y seguimiento en la aparición de clones epidémicos, es una buena opción ya que es una técnica simple y de fácil implementación en el laboratorio. Esta técnica molecular permite diferenciar y agrupar las cepas según su similitud genética para determinar sus patrones de clonalidad. Asimismo, se han determinado los patrones de resistencia antibiótica predominantes. La implementación de estas técnicas en estudios posteriores, permitirá el uso de REP-PCR en los laboratorios de biología molecular como herramienta de evaluación molecular, facilitando la evaluación de la significancia de los patrones de clonalidad identificados, contribuyendo con las estrategias de control y tratamiento de infecciones hospitalarias. Finalmente, este método molecular permitirá tener una aproximación más cercana a la identificación clonal estos aislamientos.

1.4.3. Práctica

Esta investigación se lleva a cabo en respuesta a la necesidad de optimizar las medidas de prevención y control de brotes en las unidades críticas donde existe mayor riesgo de transmisión cruzada por microorganismos resistentes. Estos resultados podrán ayudar a concientizar al personal que trabaja en el sector salud, sobre la importancia de aplicar las medidas de prevención y control de brotes, lo que permitirá una evaluación más objetiva que genere intervenciones rápidas, oportunas y certeras para prevenir la diseminación de este microorganismo.

1.5. Delimitaciones de la investigación

1.5.1. Temporal

La investigación se realizó en 2023 utilizando aislamientos de *A.baumannii* recolectados en 2021.

1.5.2. Espacial

Parte del estudio se desarrolló en el servicio de Microbiología y Biología Molecular del Laboratorio “Oswaldo Hercelles” perteneciente al Hospital Nacional Dos de Mayo. Los análisis moleculares se llevaron a cabo con el apoyo de investigadores del laboratorio I-2 del grupo de Investigación y Docencia en Medicina Molecular (MEDMOL) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

1.5.3. Recursos

La investigación fue realizada por la tesista en estrecha coordinación con el equipo del servicio de microbiología, quienes facilitaron las cepas a analizar, y con investigadores del Grupo de MEDMOL para el análisis molecular y estadístico. Dado que el estudio fue financiado por la tesista, no incurrió en costos adicionales en recursos humanos.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Antecedentes Internacionales:

En 2022, Selim Samy y colaboradores realizaron un estudio en Arabia Saudita, con la finalidad de “*tipificar y explorar molecularmente elementos de resistencia a carbapenémicos en A.baumannii*”. Este fue un estudio transversal que se efectuó durante diciembre del 2021 e incluyó un total de 86 aislamientos obtenidos de pacientes del Hospital Prince Mutaib Bin Abdulaziz. Se utilizó el sistema VITEK para la identificación y el antibiograma, además se realizó amplificación por medio de PCR para la identificación de genes como blaVIM1 y blaVIM2. También se realizó la tipificación molecular mediante REP-PCR y adicionalmente se hizo un estudio de modelado molecular donde se observó la afinidad de unión de imipenem al sitio de unión de la betalactamasa OXA. Se encontró que ciprofloxacino fue el antibiótico más eficaz, imipenem tuvo el mayor nivel de resistencia. Usando REP PCR se evidenció que los aislamientos se distribuyeron en 5 grupos clonales: A, B, C, D y E con tasas de distribución de 45.5%, 26%, 19.5%, 5.2% y 3.9% respectivamente. Los autores concluyen en que hay una amplia gama de genes que codifican para imipenem en el hospital de estudio por lo que se destaca la necesidad de prevenir y controlar la propagación de *A. baumannii*¹².

Zeighami H. et al., (2019) realizaron un estudio con el fin de “*determinar la formación de biopelículas, la presencia de genes relacionados con la biopelícula, caracterizar integrones y la tipificación molecular basada en REP-PCR de A.baumannii*”. Se utilizó 100 aislamientos provenientes de diversos tipos de muestra de las unidades críticas. La identificación de los aislamientos se realizó con pruebas fenotípicas y la detección del gen bla_{oxa-51}. El antibiograma se realizó mediante disco difusión y fue interpretado mediante las especificaciones del CLSI. Los integrones fueron detectados mediante PCR multiplex. Para el REP PCR se utilizó 2 cebadores y se clasificaron en grupos, considerándose de un mismo grupo cuando se tiene hasta 2 bandas diferentes siendo perfiles idénticos o muy similares. Se obtuvo la mayor resistencia frente a ciprofloxacino e imipenem. Los patrones de clonalidad obtenidos se clasificaron en 8 tipos y 21 subtipos, encontraron que 23% de los aislamientos tenían una relación clonal. Los autores concluyen que la tipificación molecular es importante para hallar la relación genética y también epidemiológica por lo que el poder discriminatorio de

REP PCR es alto, además se demostró que existe una alta frecuencia de *A. baumannii* XDR en pacientes de la UCI¹³.

Snyman Yolandi, et al., (2019) realizaron una investigación para “*describir la resistencia a la colistina y la variabilidad molecular de A. baumannii* resistentes a colistina aislados de muestras de pacientes en el Cabo Occidental de Sudáfrica”. Se utilizó el sistema automatizado VITEK para la realización del antibiograma, incluida la detección de la resistencia a colistina, la cual se confirmó mediante microdilución en caldo y SensiTest. La tipificación de las cepas se realizó mediante REP-PCR, a la par se hizo la secuenciación integral del genoma en parte de los aislamientos para identificar los genes asociados a la resistencia de colistina y la diversidad de cepas utilizando MLST y análisis de polimorfismo de nucleótido único por parejas. En cuanto a los resultados se encontraron 32 aislados resistentes a colistina en función a la susceptibilidad del VITEK de los cuales se discriminaron en 26 aislados resistentes y 6 aislados sensibles a colistina por microdilución en caldo. Además, descubrieron que 13 aislados resistentes a colistina y 8 sensibles fueron idénticos por REP-PCR y MLST, todos provenientes de pacientes ingresados en un hospital terciario durante 2017, los demás aislados no estaban relacionados. Concluyeron que el incremento de aislados de *A. baumannii* colistin resistentes es al parecer, producto de una expansión clonal de una cepa emergente resistente a este antibiótico¹⁴.

Baharak K y colaboradores (2018) desarrollaron una investigación con el objetivo de “*determinar los tipos moleculares similares entre las especies aisladas de A. baumannii mediante REP-PCR*”. Se realizó en un total de 350 muestras clínicas de diferentes hospitales de Teheran, en las cuales se identificó 120 especies de *Acinetobacter spp.* Al evaluar la especie se identificó 100 (76,9 %) aislamientos como *A. baumannii*, 13 (11%) como *A. lwoffii*, y 7 (6%) como otras especies de *Acinetobacter*. La mayoría de los aislados pertenecían a la UCI. Luego se realizó el antibiograma con 11 discos antibióticos, pero evaluando cefepime y ceftazidima mediante microdilución en caldo, observándose que se obtuvo una mayor resistencia a cefepime y ceftazidima y una mayor sensibilidad a polimixina B. El genoma de los aislamientos se extrajo mediante el método de ebullición modificada y se amplificó usando cebadores específicos mediante REP-PCR, el uso de esta técnica evidencio que existían 9 patrones de clonalidad diferentes que fueron agrupados en grupos de A hasta la I, donde existía una población máxima (36%) del grupo A. Concluyeron que existen altas similitudes entre los aislados de *A. baumannii* de los diferentes hospitales,

esto podría deberse a que exista una diseminación de la bacteria mediante equipos médicos o por parte del personal de salud¹⁵.

Antecedentes Nacionales:

Galarza y Vargas (2021). Desarrollaron un trabajo con el fin de “*identificar los genes asociados a la resistencia de carbapenémicos y analizar la asociación clonal de A.baumannii provenientes de neonatos de un hospital de Lima durante los años 2018-2019*”. Se evaluó la sensibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer, excepto la sensibilidad a la colistina que fue evaluada con micro titulación en caldo. Además, se detectaron los genes de resistencia mediante PCR multiplex y la asociación clonal se obtuvo por REP-PCR. Hallaron que un 92% de las cepas resultaron XDR y 8% PDR. Se encontró 3 patrones de clonalidad en total, de los cuales 80% pertenecían al mismo patrón. Los autores concluyen que existe un brote de *A.baumannii* XDR durante los años 2018 -2019, subrayando la necesidad de aumentar las intervenciones de control en los trabajadores de la UCI neonatal de este hospital con el fin de contener la diseminación de esta bacteria¹⁷.

Fernández y Moreno. (2019). Efectuaron un estudio con el propósito de “*conocer el Patrón de clonalidad mediante REP y ERIC – PCR de A. baumannii aislados de pacientes del Hospital Regional Lambayeque*”. Fue un trabajo prospectivo transversal y descriptivo donde se empleó una ficha clínico-epidemiológica con los datos de los pacientes portadores de la bacteria. La obtención del dendograma se realizó mediante PCR utilizando primers para REP y ERIC. En esta investigación, se aislaron 24 cepas de *A. baumannii* a partir de muestras de secreción bronquial de pacientes en los servicios críticos. Veinte cepas se agruparon en 5 grupos clonales con una similitud superior al 88%. Los grupos identificados fueron organizados según los días de hospitalización, el servicio de origen y la probabilidad de infección, la cual se evaluó en función de la calidad de la muestra. Esta calidad fue determinada utilizando los criterios establecidos por una guía de la Sociedad Española. Los criterios, junto con otros factores evaluados, permitió diferenciar entre infecciones y colonizaciones. Todos los aislamientos resultaron ser MDR o XDR. En conclusión, se identificaron múltiples clones que se comportan como microbrotes diseminados en los diferentes servicios de la UCI, lo que demuestra el papel crucial de *A. baumannii* en las infecciones y colonizaciones en este entorno hospitalario.¹⁶.

2.2 Bases teóricas

Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS)

Las infecciones implican la proliferación y diseminación de patógenos en el organismo, estos pueden ser bacterias, virus, hongos u otros. Las infecciones pueden empezar en cualquier parte del cuerpo y en ocasiones se difunden por todo el organismo¹⁸. Se estima que afectan entre el 5-10% de usuarios e implican una alta morbi-mortalidad y un gran importe económico. Las infecciones que derivan de la asistencia sanitaria como los procesos invasivos, son: infección respiratoria, intraabdominal o quirúrgica y urinaria¹⁹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las IAAS como aquellas que se manifiestan en pacientes hospitalizados o que se atendieron en otro centro de salud, y cuyo proceso infeccioso no estaba en fase de incubación ni se evidenciada al momento de la admisión. Esto abarca las infecciones adquiridas en el nosocomio, que aparecen luego del alta e infecciones laborales en el personal de salud²⁰. Según la OMS, son distintas causas que generan la infección de usuarios internados, por ejemplo: la baja de las defensas inmunitarias, el aumento de procedimientos médicos, técnicas invasivas que facilitan vías de infección y la propagación de patógenos resistentes a los fármacos en lugares cerrados, donde las prácticas inadecuadas de control de infecciones pueden favorecer la propagación.¹⁹.

Existen tipos específicos de IAAS asociados principalmente a unidades de cuidados intensivos (UCI). Entre ellos, se destaca la neumonía, una infección pulmonar aguda que afecta las vías respiratorias y estructuras vasculares, causada por diversos patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos²⁰. En nuestro país, la incidencia de este tipo de IAAS ha experimentado un aumento considerable, alcanzando el 55% de los casos notificados durante el primer trimestre de 2021⁸. Otra IAAS frecuente es la infección del torrente sanguíneo (ITS), definida como uno o más hemocultivos positivos acompañados de signos sistémicos de infección, como fiebre, escalofríos y/o hipotensión²¹. La bacteriemia, caracterizada por la presencia de fiebre, puede desencadenar el choque séptico, una complicación potencialmente letal vinculada a esta infección.

La infección del tracto urinario (ITU) se define como la presencia de organismos infecciosos en las vías urinarias. El uso de catéteres urinarios o sondas vesicales en pacientes hospitalizados y/o en estado crítico aumenta la predisposición a las ITUs

nosocomiales^{22,23}. Las infecciones del sitio operatorio (ISO) también son recurrentes en entornos hospitalarios a nivel mundial, y diversos factores de riesgo, como enfermedades preexistentes (por ejemplo, diabetes, tabaquismo), así como el estado hemodinámico, respiratorio y hematológico, pueden influir en el proceso de cicatrización de las heridas²⁴.

La relevancia de *A.baumannii* esta principalmente en su capacidad para desarrollar resistencias y multiresistencias a los antibióticos. Además, la exposición antibiótica en los hospitales favorece la presencia de cepas resistentes, lo que las convierte en organismos endémicos que pueden persistir en un centro hospitalario por años. En algunos casos, las cepas endémicas pueden ser introducidas por un paciente colonizado, y diseminarse a otros pacientes y/o áreas del hospital. Para evitar ello es necesario adoptar medidas de control recomendadas por diversas literaturas, como: monitoreo epidemiológico, aislamiento y separación de cohortes de pacientes colonizados, programas anuales de limpieza ambiental y formación continua del personal de salud en técnicas adecuadas de lavado de manos.^{25,26}.

Acinetobacter baumannii

A.baumannii, es un coco-bacilo gram negativo, aerobio estricto, no fermenta carbohidratos, catalasa positiva, oxidasa negativa, inmóvil y agente causal de morbimortalidad infecciosa especialmente en pacientes hospitalizados en UCI²⁷. *A. baumannii* es un microorganismo ubicuo que habita con frecuencia en la naturaleza agua y suelos. Sin embargo, no actúa como colonizador en la comunidad. En cambio, esta bacteria se traslada y afecta a individuos en condiciones críticas o debilitados por comorbilidades. Es un patógeno usual en las unidades de cuidados intensivos debido a su capacidad de adherirse y persistir en equipos médicos e incluso en las manos de los trabajadores de salud. Además, suele ser resistente a desinfectantes de bajo o medio nivel.²⁸.

Mecanismos de resistencia

- Resistencia intrínseca

A. baumannii tiene una cefalosporinasa tipo AmpC llamada cefalosporinasa derivada de *Acinetobacter*(ADC), que constituye el mecanismo propio de resistencia de esta bacteria a los antibióticos β -lactámicos. Alrededor del 50% de las *A. baumannii* manifiestan una sobreproducción de ADC, esto se atribuye a las secuencias de inserción que contienen promotores que benefician la transcripción de los genes

ISAbal e ISAbal25. Otro mecanismo intrínseco de resistencia se basa en el gen bla-OXA-51_{like}, cuya expresión resulta en una débil hidrólisis de penicilinas y carbapenémicos. Es por ello que la resistencia a carbapenémicos está vinculada a la hiperproducción de oxacilinasas, un proceso mediado por el gen ISAbal²⁹.

- Resistencia adquirida

Los mecanismos de resistencia a este conjunto de antibióticos involucran mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros consisten en la degradación del β-lactámico mediada por varios tipos de β-lactamasas como las de clase A, B o D, de acuerdo con la clasificación de Ambler. *Acinetobacter* produce betalactamasas de clase A y B, aunque su aparición es muy poco frecuente. Por otro lado, la clase D es la más común, siendo las principales variantes OXA-24, OXA-23, OXA-48 y OXA-51. Estas enzimas son codificadas principalmente por plásmidos, a excepción de OXA-51, que se encuentra en el cromosoma. Los segundos incluyen la alteración de las proteínas de membrana externa denominadas OMPs (outer membrane proteins), bombas de expulsión y la alteración de las proteínas de unión a penicilina o PBPs (penicillin binding protein), cuando son blanco del medicamento^{29,30}.

Técnicas moleculares para estudios epidemiológicos

Existen diversas técnicas que nos ayudan en el diagnóstico y tipificación molecular en patógenos humanos. Entre los cuales encontramos:

El **análisis de plásmidos** fue una de las técnicas moleculares muy utilizadas en las décadas de 1970 y 1980 para investigar brotes epidémicos. Sin embargo, en la actualidad, su uso con este propósito es limitado, debido a la incorporación de otras técnicas más avanzadas y a las restricciones que presenta. Este método clasifica a las bacterias según la presencia o ausencia de plásmidos. La técnica implica la extracción de ADN plasmídico mediante un proceso de lisis alcalina. Es importante interpretar los perfiles plasmídicos idénticos o muy similares con precaución, ya que no siempre indican un vínculo epidemiológico entre ellos³¹.

En 1984 Schwartz y Cantor desarrollaron un sistema denominado **Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)** esta técnica permite la separación de fragmentos grandes de ADN, superiores a los 10 kpb. En esta técnica, luego de la extracción del ADN, se corta con enzimas de restricción y se separa de acuerdo a su peso molecular³².

El **análisis de ADN mediante secuenciación** o Tipificación por Secuenciación Multilocada (MLST) es una técnica para clasificar microorganismos que se basa en la secuenciación de varios genes específicos, los cuales se comparan con esquemas predefinidos para cada especie. Este método permite identificar factores de virulencia y resistencia a los antibióticos, así como realizar un análisis pangenómico comparativo de los aislados³³.

La **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** es una de las técnicas moleculares con mayor utilidad y usada en la actualidad. Esta técnica amplifica secuencias de ADN, la cual luego podrá ser visualizada mediante una electroforesis en gel o clonarse en un plásmido para experimentos posteriores³⁴. Esta técnica requiere un ADN polimerasa termoestable: la polimerasa Taq, Además de primers de ADN hechos específicamente para la región del genoma a interés. La reacción se da a través de ciclos de temperatura que logran producir muchas copias de la región objetivo^{35,36}. Existen diversas técnicas aplicadas, las cuales se sustentan en el empleo de distintos primers, como los PCR con primers arbitrarios o secuencias repetitivas del DNA bacteriano. Para *A.baumannii* las técnicas usualmente empleadas son: ERIC- PCR (Secuencias consenso intergénicas repetitivas de Enterobacterias) y REP-PCR (amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos)⁴⁰.

- **Amplificación de Elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos (REP-PCR)**

Las técnicas de tipificación molecular, como REP-PCR, posibilita el rastreo y la demostración de la presencia de aislamientos endémicos producidos de una infección hospitalaria, la aparición de brotes y posibles reservorios³⁷. REP-PCR es una técnica simple (no necesita enzimas de restricción, ni técnicas de electroforesis especiales), rápida y relativamente de bajo costo³⁸. Esta técnica requiere primers que se unen con secuencias repetitivas específicas de DNA bacteriano (secuencias rep). Hay tres tipos de familias de secuencias rep: las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP), las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC), y las secuencias o elementos BOX¹². La secuencia de REP altamente conservada es de aproximadamente 35 oligonucleótidos, incluye una repetición invertida y puede ocurrir en el genoma individualmente o como múltiples copias adyacentes³⁹. Se pueden identificar dos métodos para clasificar y distinguir patrones de clonalidad. El primero implica la evaluación visual de las bandas presentes en los patrones de clonalidad. Se

considera que dos patrones de clonalidad son "indistinguibles" si no muestran diferencias en sus bandas. Si dos patrones de clonalidad difieren en 2 a 3 bandas, se denominan "cepas estrechamente relacionadas". Se establece una relación entre clonas cuando la diferencia es de 4 a 6 bandas, y se considera que no están relacionadas si la diferencia es de 7 bandas o más⁴⁰. El segundo método consiste en la agrupación y formación de grupos clonales mediante la construcción de un dendrograma. En este enfoque, se utiliza el índice de similitud de Sorensen-Dice para distinguir clonas que son idénticas, relacionadas o no relacionadas. Este índice proporciona una medida cuantitativa de la similitud entre los conjuntos de bandas, facilitando así la agrupación y clasificación de los patrones de clonalidad.

2.3 Formulación de hipótesis

No se formularon hipótesis, por ser un estudio descriptivo.

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación

Analítico, ya que se examina un hecho específico para determinar su importancia y la relación entre ello⁴¹.

3.2. Enfoque de la investigación

Es cuantitativo, ya que se fundamenta en un enfoque empírico-deductivo, empleando procedimientos estrictos, métodos experimentales y técnicas de recopilación de datos estadísticos⁴².

3.3. Tipo de investigación

Aplicada, debido a que su objetivo es ofrecer soluciones a situaciones específicas y reconocibles⁴³.

3.4. Diseño de la investigación

Diseño: Observacional y transversal.

Nivel: Descriptivo, ya que tiene como objetivo medir y/o recopilar información, de forma individual o combinada, sobre las variables mencionadas ⁴².

3.5. Población, muestra y muestreo

Población: Todos los aislamientos de *A.baumannii* obtenidos del repositorio de muestras del laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.

Unidad de estudio: Aislamientos de *A baumannii*.

Unidad de análisis: Cada uno de los aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos.

Unidad de muestreo: Cada aislamiento de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos.

Muestra: Inicialmente se recolectaron un total de 60 aislamientos de *A. baumannii* que cumplían con los criterios de inclusión. Dichos aislamientos fueron obtenidos de muestras recopiladas entre enero y julio de 2021, seleccionadas del repositorio del laboratorio perteneciente al hospital de referencia. No obstante, se procedió a trabajar con 54 aislamientos, ya que se identificaron 6 aislamientos duplicados.

Muestreo: No probabilístico de casos consecutivos de aislamientos de *A. baumannii*.

Criterios de inclusión

- Aislamientos que provengan de muestras de vías respiratorias, sangre y puntas de catéter.
- Aislamientos provenientes de muestras tomadas los pacientes adultos en las unidades de cuidados críticos.
- Aislamientos obtenidos el primer semestre del 2021.
- Aislamientos que presenten resistencia a carbapenémicos.

Criterios de exclusión

- Aislamientos que no se encontraron viables al momento del estudio.
- Aislamientos duplicados.

3.6. Variables y operacionalización

3.6.1. Variables

- Variable 1: Patrones de clonalidad de cepas de *A. baumannii*
- Variable 2: Resistencia a carbapenémicos.

3.6.2. Operacionalización de variables

| Variable | Definición operacional | Dimensión | Indicador | Escala de Medición | Escala valorativa |
|-------------------------|---|-----------------|---|-----------------------|--|
| PATRONES DE CLONALIDAD | Bandas de ADN amplificadas mediante REP-PCR de <i>A. baumannii</i> . | Amplicones | Bandas amplificadas mediante electroforesis | Cualitativa nominal | - Presencia de bandas: 1 - Ausencia de bandas: 0 |
| | | Grupos clonales | Frecuencia relativa (%) de las clonas predominantes | Cualitativa nominal | - Idénticas: Similitud de 95% a 100% - Relacionados: Similitud de 89% a 94% - No relacionados: Similitud de <89% |
| PERFILES DE RESISTENCIA | Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>A. baumannii</i> , interpretados según puntos de corte dados en CLSI M100, 33rd edition, 2023. | Antibióticos | Microdilución en caldo (MIC) | Cuantitativa de razón | - Sensible (S) - Intermedio (I) - Resistente (R) |

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

Como técnicas metodológicas se usaron la observación, para obtener la data referente a los aislamientos obtenidos, su perfil de susceptibilidad, así como para determinar el patrón clonalidad. En cuanto a las técnicas de laboratorio, se empleó REP-PCR con el fin de determinar los patrones de clonalidad de los aislamientos de *A.baumannii*.

Para ello, se inició con el proceso de extracción de ADN bacteriano, usando un kit comercial que usa placas con perlas magnéticas, en un equipo semi-automatizado. En seguida, se dió la etapa de replicación de las regiones REP del ADN bacteriano mediante la técnica de REP-PCR utilizando un kit comercial y un termociclador. Finalmente, se procedió al revelado de las mediante la electroforesis.

3.7.2. Descripción de instrumentos

Se usó una ficha de recolección de datos como instrumento metodológico, en la cual se registraron los indicadores del estudio de la variable “Perfil de susceptibilidad”. La información consignada en dicha ficha provino de la base de datos del laboratorio de referencia, la cual está gestionada a través del sistema IrisLab. (Anexo 2)

3.7.3. Validez

Para la investigación se usó una ficha simple de recolección de datos, que sirvió registrar la data del análisis de los aislamientos bacterianos (resistencia, clonalidad), no se incluye humanos en el estudio por tanto no hubo encuestas, ni instrumentos que recojan información de personas, por lo que no fue necesario validar la ficha.

3.7.4. Confiabilidad

No fue necesario realizar el proceso de confiabilidad, dado que el instrumento no se aplicó en personas, sólo se obtuvo información a través de la observación.

3.8. Procesamiento y análisis de datos

3.8.1. Procesamiento de la información

a) Procedencia de los aislamientos:

Los aislamientos utilizados en este estudio cuentan con identificación y pruebas de susceptibilidad procesados en el momento de su aislamiento (entre enero y julio del 2021), utilizando el sistema automatizado BD Phoenix. Los resultados se encuentran almacenados en el sistema de laboratorio del hospital, llamado IrisLab. El servicio de microbiología dispone de un cepario, donde conforme a los protocolos definidos para la preservación de aislamientos, está establecido que todos los aislamientos derivados de las unidades de hospitalización son almacenados en viales que contienen caldo tripticasa de soya con glicerol (TSB) al 20%. Posteriormente, estos se incuban a una temperatura de 37 °C durante 24 horas, tras lo cual son conservados en refrigeración a -20 °C hasta su utilización en estudios posteriores, según sea necesario.

b) Extracción de ADN bacteriano:

Con el fin de mejorar la extracción de ADN, se emplearon cultivos bacterianos frescos obtenidos mediante la inoculación de los aislamientos conservados en TSB con glicerol al 20%, posteriormente sembrados en agar MacConkey e incubados a 37°C por 24 horas. A partir de esos cultivos frescos sembrados en este medio selectivo se tomaron dos a tres colonias para realizar una suspensión bacteriana en TSB sin glicerol. El ADN bacteriano se extrajo utilizando el kit *Zybio*, el cual incorpora un método semi-automatizado que incluye placas con perlas magnéticas. Se siguieron los pasos dados en el manual del kit (ver anexo 3), que especifica el uso de 200 uL de la suspensión bacteriana con 15 uL de la proteínasa K suministrada en el kit. Estos reactivos se agregaron en las posiciones A1-H1 y A7-H7 de la placa, en ese orden. Después la placa fue colocada en el equipo y se procedió a la extracción de ADN utilizando el programa B-200, con una duración total de 10 minutos. El ADN extraído fue

aliquotado en viales para ser guardados a -20°C , hasta su posterior procesamiento.

c) Análisis por PCR

Se utilizó el kit PCR BIO Taq Mix Red de la marca PCR BIOSYSTEMS. Para la preparación del master mix se requieren: 5 uL de 2x PCR BIO Taq Mix Red, 0,5 uL de primer REP1, 0,5 uL de primer REP2 y 4,5 uL de agua ultrapura. Al master mix preparado se le añade 1 uL de ADN bacteriano, generando así un volumen final de reacción de 11 uL por cada muestra. Dado que se trabajó con un total de 54 muestras, se preparó master mix para un total de 60 reacciones (rx) y luego se dispensó 10 uL del master mix a cada tubo Eppendorf®. Inmediatamente se añadió 1 uL de ADN bacteriano, obteniendo así el volumen final requerido por muestra.

Tabla 1. Preparación del master mix PCR BIO Taq Mix Red

| Reactivo | Para 1 rx | Para 60 rx |
|------------------------|------------------|-------------------|
| 2x PCR BIO Taq Mix Red | 5 uL | 300 uL |
| Primer REP1 (10 uM) | 0.5 uL | 30 uL |
| Primer REP2 (10 uM) | 0.5 uL | 30 uL |
| Agua ultrapura | 4.5 uL | 270 uL |
| Volumen final | 10 uL | |

(Elaboración propia)

Las condiciones termodinámicas de PCR fueron: para la etapa de denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, luego se dieron 30 ciclos con etapas de denaturación (94°C durante 1 minuto), hibridación (47.5°C durante 1 minuto) y extensión (72°C durante 2 minutos). Por último, se dio la extensión final a 72°C por 16 minutos.

El análisis de PCR de los elementos REP se realizó empleando primers citados en diversos estudios de clonalidad (Snelling et al, 1996) (Sucuy, 2017). Se muestra las secuencias en la tabla N° 2. Todos los primers fueron de la marca MACROGEN de procedencia coreana. Culminado este paso, se procedió a realizar la electroforesis.

Tabla 2. Secuencia de primers (REP-PCR)

| Primers | Longitud (pb) Secuencia 5' - 3' |
|----------------|--|
| REP 1 | 5'- IIIGCGCCGICATCAGGC- 3' |
| REP 2 | 5'- ACGTCTTATCAGGCCTAC - 3' |

(Snealling et al. 1996)⁴⁵

d) Corrida electroforética

Con los elementos REP obtenidos tras la amplificación, se procedió a realizar la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Se dispensaron 5 uL de las muestras amplificadas en cada pocillo del gel de agarosa 1.5% que estaba inmerso en el buffer de corrida TBE5X dentro de la cámara electroforética. Simultáneamente, se cargó 2 uL del marcador de peso molecular “PCRBIO Ladder III” en otro pocillo. Luego se inició la corrida electroforética con un voltaje constante de 90V por 1 hora, lo que posibilitó la migración de los diversos elementos REP presentes en los aislamientos. Finalizado este paso, se procedió a visualizar los patrones de banda obtenidos haciendo uso de un transiluminador de luz azul. Se obtuvo una imagen para su posterior análisis.

3.8.2. Análisis de datos

Estadística descriptiva: El análisis descriptivo de las variables cuantitativas (discretas) se realizó utilizando medidas de tendencia central (promedio), dispersión (desviación estándar) y rangos de valores mínimos y máximos. Las variables cualitativas se analizaron a través de la distribución de frecuencias absolutas y relativas.

3.9. Aspectos éticos

Este proyecto no involucró a personas ni utilizó datos provenientes de ellas por lo que el estudio es inocuo para los seres humanos. Sin embargo, fue revisado y aprobado por el comité de ética del hospital nacional de referencia, cumpliendo con los principios bioéticos considerados.

CAPITULO IV: PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultados

4.1.1 Análisis descriptivo de los resultados

En el estudio actual, se utilizaron 54 aislamientos de *A. baumannii*, las cuales fueron obtenidas entre enero y julio de 2021. El propósito general de este estudio fue realizar la caracterización de los patrones de clonalidad inherentes a dichos aislamientos. Para ello las muestras se sometieron a un proceso de análisis genético mediante la técnica *Repetitive Palindromic Polymerase Chain Reaction* (REP- PCR), este análisis permitió la identificación de bandas polimórficas que se evidenciaron a través de una corrida electroforética. Se observaron un total de 15-17 amplicones por cada aislamiento, cuyos tamaños moleculares variaron en un rango de 200 - 1900 pares de bases (pb), los cuales fueron medidos en comparación con el marcador de peso molecular PCR BIO Ladder III, tal como se observa en el anexo adjunto (Ver figura 1).

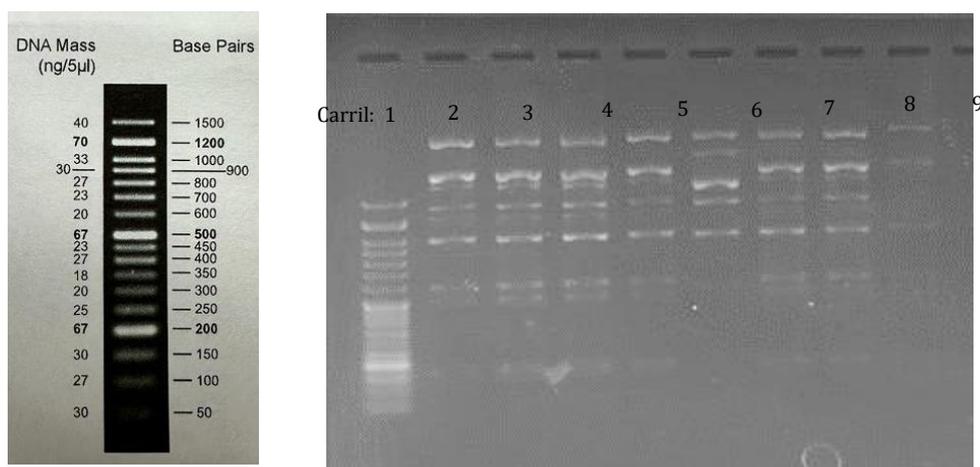


Figura 1. Patrones de bandas obtenidos. Carril 1: Ladder, carril 2: Muestra 12, carril 3: muestra 33, carril 4: muestra 50, carril 5: muestra 52, carril 6: muestra 53, carril 7: muestra 55, carril 8: muestra 56, carril 9: muestra 57

Las bandas resultantes, observadas en el gel de agarosa, fueron registradas en un cuadro en el software Excel. Para la construcción del dendograma, se utilizó una tabla de códigos binarios, donde se asignó el valor “0” para expresar la ausencia de bandas y el valor “1” para indicar la presencia de bandas. Esta tabla fue sometida a un análisis de conglomerados o análisis de clúster utilizando el programa “Past4” con el método de grupo de pares de media aritmética (UPGMA) e índice de Sorensen-Dice para representar el dendograma. El índice de similitud considerado como punto de corte fue de 0.89. Es así que los aislamientos con un índice de similitud entre 89% a 95% se consideraron relacionados, un índice mayor o

igual a 95% se consideraron idénticos, por el contrario, si el índice es menor a 89% no se consideran relacionados. En base a estos criterios se obtuvieron seis agrupamientos o clústers con índices de similitud mayores a 89%, por lo que se consideran relacionados, estos fueron denominados como A1, A2, A3, B, C y D respectivamente. Los clústers A1 y A2 tienen una índice similitud de 95% por lo que se consideraran idénticos. Los clusters A3, B, D y C están entre un rango de 89 a 94% de similitud por lo que se consideran relacionados. Los aislamientos con índice de similitud menores a 89% no se consideran relacionados, existen 9 aislamientos no agrupados.

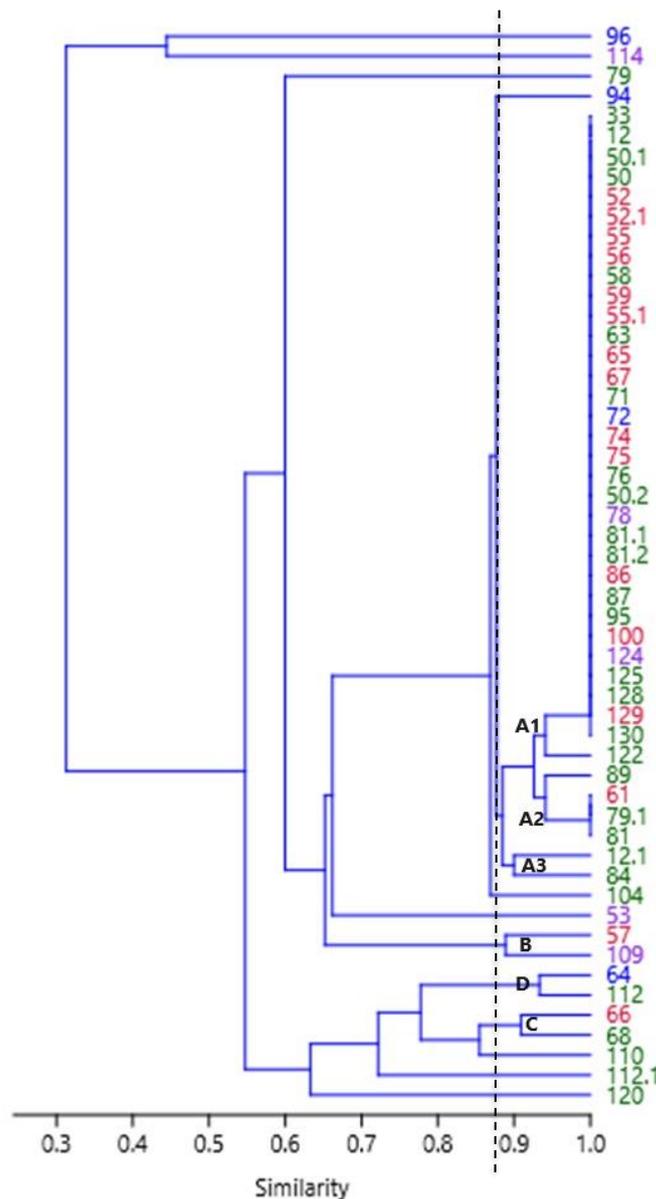


Figura 2. Dendrograma de los aislamientos de *A. baumannii*

La tabla N° 3 muestra la recolección de datos relativos a los perfiles de susceptibilidad de *A. baumannii*, en los que se realizaron pruebas de sensibilidad ante 12 antibióticos. Como se muestra en la tabla, todos los aislamientos evaluados mostraron resistencia a los

carbapenémicos (100%). Se evidencia, igualmente, una elevada resistencia hacia amikacina y ceftazidima, alcanzando un 98%, así como porcentajes similares para gentamicina, ciprofloxacino y levofloxacino. El antibiótico que presenta un porcentaje menor de resistencia en comparación a otros antibióticos fue cefepime con un 65%; no obstante, es importante destacar que se observó un porcentaje significativo de sensibilidad intermedia correspondiente al 31%. Con respecto a colistina no hubo aislamientos resistentes, obteniendo un 100% de sensibilidad para este antibiótico.

Aunque se observan porcentajes reducidos de sensibilidad para los antibióticos analizados, trimetoprim-sulfametoxazol se destaca como el segundo antibiótico con mayor sensibilidad, después de colistina, con un 6%. Es importante destacar que, además de los carbapenémicos, tanto ceftazidima como piperacilina-tazobactam no exhibieron ningún aislamiento sensible en la presente investigación

Tabla 3. Perfil de susceptibilidad de *A. baumannii*

| TIPO | ANTIBIOTICO | RESISTENTE | | INTERMEDIO | | SENSIBLE | | TOTAL | |
|--------------------------------|--------------------------------|------------|------|------------|-----|----------|------|-------|------|
| | | N° | % | N° | % | N° | % | N° | % |
| AMINOGLUCOSIDOS | AMIKACINA | 53 | 98% | 0 | 0% | 1 | 2% | 54 | 100% |
| INHIBIDOR DE BETALACTAMASAS | AMPICILINA - SULBACTAM | 47 | 87% | 6 | 11% | 1 | 2% | 54 | 100% |
| CEFALOSPORINA 4G | CEFEPIME | 35 | 65% | 17 | 31% | 2 | 4% | 54 | 100% |
| CEFALOSPORINA 3G | CEFTAZIDIMA | 53 | 98% | 1 | 2% | 0 | 0% | 54 | 100% |
| QUINOLONAS | CIPROFLOXACINO | 52 | 96% | 1 | 2% | 1 | 2% | 54 | 100% |
| AMINOGLUCOSIDOS | GENTAMICINA | 52 | 96% | 0 | 0% | 2 | 4% | 54 | 100% |
| CARBAPENEMICOS | IMIPENEM | 54 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 54 | 100% |
| QUINOLONAS | LEVOFLOXACINO | 52 | 96% | 1 | 2% | 1 | 2% | 54 | 100% |
| CARBAPENEMICOS | MEROPENEM | 54 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% | 54 | 100% |
| INHIBIDOR DE BETALACTAMASAS | PIPERACILINA-TAZOBACTAM | 49 | 91% | 5 | 9% | 0 | 0% | 54 | 100% |
| INHIBIDOR DE FOLATO | TRIMETROPIN- SULFAMETOXASOL | 51 | 94% | 0 | 0% | 3 | 6% | 54 | 100% |
| POLIPEPTIDO | COLISTINA | 0 | 0% | 0 | 0% | 54 | 100% | 54 | 100% |

En el análisis presentado en la tabla 4, se puede apreciar la frecuencia de los diversos tipos de muestra de las cuales se obtuvieron los aislamientos de *A. baumannii*, clasificados según el servicio hospitalario de donde provienen. Se evidencia que un total de 29 muestras proceden de la UCI C, destacándose como el servicio con la mayor cantidad de muestras con aislamientos de la bacteria en cuestión. Además, se observa que el tipo de muestra más

frecuente, representando un 37.9%, es la secreción bronquial. En contraste, la UCI A presenta la menor cantidad de aislamientos, con un total de 4 muestras, siendo la muestra de sangre la más frecuente, con un 75%, durante el período de estudio.

Tabla 4. Frecuencia por tipo de muestra

| PROCEDENCIA | TIPO DE MUESTRA | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|-------------|-------------------------|------------|------------|
| UCI A | Aspirado bronquial | 0 | 0.0 |
| | Punta de catéter venoso | 0 | 0.0 |
| | Espujo | 0 | 0.0 |
| | Secreción endotraqueal | 0 | 0.0 |
| | Sangre | 3 | 75.0 |
| | Secreción bronquial | 1 | 25.0 |
| | Total | 4 | 100.0 |
| UCI B | Aspirado bronquial | 3 | 18.7 |
| | Punta de catéter venoso | 0 | 0.0 |
| | Espujo | 0 | 0.0 |
| | Secreción endotraqueal | 0 | 0.0 |
| | Sangre | 7 | 43.7 |
| | Secreción bronquial | 6 | 37.5 |
| | Total | 16 | 100.0 |
| UCI C | Aspirado bronquial | 5 | 17.2 |
| | Punta de catéter venoso | 2 | 6.8 |
| | Espujo | 1 | 3.4 |
| | Secreción endotraqueal | 2 | 6.8 |
| | Sangre | 8 | 27.5 |
| | Secreción bronquial | 11 | 37.9 |
| | Total | 29 | 100.0 |
| UCI D | Aspirado bronquial | 1 | 20.0 |
| | Punta de catéter venoso | 0 | 0.0 |
| | Espujo | 0 | 0.0 |
| | Secreción endotraqueal | 0 | 0.0 |
| | Sangre | 0 | 0.0 |
| | Secreción bronquial | 4 | 80.0 |
| | Total | 5 | 100.0 |

En el dendograma se evidenció la presencia de 45 cepas agrupadas en 6 grupos clonales. El clon A1 tiene una similitud del 95% y destaca como el grupo clonal más grande, integrado

por 33 cepas distribuidas en las 4 unidades de cuidados intensivos durante los 6 meses comprendidos en el estudio. El clon A2 que también tiene una similitud del 95 %, consta de 4 cepas distribuidas en los meses de marzo a mayo entre la UCI B y C. El clon A3, B, C y D que tiene una similitud menor a 95%, pero mayor a 89%, constan de 2 cepas cada uno. Observamos que la mayor cantidad de clones encontrados se encuentran entre la UCI B y la UCI C destacándose entre los meses marzo y mayo. Por el contrario, en la UCI A solo se encontró un clon en el mes de abril.

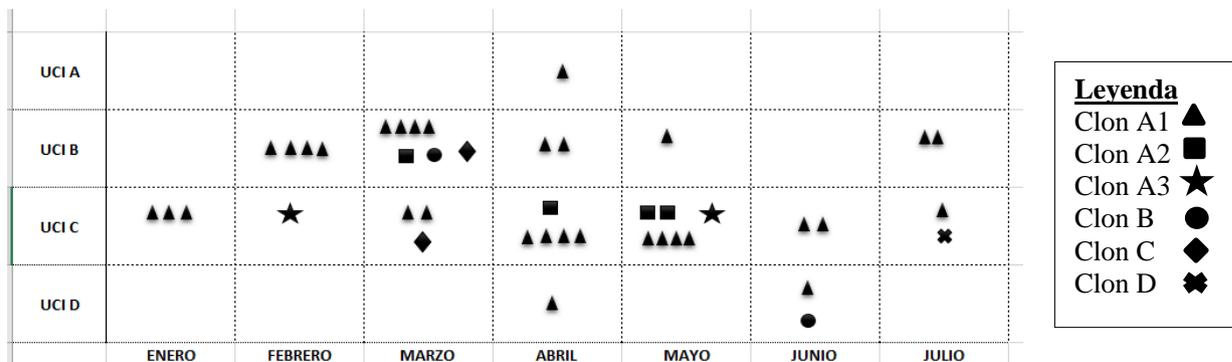


Figura 3. Distribución clonal entre sub unidades UCIs y periodo de estudio

La Tabla 5 muestra la asociación entre los grupos clonales y el perfil de resistencia. Se destaca la presencia significativa de aislamientos clasificados como extremadamente resistentes (XDR), predominantemente asociados al clon A1, seguido por el clon A2 que presenta cuatro aislamientos XDR. Se evidencia en menor proporción la presencia de otros grupos clonales que también exhiben resistencia extrema. Únicamente se registró un aislamiento con perfil de resistencia multirresistente (MDR), el cual está vinculado al clon B.

Tabla 5. Asociación entre grupos clonales y perfil de resistencia de *A. baumannii*

| GRUPO CLONAL | PERFIL DE RESISTENCIA | | Total |
|--------------|-----------------------|-----|-------|
| | MDR | XDR | |
| A1 | 0 | 33 | 33 |
| A2 | 0 | 4 | 4 |
| A3 | 0 | 2 | 2 |
| B | 1 | 1 | 2 |
| C | 0 | 2 | 2 |
| D | 0 | 2 | 2 |
| Total | 1 | 44 | 45 |

El análisis estadístico realizado con la prueba de chi-cuadrado muestra una relación estadísticamente significativa entre los grupos clonales y el perfil de resistencia, ya que el valor de p es menor a 0.05.

4.1.2 Discusión de resultados

Acinetobacter baumannii es un coco bacilo gram negativo oportunista de gran importancia para la salud humana, responsable de diversas infecciones nosocomiales, como neumonía, bacteriemia, meningitis, entre otras.¹³ Su capacidad para sobrevivir en superficies secas aumenta su capacidad de propagación nosocomial. Diversos estudios mencionan que la dificultad en el tratamiento de *A. baumannii* radica en que posee mecanismos de resistencia cromosómicos, los cuales se ven potenciados por su capacidad para adquirir fácilmente genes que le confieren resistencia a los antimicrobianos¹⁴. Esto se ve reflejado en el presente estudio, ya que 98% de los aislamientos fueron resistentes a 9 ó 10 grupos de antibióticos, caracterizándose como extremadamente resistentes o con resistencia extendida (XDR), según la definición dada en el consenso latinoamericano por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2019⁴⁴.

Estudios previos han demostrado que los estudios de clonalidad son importantes para la identificación de la propagación de clones epidémicos, siendo especialmente relevante en el análisis de IAAS donde se presume de transmisión cruzada por parte del personal asistencial o entre los pacientes, estos estudios realizan la búsqueda de clústers o grupos clonales, que constituyen agrupaciones de genes que posibilitan la revelación de patrones semejantes en aislamientos, facilitando así su identificación como clones. Estos al ser identificados en una ubicación en particular, pueden ser causantes de ocurrencia de brotes o microbrotes, en función del número de grupos clonales involucrados.

Durante el desarrollo del estudio, se identificaron seis grupos clonales con índices de similitud que superan el 89%. Se destaca, particularmente, la predominancia del grupo clonal A1, que albergó una proporción considerable de los aislamientos sometidos a análisis. Cabe resaltar que este grupo clonal se caracteriza por un índice de similitud del 95%, indicativo de una similitud completa entre los aislamientos clasificados en este grupo, demostrando, de este modo, su condición de idénticos. El grupo clonal A2 también obtuvo un índice de similitud igual al grupo A1, aunque alberga sólo 4 aislamientos. Los otros 4 grupos clonales hallados, son agrupamientos pequeños además albergan aislamientos con índices de similitud menores, por lo que se consideran relacionados, mas no idénticos.

Se encontró una alta resistencia antibiótica en los aislamientos del estudio. La totalidad de los aislamientos exhibieron resistencia completa a los carbapenémicos, cumpliendo con el criterio de inclusión preestablecido para la investigación. Asimismo, se observó una marcada resistencia a amikacina, ceftazidima, gentamicina, ciprofloxacino y levofloxacino, con tasas de resistencia situadas entre el 96% y 98%. Cabe señalar que cefepime muestra un menor porcentaje de resistencia; sin embargo, registra el porcentaje más elevado de sensibilidad intermedia. Es relevante destacar que la totalidad de los aislamientos analizados en el estudio presentaron sensibilidad al 100% frente a colistina. La mayor cantidad de aislamientos provienen de la UCI C, albergando la presencia de 5 de los 6 grupos clonales identificados, distribuidos a lo largo de los 6 meses comprendidos en el estudio. En el caso de la UCI B, se observa la presencia de 4 grupos clonales específicamente durante el mes de marzo. Durante febrero, abril, mayo y julio solo se registró el clon A1 en dicha unidad. Además, únicamente se identificó un aislamiento con un perfil de resistencia MDR, asociado al clon B y localizado en la UCI D en el mes de junio. Los demás grupos clonales están asociados a aislamientos XDR.

La presente investigación revela, a través del dendograma, la identificación de 6 grupos clonales situados en el hospital nacional de referencia, con índices de similitud superiores al 89%, destacándose la presencia de un grupo clonal más extenso (A1) distribuido en las 4 unidades de cuidados intensivos durante los 6 meses comprendidos en el estudio. Este resultado indica que dicho clon predomina, particularmente entre los meses de marzo y mayo, afectando a todas las unidades de cuidados críticos. De manera significativa, el 98% de aislamientos presentaron un perfil de resistencia XDR, mientras que el 2% restante presentó un perfil MDR. Tal como se observa en el estudio de Fernández¹⁶ en un hospital de Lambayeque, donde se identificó la presencia de 5 grupos clonales con índices de similitud superiores al 88% provenientes en su mayoría de la UCI. No obstante, se observa una mayor diversidad en el perfil de resistencia, con la detección de 10 aislamientos MDR (42%) y 14 XDR (58%). Esto podría deberse a la inclusión de aislamientos no solo de UCI, sino también de otros servicios hospitalarios, como emergencias.

En otra investigación de Meshkat et al⁴⁵ en un hospital de Irán, se identificaron 10 grupos clonales con índices de similitud superiores al 95%, evidenciando una mayor diversidad genética de *Acinetobacter baumannii*. Por otro lado, un estudio de clonalidad realizado en Lima por Galarza y Vargas¹⁷, identificó sólo 3 grupos clonales, donde el 92% eran extremadamente resistentes (XDR) y el 8% Pan-resistente (PDR). Estos hallazgos resaltan

la variabilidad en la distribución y resistencia de los grupos clonales de *Acinetobacter* en contextos hospitalarios diferentes.

Respecto a la resistencia a antibióticos, se observó que el total de aislados de *A. baumannii* fueron carbapenémicos resistentes, conforme a los criterios de inclusión establecidos. Además, el 98% de los aislamientos demostraron resistencia a amikacina y ceftazidima, 96% de resistencia a ciprofloxacino, levofloxacino y gentamicina. Estos resultados coinciden a los reportados por Selim y colaboradores, quienes en su estudio informaron que el 89% de los aislamientos eran carbapenémicos resistentes y mostraban altos niveles de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como a las quinolonas.

La elevada resistencia antibiótica evidenciada en diversos estudios subraya la complejidad asociada con el tratamiento de este patógeno en entornos hospitalarios^{1,3,4}. Es relevante destacar que, en este estudio, el 100% de los aislamientos demostraron sensibilidad a colistina, evaluada mediante el método de predifusión con tabletas de colistina, considerado como método alternativo, según la OPS⁴⁴. Esta observación concuerda con los resultados de Kian Bahara et al., quienes también informaron que el 100% de sus aislamientos mostraron sensibilidad a colistina, indicando la eficacia de este antibiótico contra *A.baumannii*.

Como se muestra en el apartado de población, muestra y muestreo de la presente investigación, los aislamientos de *A.baumannii* utilizados provinieron de muestras obtenidas de vías respiratorias, sangre y punta de catéter de pacientes de la UCI. Se observó que los aislamientos provenían en su mayoría de muestras de vías respiratorias, sugiriendo así que este patógeno es el principal agente causal de la neumonía relacionada a la ventilación mecánica en el hospital nacional de referencia donde se realizó la investigación. Estas observaciones también concuerdan con la investigación de Fernandez¹⁶, donde se evidencia que el tipo de muestra más frecuentemente afectada por aislamientos de *Acinetobacter* es la secreción bronquial. Además, el estudio realizado por Sucuy⁴⁰ destaca que el aspirado traqueal representa el tipo de muestra más común, constituyendo el 45% del total de muestras, y la mayoría de estas proceden del servicio de UCI adultos. Estos hallazgos son consistentes con los expuestos en el informe del Centro de Epidemiología del MINSA-PERU del 2021⁸, que señala a *A.baumannii* como el agente causal más recurrente IAAS en servicios de UCI para adultos durante el periodo comprendido entre 2019 y 2021, especialmente asociado a la ventilación mecánica.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El principal objetivo de esta investigación fue conocer el patrón de clonalidad de *A. baumannii* y en consecuencia determinar la cantidad de grupos clonales diseminados en las UCIs del hospital de referencia. Este estudio ha identificado la existencia de 6 grupos clonales, donde uno se destaca principalmente por ser el grupo clonal más grande, además, tiene una alta similitud genética y se encuentra ampliamente diseminado en las cuatro unidades de cuidados críticos.

Un segundo hallazgo importante surge al analizar la distribución clonal en el período de estudio, puesto que se evidencia que entre los meses de marzo y mayo se registra un aumento en la aparición de grupos clonales, especialmente en las unidades de cuidados intensivos B y C, unidades ubicadas en el tercer piso de dicho servicio. La proximidad geográfica de estas dos unidades podría explicar la presencia de una transmisión cruzada entre ellas.

Los resultados alcanzados en esta investigación podrían respaldar la idea de que *A. baumannii* desempeña un papel significativo en las neumonías relacionadas a la ventilación mecánica en este hospital. Esto se sustenta en la evidencia de que el tipo de muestra más recurrente, de donde se obtuvieron los aislamientos de esta bacteria en este estudio, corresponde a muestras respiratorias, siendo el aspirado bronquial el más predominante. No obstante, es imperativo señalar que una limitación intrínseca de esta investigación radica que para este estudio no se recopilaron datos clínicos y sintomáticos de los pacientes, por ello no se puede afirmar que las muestras hayan sido IAAS.

La presente investigación revela que los aislamientos de *Acinetobacter* del estudio exhibieron resistencia a múltiples antibióticos, clasificándose en su mayoría como aislamientos XDR. Este hallazgo subraya la necesidad de fortalecer las medidas orientadas a fomentar el uso racional de antimicrobianos. Además, destaca la urgencia de implementar medidas eficaces de control de infecciones en el ambiente hospitalario con el fin de prevenir la propagación de estos aislamientos extremadamente resistentes.

5.2 Recomendaciones

Los estudios futuros deberían trabajar con un número mayor de aislamientos o en un mayor tiempo de estudio para obtener resultados más representativos. Además, sería importante identificar los patrones de resistencia a nivel molecular, con el propósito de localizar los genes responsables de esta y vincularlos con los patrones clonales.

Incluir análisis de distribución clonal, no solo en aislamientos de *A.baumannii*, sino también en otros microorganismos de importancia clínica como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, etc.

En futuros estudios se podrían incluir datos clínicos y sintomáticos de los pacientes, para así poder diferenciar las infecciones de colonizaciones causadas por esta bacteria.

Es importante la difusión de los datos encontrados al hospital de referencia pertinente, con el propósito de concientizar al personal que labora en las áreas críticas, así como en otros servicios hospitalarios susceptibles a la diseminación de bacterias multirresistentes. Esto busca informar acerca de las medidas preventivas y de control, tales como la higiene de manos y la adecuada desinfección de equipos hospitalarios, entre otros aspectos.

REFERENCIAS

1. Rodríguez C., Nastro M., Flores S., Spinozzi M., López A., David V. et al. Epidemiología molecular de aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenems en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2019; 51 (3)
2. Salazar E., Nieves B. *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. 2015. Disponible en: <https://medicina.ufm.edu/wp-content/uploads/2017/03/Acinetobacter.pdf>.
3. García Cr., Culebras E., Álvarez A., Rodríguez I., Delgado A. Utilidad de MALDI-TOF y REP-PCR frente a PFGE para el estudio epidemiológico de *Acinetobacter baumannii* *Rev Esp Quimioter* 2021; 34 (3): 207-213.
4. Reyes Roque A. *Acinetobacter baumannii*: amenaza para la salud humana. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2018; 22 (6). Disponible en: <http://revistaamc.sld.cu/index.php/amc/article/view/5617>
5. Martínez E., Sánchez L., Rodríguez G. *Acinetobacter baumannii*, un patógeno emergente: estudio prospectivo en una unidad de terapia intensiva respiratoria. *Rev Asoc Mex Med Crit Ter Int* 2016;30(3):187-191,
6. Moreno J. Mortalidad por *Acinetobacter* en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren 2016. [Tesis]. Universidad San Martín de Porres. Facultad de Medicina Humana. 2019. Disponible en: https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/5042/moreno_vje.pdf?sequence=3&isAllowed=y
7. Fernández MD, García AC, Zegarra PJ, Granados BL. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de secreción endotraqueal en la unidad de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, 2016. *Rev Med Hered*. 2017; 28(4): 236-41.
8. Ministerio de Salud. Situación epidemiológica de las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS). Minsa – Perú: 2021. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/wp-content/uploads/2021/09/SDSS-IAAS_Primer-semester-2021.pdf
9. Núñez T., Hernán C., Klinger H., Nastro M., Balderrama N., Dabos L. et., al. Epidemiología molecular de aislamientos de *Acinetobacter Baumannii* en la ciudad de Guayaquil. *Rev. Med. FCM*. 2018; 22(1): 5-8. Disponible en:

<https://editorial.ucsg.edu.ec/ojs-medicina/index.php/ucsg-medicina/article/view/836/pdf>.

10. Ministerio de Salud, Hospital Nacional Dos de Mayo. Guía técnica para la vigilancia, prevención y control de microorganismos multiresistentes. 2019: Disponible en: [RD 0030 2019 D HNDM.pdf \(hdosdemayo.gob.pe\)](#)
11. Ministerio de Salud. Mapa Microbiológico comparado HNDM 2015-2017. Documento Técnico. Disponible en: http://nuevaweb.hdosdemayo.gob.pe/instrumentos_de_gestion/normas_emitidas/r_dir/2018/03_marzo/RD_032_18_MICRO.pdf
12. Selim S, Ahmed Faried O, Almuhayawi M.S, Mohammed O.A, Saleh F.M, Warrad M. Dynamic gene clusters mediating carbapenem- resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. [Article]. 2022. Disponible en: [Dynamic Gene Clusters Mediating Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Clinical Isolates - PMC \(nih.gov\)](#)
13. Zeighami H, Valadkhani F, Shapuri R, Samadi E, Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. BMC Infect Dis. 2019 Jul 17;19(1):629. doi: 10.1186/s12879-019-4272-0. PMID: 31315572; PMCID: PMC6637494. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31315572/>
14. Snyman Y, Whitelaw A.C, Reuter S, Dramowski A, Bonnie M.R, Newton-Foot M. Clonal expansion of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in cape Town, South Africa. [Artículo]. 2019. Disponible en: [expansion clonal de A.baumannii resistentes a colistin.pdf](#)
15. Kian Bahara, Reza Mirnejad, Gholamali Moradli, Shiva Mirkalantari, Reza Golmohammadi. Molecular Genotyping of *Acinetobacter baumannii* Species Isolated from patients in Tehran, Iran, by Repetitive Element PCR Fingerprinting. Iranian Journal of Pathology. [Artículo]. 2018.
16. Fernández D, Moreno C. Patrón de clonalidad por REP y ERIC – PCR en cepas de *Acinetobacter baumannii* complex aislados de colonización o infección en pacientes del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Julio – Noviembre del 2015 [Tesis]. Perú: Universidad Particular De Chiclayo; 2019.
17. Galarza M, Vargas M. Brote de *Acinetobacter baumannii* extremadamente resistente a los antimicrobianos en una Unidad de cuidados intensivos de neonatos en Lima. [Tesis]. Perú: Universidad Científica del Sur; 2021.

18. Instituto Nacional del Cáncer. Infección. 2018 [Acceso el 15 de julio del 2021]
 Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/infeccion>
19. MSD Salud. ¿Qué tipos de infecciones existen? 2019 [Acceso el 15 de julio del 2021]
 Disponible en: <https://www.msdsalud.es/cuidar-en/infecciones/informacion-basica/tipos-infecciones-existen.html>
20. Subsistema de vigilancia epidemiológica para las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) . Ministerio de salud pública.2019. Disponible en: [GGaceta-IAAS-2018-CORRECCIONES-SNVSPv2.pdf \(salud.gob.ec\)](GGaceta-IAAS-2018-CORRECCIONES-SNVSPv2.pdf (salud.gob.ec))
21. Sociedad Internacional de Enfermedades Infecciosas. Guía para el control de infecciones asociadas a la atención en salud. 2018 [Acceso el 05 de setiembre del 2021].
 Disponible en: <https://isid.org/guia/prevencion/sanguineo/>
22. Passen M. MicroBio. [Online]; 2021. Acceso 19 de Julio de 2022. Disponible en: https://microbiio.info/acinetobacter-baumannii-una-descripcion-general/#Infeccion_del_torrente_sanguineo.
23. Echevarría J. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Med Per [Revista en internet]. 2006 [Acceso el 05 de setiembre del 2021]; 23(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/a06v23n1.pdf>
24. Gustavo A. Quintero MMFF. Academia. [Online].; 2019. Acceso 21 de Julio de 2022. Disponible en: https://www.academia.edu/es/8643479/infeccion_de_sitio_operatorio.
25. D. Escudero et al. Control of an Acinetobacter baumannii multidrug resistance endemic in the ICU. Recalling the obvious. Medicina Intensiva. 2017; 41(8).
26. Fresnadillo Maria Jose et al. Prevención de un brote de Acinetobacter baumannii en una unidad de cuidados intensivos: eficacia de diversos métodos matemáticos. Revista española de quimioterapia. 2015.
27. Rada J. Acinetobacter un patógeno actual. Rev Soc Bol Ped [Revista en internet]. 2016 [Acceso el 15 de julio del 2021]; 55 (1): 29-48. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/rbp/v55n1/v55n1_a06.pdf
28. Barletta R, Pérez L, Castro G, Pujol M, Barletta J, Dueñas Y. Acinetobacter baumannii multirresistente: un reto para la terapéutica actual. Medisur. 2018; 16 (2). [Revista en

- internet]. Disponible en: [\(PDF\) Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: a challenge for current therapeutic \(researchgate.net\)](#)
29. Vanegas J, Roncancio G, Jiménez J. Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. Revista CES MEDICINA [Revista en internet]. 2014 [Acceso el 15 de julio del 2021], 28 (2): 233-246. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v28n2/v28n2a08.pdf>
 30. Yauri K, Zavaleta M, Sevilla C. Carbapenemasas clase D en Aislamientos clínicos de Acinetobacter baumannii. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Revista en internet]. 2020 [Acceso el 15 de julio del 2021]; 37(2):387-8. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v37n2/1726-4642-rins-37-02-387.pdf>
 31. Cool P, Coque M, Domínguez M. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. [Acceso el 12 de mayo del 2021]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
 32. Cardozo A, Ramon L, Poutou R, Carrascal A. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de Listeria monocytogenes. Univ. Sci [Revista en internet]. 2013 [Acceso el 20 de mayo del 2021]; 18 (2): 203-222. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v18n2/v18n2a08.pdf>
 33. Hernández M, Quijada N, Rodriguez D, Eiros J. Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. Rev Argent Microbiol [Revista en internet]. 2020 [Acceso el 20 de mayo del 2021]; 52(2): 150-161. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-pdf-S0325754119300811>
 34. Biesecker L. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [Acceso el 12 de mayo del 2021]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>
 35. Academy K. Polymerase chain reaction (PCR). [Online]; 2022. Acceso 18 de abril del 2022. Disponible en: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>.
 36. Universidad de Chile. Conoce qué es el examen de PCR, y qué dificultades implica su realización. Chile: Universidad de Chile; 2020. [Acceso el 12 de mayo del 2021]. Disponible en: <https://www.uchile.cl/noticias/165397/conoce-que-es-el-examen-de-pcr-y-que-dificultades-implica>

37. Pinzón J, Mantilla J, Valenzuela E, Fernández F, Álvarez C, Osorio E. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio* 2006; 10(2): 71-78.
38. Castro N, Morales A, Sánchez J, Solís A. Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de β -lactamasas de espectro extendido. *Bioquímica*. 2009; 34(4): 165-174
39. Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C, Bodenham AR, Inglis T. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. [Artículo]. *J Clin Microbiol*. 1996 May;34(5):1193-202. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8727902/>
40. Sucuy J. Epidemiología molecular en *Acinetobacter baumannii*-complex resistente a carbapenémicos utilizando amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos de aislamientos en una casa de salud de la ciudad de Quito [Tesis]. Quito: noviembre Universidad Central del Ecuador; 2017.
41. Equipo editorial, Etecé. Método analítico. Argentina. [Internet]. Última edición: 16 de julio de 2021. Consultado: 13 de noviembre del 2022 disponible en: <https://concepto.de/metodo-analitico/#ixzz7kZZBrvBb>
42. Hernandez R, Fernandez C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5ta edición. Mexico: McGraw-Hill. 2010.
43. Hulley S, Cummings S, Browner W, Grady D, Newman T. *Designing Clinical Research*. 4th ed. Philadelphia. Lippincott Williams&Wilkins a Wolters Kluwer. 2013
44. Jimenez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazabal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista panamericana de Salud Pública*. 2019.
45. Meshkat et al. Molecular characterization and genetic relatedness of clinically *Acinetobacter baumannii* isolates conferring increased resistance to the first and second generations of tetracyclines in Iran. [Artículo]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2017.

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de Consistencia

Título: Patrón de clonalidad en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021

| Formulación del problema | Objetivos | Variables | Dimensiones |
|--|---|--------------------------|-----------------|
| <p>Problema general ¿Cuál es el patrón de clonalidad de cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021?</p> <p>Problemas específicos - ¿Cuál es el perfil de susceptibilidad de cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021? - ¿Cuál es la distribución de los grupos clonales de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021? - ¿Cuál es la relación entre el perfil de susceptibilidad y los grupos clonales de las cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021?</p> | <p>Objetivo general Conocer el patrón de clonalidad de cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.</p> <p>Objetivos específicos - Identificar los perfiles de susceptibilidad de cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021. - Determinar la distribución de los grupos clonales de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021. - Determinar la relación entre los perfiles de susceptibilidad y los grupos clonales de las cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos aislados de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021.</p> | Patrones clonalidad de | Amplicones |
| | | | Grupos clonales |
| | | Perfiles de resistencia | Antibióticos |
| Tipo de estudio | Técnicas e instrumentos | Análisis de Datos | |

| | | |
|--|---|---|
| <p>Tipo: aplicada. Enfoque: cuantitativo. Diseño: observacional, prospectivo, transversal. Nivel: descriptivo</p> <p>Población: Todos los aislamientos de <i>A. baumannii</i> obtenidos del repositorio de muestras del laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021. Muestra: 54 aislamientos de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos obtenidos del repositorio de muestras del laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021. Muestreo: No probabilístico de casos consecutivos de aislamientos de <i>A. baumannii</i>.</p> | <p>Técnicas: Observación, análisis documental. Instrumentos: Ficha de recolección. Criterios de inclusión</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aislamientos provenientes de muestras de aspirado bronquial, sangre y puntas de catéter. - Aislamientos que provengan de muestras obtenidas de las unidades de cuidados intensivos adultos del hospital de referencia. - Aislamientos de obtenidos durante el periodo de estudio. - Aislamientos que presenten resistencia a carbapenémicos. <p>Criterios de exclusión</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aislamientos que no se encuentren viables al momento del estudio. - Aislamientos duplicados. | <p>El análisis se realizará en el programa SPSS y las variables se analizarán de manera univariada e inferencial. Estadística descriptiva: Las variables cuantitativas (discretas) serán estimadas mediante medidas de tendencia central (promedio), de dispersión (desviación estándar) y valores mínimos-máximos. Las variables cualitativas serán presentadas mediante distribución de frecuencias absolutas y relativas.</p> |
|--|---|---|

Anexo 2: Instrumento

| FICHA DE RECOLECCION DE DATOS | | |
|---|---------------|-----------------------|
| Patrón de clonalidad en aislamientos de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, 2021 | | |
| N° DE AISLAMIENTO: | FECHA: | |
| I. DATOS GENERALES | | |
| TIPO DE MUESTRA: | | |
| - ASPIRADO BRONQUIAL | | <input type="radio"/> |
| - SANGRE | | <input type="radio"/> |
| - CATETER VENOSO CENTRAL | | <input type="radio"/> |
| - OTRO: | | <input type="radio"/> |
| PROCEDENCIA: | | |
| - UCI. A | | <input type="radio"/> |
| - UCI. B | | <input type="radio"/> |
| - UCI. C | | <input type="radio"/> |
| - UCI. D | | <input type="radio"/> |
| II. IDENTIFICACION BACTERIANA: | | |
| GENERO Y ESPECIE BACTERIANA: <i>Acinetobacter baumannii</i> | | |
| III. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIOTICA | | |
| ANTIBIOGRAMA: | | |
| ANTIBIOTICO | MIC | INTERPRETACION |
| TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL | | |
| CIPROFLOXACINO | | |
| LEVOFLOXACINO | | |
| AMPILICINA/ SULBACTAM | | |
| CEFTAZIDIMA | | |
| CEFEPIMA | | |
| AMIKACINA | | |
| GENTAMICINA | | |
| PIPERACILINA/ TAZOBACTAM | | |
| IMIPENEM | | |
| MEROPENEM | | |

Anexo 3: Componentes del kit zybio: nucleic acid extraction kit (magnetic bead method)

| | | |
|---|----------------|---|
| Zybio: Nucleic Acid Extraction Kit (Magnetic Bead Method) | B200- 16 Tests | Main components |
| Proteinase K | 240 uLx 1 tube | < 5% Proteinase K |
| Nucleic Acid Extraction Reagent Prepackaged in 96 well plates | 8 T x 2 plates | Extraction Reagent I, Extraction Reagent II, elution buffer, magnetic beads solution. |
| Manual | 1 | |

Anexo 4: Aprobación del comité de ética del hospital de referencia

| | | | |
|---|------------------------------------|---|-------------------------------|
|  | PERÚ Ministerio de Salud | Viceministerio de Prestaciones y Aseguramiento en Salud | Hospital Nacional Dos de Mayo |
|---|------------------------------------|---|-------------------------------|

« Año de la Unidad, la Paz y el Desarrollo »

CARTA N° 33 -2023-DG-HNDM

Lima, 07 de febrero 2023

Estudiante de Tecnología Médica:
LIZZY JUDITH RAMIREZ HUAMANI
Investigadora Principal
De la Universidad Privada Norbert Wiener
Presente. -

ASUNTO : AUTORIZACIÓN Y APROBACIÓN PARA REALIZAR ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN
REF : Expediente N°008207-2022 Registro N°034196-2022

De mi mayor consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarle cordialmente y al mismo tiempo comunicarle de acuerdo al Informe **N°0142-2023-OACDI-HNDM**; existe viabilidad y se **AUTORIZA** la realización del estudio de investigación titulado:

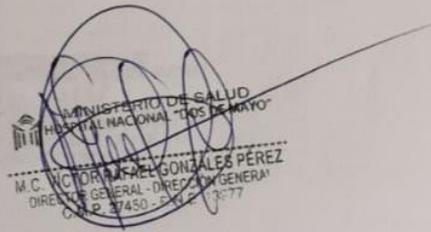
“PATRON DE CLONALIDAD EN AISLAMIENTOS DE Acinetobacter baumannii RESISTENTES A CARBAPENEMICOS PROVENIENTES DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO, 2021”

El presente documento tiene aprobación del Comité de Ética en Investigación Biomédica de Nuestra Institución; según la (Evaluación N°007-2023-CEIB-HNDM) el cual entra en vigencia a partir del 26 de enero 2023 y expira el 25 de enero 2024.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Sin otro particular, me suscribo de Usted.

Atentamente,



MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL "DOS DE MAYO"
M.C. VICTORIA FAJALGONZALES PÉREZ
DIRECCIÓN GENERAL - DIRECCIÓN GENERAL
C. P. 27450 - TEL. 373 3377

CARTA N° 33 -2023-DG-HNDM



<http://hdosdemayo.gob.pe/portal/>
direcciongeneral@hdosdemayo.gob.pe
Teléfono: 373 3377 - Anexo 3209

Anexo 5: Carta de aprobación del hospital de referencia

| | | | |
|---|------------------------------------|---|-------------------------------|
|  | PERÚ Ministerio de Salud | Viceministerio de Prestaciones y Aseguramiento en Salud | Hospital Nacional Dos de Mayo |
|---|------------------------------------|---|-------------------------------|

«Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Hombres y Mujeres»
«Año de La Unidad, La Paz y el Desarrollo»
Año del Bicentenario del Congreso de la Republica del Perú

EVALUACIÓN N°007-2023-CEIB-HNDM

“PATRON DE CLONALIDAD EN AISLAMIENTOS DE Acinetobacter baumannii RESISTENTES A CARBAPENEMICOS PROVENIENTES DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO, 2021”

Investigadora Principal: LIZZY JUDITH RAMIREZ HUAMANÍ

El Comité de Ética en Investigación Biomédica concluye que:

1. El Investigador se encuentra calificado para la conducción de la investigación.
2. El Protocolo sigue lineamientos metodológicos y éticos.

Por tanto, el comité expide el presente documento de **APROBACIÓN Y OPINIÓN FAVORABLE** del presente estudio.

El presente documento tiene vigencia a partir de la fecha y expira el **25 de enero del 2024**.

El Investigador remitirá al Comité de Ética en Investigación Biomédica un informe final al término del estudio.

Atentamente,

Lima, 26 de enero 2023



MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL "DOS DE MAYO"
M.C. YENIA ESTEBAN FLORES SANTILLAN
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
HOSPITAL NACIONAL "DOS DE MAYO"

YEFS/Eva
Cc. archivo

<http://hdosdemayo.gob.pe/portal/>
direcciongeneral@hdosdemayo.gob.pe
hdosdemayo@hotmail.com

Parque "Historia de la Medicina Peruana"
s/n alt. cdra. 13 Av. Grau- Cercado de Lima
Teléfono: 328-0028 Anexo 3209



Anexo 6: Informe del asesor de Turnitin

| | |
|---|----------------------------------|
| PAPER NAME | AUTHOR |
| TESIS FINAL_RAMIREZ LIZZY (2).docx | LIZZY RAMIREZ |
| WORD COUNT | CHARACTER COUNT |
| 11871 Words | 69285 Characters |
| PAGE COUNT | FILE SIZE |
| 47 Pages | 916.2KB |
| SUBMISSION DATE | REPORT DATE |
| Nov 6, 2024 3:27 PM GMT-5 | Nov 6, 2024 3:29 PM GMT-5 |

● 15% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

- 15% Internet database
- 4% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database

● Excluded from Similarity Report

- Submitted Works database
- Bibliographic material
- Cited material

● 15% Overall Similarity

Top sources found in the following databases:

- 15% Internet database
- 4% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database

TOP SOURCES

The sources with the highest number of matches within the submission. Overlapping sources will not be displayed.

| | | |
|---|---|-----|
| 1 | repositorio.uwiener.edu.pe Internet | 4% |
| 2 | oldri.ues.edu.sv Internet | <1% |
| 3 | hdl.handle.net Internet | <1% |
| 4 | repositorio.udch.edu.pe Internet | <1% |
| 5 | tdx.cat Internet | <1% |
| 6 | repositorio.undac.edu.pe Internet | <1% |
| 7 | researchgate.net Internet | <1% |
| 8 | 1library.co Internet | <1% |
| 9 | repositorio.upch.edu.pe Internet | <1% |