



Universidad
Norbert Wiener

Powered by **Arizona State University**

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

Tesis

Métodos de detección fenotípica e inmucromatografica para el diagnóstico de OXA-48like, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima, 2024

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

Presentado por:

Autor: Sánchez Alejos, Cristofer Enrique

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7841-2759>

Asesora: Dra. Astete Medrano, Delia Jessica

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5667-7369>

Lima – Perú

2025

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

Yo, SANCHEZ ALEJOS CRISTOFER ENRRIQUE egresado de la Facultad de tecnología médica y Escuela Académica Profesional de laboratorio clínico y anatomía patológica / Escuela de Posgrado de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo académico
 “MÉTODOS DE DETECCIÓN FENOTÍPICA E INMUCROMATOGRAFICA PARA EL DIAGNOSTICO DE OXA-48_{LIKE}, EN CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS, HOSPITAL DE NIVEL III-1, LIMA, 2024” Asesorado por la docente: DELIA JESSICA ASTETE MEDRANO DNI 09635079 ORCID 0000-0001-5667-7369 tiene un índice de similitud de 13% con código oid: 14912:492928805 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.



.....
 Firma de autor
 Sanchez Alejos Cristofer Enrique
 DNI:74470207



.....
 Firma
 Delia Jessica Astete Medrano
 DNI: 09635079

Lima, 16 de julio del 2025

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, a mi familia por su apoyo y sacrificio incondicional. A mi asesora por compartir su conocimiento y guiarme. A las personas que me impulsaron con sus consejos y enseñanzas. Y a mí mismo por poner todo mi empeño en cada minuto que estuve el laboratorio. Este gran logro lo comparto con todos ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al jefe de departamento del servicio de microbiología clínica Dr Velásquez Pomar Jorge Humberto Pedro, por abrirme las puertas de su servicio, a la Dra Otero Anton Ivette, al Lic TM Salazar Campos Angel Martín, la Blga Sara Ysabel Benites, y a todos los miembros del laboratorio de microbiología por su apoyo brindado.

ÍNDICE

1. EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

1.2.2. Problemas específicos

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

1.3.2 Objetivos específicos

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1 Teórica

1.4.2 Metodológica

1.4.3 Práctica

1.5. Delimitaciones de la investigación

1.5.1 Temporal

1.5.2 Espacial

1.5.3 Recursos

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.2. Bases teóricas

2.3. Formulación de hipótesis (Si aplica)

2.3.1. Hipótesis general

2.3.2. Hipótesis específicas

3. METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación

3.2. Enfoque de la investigación

3.3. Tipo de investigación

3.4. Diseño de la investigación

3.5. Población, muestra y muestreo

3.6. Variables y Operacionalización

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

3.7.2. Descripción de instrumentos

3.7.3. Validación

3.7.4. Confiabilidad

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

3.9. Aspectos éticos

4. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

4.1. Cronograma de actividades (Se sugiere utilizar el diagrama de Gantt)

4.2. Presupuesto

5. REFERENCIAS

Anexos 1: Matriz de consistencia

Anexo 2: Instrumento

EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La aparición y diseminación de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, constituye uno de los desafíos más críticos para la salud pública en nuestro país y a nivel global, produciendo alto riesgo y complicación en los tratamientos clínicos que a menudo terminan en fracaso (1).

La OMS ha implantado distintas estrategias para abordar esta problemática (2). El aumento de carbapenemasas se convirtió en un desafío para los laboratorios de microbiologías ya que la detección precisa y diferenciación de los distintos tipos son esenciales controlar su diseminación entre las enterobacterias.

En la última década se implementó diversas técnicas fenotípicas, moleculares y proteómicos para orientación e identificación de carbapenemasas (3).

La primera revisión de carbapenemasas reportadas en el Perú concluyó que en nuestro país circulan toda clase de estas enzimas (4), Además se observó que en los hospitales de nuestro país y con mayor frecuencia en la capital hay un incremento significativo de enterobacterias con el fenotipo OXA-48_{like} lo que complica la detección, caracterizados por su resistencia a penicilinas, tiene una susceptibilidad disminuida a cefalosporinas de espectro extendido y a subes inhibe parcialmente al imipenen, (5).

El presente estudio tiene como objetivo principal dar a conocer los métodos de detección fenotípica e Inmucromatografica utilizados para el diagnóstico de OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, en un Hospital de Nivel III-1 de Lima.

1.2. Formulación del problema

1.2.1 Problema General

- ¿Cuál es la validez diagnóstica de los métodos fenotípicos e inmunocromatografía para la identificación de OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos en un Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál es la frecuencia de bacterias productoras OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?
- ¿Cuáles son las especies bacterianas identificadas con el fenotipo de resistencia OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?
- ¿Cuál es la sensibilidad de los métodos fenotípicos en comparación con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48_{like}, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?
- ¿Cuál es la especificidad de los métodos fenotípicos en comparación con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48_{like}, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Determinar la validez diagnóstica de los métodos fenotípicos e inmunocromatografía para la identificación de OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos en un Hospital de Nivel III-1, Lima 2024

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de bacterias productoras OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.
- Determinar las especies bacterianas identificadas con el fenotipo de resistencia OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.
- Determinar la sensibilidad de los métodos fenotípicos con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48_{like}, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.
- Determinar la especificidad de los métodos fenotípicos en comparación con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48_{like}, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1 Teórica

El aumento continuo de enterobacterias productoras de carbapenemasas se ha convertido en una amenaza considerable para la salud mundial (6), en nuestro país la situación epidemiológica de estas carbapenemasas es poco conocida, ya que existes escasos hospitales e institutos de investigación que realicen estos análisis, lo refleja las pocas publicaciones sobre esta problemática (7). Por ello es esencial evaluar e implementar distintos métodos fenotípicos y de inmunocromatografía, para poder identificar los distintos tipos de carbapenemasas más frecuentes, lo que ayudara a controlar su propagación (8).

1.4.2 Metodológica

La detección y diferenciación de los distintos tipos de carbapenemasas es esencial para controlar y prevenir la diseminación de los mecanismos de resistencias de estas enterobacterias (9). Los métodos fenotípicos nos permiten observar la sensibilidad reducida a los carbapenémicos el cual se confirma mediante el Test de Hodge modificado, sin embargo, este método no distingue los distintos tipos de carbapenemasas y podrían arrojar falso positivo en cepas que presentan hiperproducción de AmpC y perdida de porinas (10). Entre otras pruebas sencillas y seguras se encuentra el Carba NP que es un ensayo bioquímico que presenta limitaciones para la identificación de OXA-48, por otro lado, existen pruebas de inhibición con discos de ácido fenilborónico, dipicolínico o EDTA (11). Aunque los métodos moleculares siguen siendo el estándar de oro, también presentan ciertas limitaciones ya que no identifican la variante OXA-48, son relativamente costosos y requieren personal especializado y de laboratorios adecuados. Como alternativa tenemos los métodos inmunocromatográficos que ofrecen una detección rápida a partir de colonias aisladas.

1.4.3 Práctica

Dado los objetivos del presente estudio que se basa en demostrar la validez diagnóstica de los métodos fenotípicos e inmunocromatografía para la identificación de OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos en un Hospital de Nivel III-1, en relación con las especies identificadas con el fenotipo, la frecuencia de bacterias productoras OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, comparando la sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48_{like}. Se obtendrá información conjunta sobre la resistencia de Carbapenemes, la especificidad de los métodos fenotípicos e inmunocromatográficos para la identificación de las diferentes carbapenemasas.

1.5. Delimitaciones de la investigación

1.5.1 Temporal

El presente estudio “Métodos de Detección Fenotípica e Inmucromatografica para el Diagnostico de OXA-48_{like}, en Cultivos Microbiológicos en un Hospital de Nivel III-1 de Lima, 2024”.

Estará comprendido dentro del periodo:

Fecha de inicio: 01 de octubre del 2024

Fecha de término: 31 de diciembre del 2024

1.5.2 Espacial

El estudio, “Métodos de Detección Fenotípica e Inmucromatografica para el Diagnostico de OXA-48_{like}, en Cultivos Microbiológicos en un Hospital de Nivel III-1 de Lima, 2024”. Se realizará en un Hospital de Nivel III-1 de Lima metropolitana.

1.5.3 Recursos

El presente estudio es autofinanciado

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Norah, et al., (2025). Publicaron su estudio “Elucidación de los mecanismos de resistencia y el patrón de unión de los nuevos inhibidores covalentes de las carbapenemasas tipo Oxa-48: un enfoque híbrido experimental e in silico”. La investigación tuvo como objetivo desarrollar inhibidores covalentes de las carbapenemasas OXA-48 (de tipo salvaje y mutante) utilizando una combinación de acoplamiento molecular y simulación de dinámica molecular (MD) basadas en productos naturales de la base de datos ZNINC20. Estudio descriptivo, que está en desarrollo actualmente, donde se examinó 7800 muestras de tres hospitales, 353 muestras positivas a *Klebsiella pneumoniae*, resistentes a SXT, AMP, FEP CTX, CIP, TET, MEM e IPM, mientras que los antibióticos efectivos fueron TGC, FOS, FOX, SCF y TZP. Los resultados fueron los siguientes, La secuenciación y el análisis mutacional del gen OXA-48 permitieron identificar 45 mutaciones puntuales. Estas mutaciones pueden contribuir a la disminución de la afinidad por los antibióticos y causar resistencia. Conclusión, Varias vacunas potenciales se encuentran en las etapas preclínicas y clínicas de desarrollo. Los cuales se dirigen al polisacárido de la cápsula de *K. pneumoniae*, el principal factor de virulencia más importante del patógeno. Por otro lado, aún están por determinarse la eficacia de estas vacunas contra las cepas hipervirulentas y resistentes a carbapenémicos.

Parreño, et al., (2023), realizó su estudio “Evaluación de dos técnicas fenotípicas y un panel molecular multiplex comercial para la detección de diferentes carbapenemasas”. El propósito de la investigación fue comparar las técnicas fenotípicas, Test inmunocromatográficos frente a una técnica genotípica. Se empleo una metodología descriptiva observacional, se analizaron 106 con los diferentes métodos, teniendo como Gold Estándar una técnica RT-PCR multiplex. Los resultados mostraron que las tres técnicas superaron el 90% de sensibilidad, con respecto a la diferenciación de

carbapenemasas mostraron diferentes porcentajes de identificación, los discos de inhibición presentaron una especificidad 62% para OXA-48, el test inmunocromatográfico mostró una sensibilidad de 93% para metalo tipo NDM y para OXA-48 de 95%. Mientras que para la técnica genotípica la sensibilidad fue del 100%. Se concluye, que el test inmunocromatográfico, se destaca por ser sencilla, rápida y económica posicionándola como una opción para el screening.

Araya, et al., (2022), Chile. Publicaron un estudio enfocado en la Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo OXA-48 que circulan en el país. El objetivo fue determinar los perfiles fenotípicos, genotípicos y su susceptibilidad antimicrobiana de 16 cepas. Para ello se empleó el estudio descriptivo, las muestras se analizaron mediante técnicas tradicionales, automatizadas, colorimétricas, inmunocromatográficas y moleculares. Los resultados obtenidos fueron, presencia del gen *bla*_{oxa-48}, también se aisló *bla*_{oxa-232}, observándose resistencia a carbapenémicos como cefalosporinas, además de piperacilina/tazobactam y temocilina. Se concluye, sobre el primer reporte de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas de la subfamilia OXA-48, poner en alerta para contener la diseminación de este mecanismo de resistencia en otros hospitales.

Jiachi Chiou. Et al., (2021). Publico la “Caracterización estructural y funcional de OXA-48: conocimiento del mecanismo y la base estructural del reconocimiento y la especificidad del sustrato”. El objetivo de estudio fue modelar las estructuras complejas de OXA-48 y varias β -lactamas, lo que permitió identificar y caracterizar los residuos potenciales en el sitio activo interactuando con varias β -lactamas para dilucidar sus funciones en el reconocimiento del sustrato de OXA-48. Los resultados identificaron que cuatro residuos son esenciales para que OXA-48 lleve a cabo la hidrólisis catalítica de varias penicilinas y carbapenémicos in vivo como in vitro. Se

concluye que estos hallazgos brindan información exhaustiva del mecanismo de reconocimiento del sustrato y la catálisis de las β -lactamasas de tipo OXA.

Rivera, et al., (2021), España. Realizaron su estudio en Enterobacterias productoras de carbapenemasas OXA-48 en hospitales españoles: realizaron una revisión completa sobre la creciente resistencia a los antimicrobianos. Tuvieron como objetivo reforzar el conocimiento del uso de antibióticos, completándolos con medidas preventivas en pacientes hospitalizados. Estudio observacional descriptivo de corte transversal retrospectivo, la población de estudio comprendió 86 hospitales españoles. Resultados, la enzima más frecuente fue OXA-48 con un 71.5%, seguida de (VIM-1 con 25,3%). Por otro lado, la incidencia de colonización de CRE en un hospital de Madrid fue del 2%, el principal patógeno fue *K. pneumoniae* (54%) seguida por *E. coli* (19%), la principal enzima OXA-48 (64%) y VIM-1 (27%). Concluyeron que el principal mecanismo de resistencia fue la OXA-48.

Mora, et al., (2020), España. Publicaron el estudio, "Infecciones asociadas a enterobacterias productoras de carbapenemasas OXA-48 en pacientes quirúrgicos: consumo de antibióticos y evolución de sensibilidades". Tuvo como objetivo observar cómo evolucionó el tratamiento en función a la administración de antibióticos en infecciones por enterobacterias productoras de OXA-48. La metodología fue un estudio observacional retrospectivo. Su muestra conformada fueron cultivos positivos de OXA-48 en con junto con datos clínicos. Se obtuvieron los siguientes resultados tras un estudio de 6 años, se registraron 65 pacientes con infecciones asociadas a OXA-48, entre las edades de 13 a 68 años, se registraron 66 aislamientos: *Klebsiella pneumoniae*, 57 (86,5%); *Enterobacter cloacae*, 5 (7,6%); *Escherichia coli*, 3 (4,5%); *Morganella morganii*, 1 (1,5%). Las infecciones asociadas a OXA-48 se clasificaron según la fuente principal: IIA 39 (60%), infección de herida quirúrgica 16 (24,5%), infección de tracto urinario 7 (11%), neumonía 2 (3%),

bacteriemia primaria/bacteriemia asociada a catéter 1 (1,5%). Conclusión, *Klebsiella pneumoniae*, es la enterobacteria productora de OXA-48 más aislada. Los antibióticos más útiles fueron, ceftazidima-avibactam, amikacina, tigeciclina, meropenem e imipenen.

Hopkins, et al., (2018). Publicaron su estudio “Evaluación del ensayo inmunocromatográfico multiplex NG-Test CARBA 5 para la detección de carbapenemasas KPC, OXA-48-like, NDM, VIM e IMP”. Su objetivo fue analizar la sensibilidad y especificidad analítica del ensayo inmunocromatográfico multiplex NG-Test CARBA 5, para las cinco grandes familias: KPC, OXA-48-like, NDM, VIM e IMP. Se utilizó la metodología descriptiva, su población de estudio 197 aislamientos bacterianos. El ensayo NG-Test CARBA 5 es sencillo de realizar y el procedimiento tomó aproximadamente 5 minutos por muestra, la lectura se realiza a los 15 minutos, con resultado positivos entre 2 y 6 minutos. Obteniendo los siguientes resultados, Todas las variantes de los genes KPC, OXA-48-like, NDM y VIM identificadas se pudieron detectar con el ensayo NG-Test CARBA 5, sin embargo, se observaron problemas con la detección IMP y sus variantes.

2.2. Bases teóricas

Generalidades de las carbapenemasas

Se clasifican según su enfoque molecular, el sistema Ambler en 3 clases: A, B y D.

Clase A y D: serino-betalactamasas (dentro de la clase A se tiene a la KPC por las siglas en inglés de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas, un tipo de carbapenemasa, aunque su nombre lo mencione no solo se presenta en patógenos del género *Klebsiella*).

Clase B: metalobetalactamasas. Se encuentran las carbapenemasas VIM, (por las siglas en inglés de Verona integron-encoded metallo- β -lactamasas),

IMP (por las siglas en inglés de imipenem-hydrolyzing metallo- β -lactamasas) y NDM-1 (por las siglas en inglés de New Delhi metallo-beta-lactamase). En la clase D se presentan las carbapenemasas de tipo OXA y la OXA-48-like (oxacilinasas) (12).

2.2.1 Características de OXA-48

Las β -lactamasas de clase D constituyen un grupo de enzimas presente en enterobacterias y son responsables de la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos. Dentro de este grupo las serinos de clase D incluyen las oxacilinasas u OXA-lactamasas, las cuales son resistentes a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos. Estas tienen la capacidad de hidrolizar oxacilina de manera más eficiente que la bencilpenicilina, lo que las hace más patógenas (12). Un rasgo más notable de la OXA-48 es su capacidad para degradar una amplia gama de antibióticos β -lactámicos. Esto incluye amino, carboxi, ureidopenicilinas y cefalosporinas de espectro estrecho que puede hidrolizar de manera más eficiente que las cefalosporinas de espectro extendido, además de penicilinas, la cefalotina y el imipenem. Esto hace que sea particularmente difícil tratar las infecciones causadas por bacterias que expresan esta enzima (13).

2.2.2 Epidemiología molecular de OXA 48

La actual propagación internacional e interespecies de blaOXA-48 está impulsada principalmente por el transposón compuesto Tn1999 y sus variantes situadas en plásmidos conjugativos IncL similares a pOXA-48a (14).

2.2.3 Bacterias productoras de OXA-48

Klebsiella pneumoniae la primer OXA-48 descrita, además es la bacteria de distribución global más común relacionada con infecciones asociadas a la atención médica (15) (16).

Las β -lactamasas de clase D que hidrolizan carbapenémicos, en particular, pueden conferir resistencia a los carbapenémicos en los principales patógenos gramnegativos como *Acinetobacter sp*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter sakasaki*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter braakii*, *Salmonella enterica*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Raoultella planticola*, *Kluyvera spp.*, *Klebsiella oxytoca* y *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp*

2.2.4 Distribución geográfica del OXA 48

La OXA-48 es la enzima más común a nivel internacional. Se reporto por primera vez en 2004 a partir de un aislado clínico obtenido en Estambul, Turquía; responsable de la infección del tracto urinario inferior. Por otro lado, el primer informe de *K. pneumoniae* con OXA-48 fuera de Turquía se produjo en Bruselas, Bélgica, en 2010, en donde se encontró el gen OXA-48 situado en plásmidos similares de 70 kb, recuperados de Turquía, Líbano, Egipto, Francia, Bélgica, el norte de África, Túnez y Marruecos. En 2011, aparecieron informes de Enterobacterias productoras de OXA-48 en Israel, Senegal, Países Bajos, España, Irlanda y Eslovenia.

Actualmente, Enterobacterias con OXA-48 tienen una distribución global, y se han descrito informes de casos importados y no importados de todos los continentes excepto la Antártida, incluidas las Américas, y varios países europeos y norteamericanos (17).

La prevalencia de esta enzima es una preocupación importante, debido a que limita las opciones terapéuticas disponibles para los médicos y aumenta el riesgo de mortalidad (18).

2.2.5 Detección de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos OXA-48

La identificación de estas CPE se realiza en dos etapas: un proceso de tamizaje seguido de una prueba de confirmación fenotípica o genotípica.

Cabe resaltar que en su mayoría estas pruebas diagnósticas se evalúan contra bacterias que producen OXA-48 y OXA-181 (en menor medida) y, a menudo, no incluyen otras enzimas similares o de la familia de las OXAs.

a. Técnicas de detección.

La prueba inicial resulta sencilla para predecir carbapenemasas en Enterobacterias. Sin embargo, los productores de tipo OXA-48 a menudo presentan ligeros aumentos en las CMI del carbapenem, lo que hace que la estrategia de considerar la no susceptibilidad a los carbapenémicos sea más problemática. Reducir los halos de inhibición de los carbapenémicos mejora la sensibilidad en la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas, pero a la vez disminuyó la especificidad, ya que la producción de ESBL o enzimas AmpC combinada con una menor permeabilidad también pueden generar la no susceptibilidad a estos antibióticos.

Para fines epidemiológicos o de control de infecciones, se recomienda analizar aquellas cepas que son resistentes a uno o más carbapenémicos. Con el fin de detectar la presencia de carbapenemasas (CLSI, 2018) (19). El Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST) (20), utiliza puntos de corte específicos para identificar carbapenémicos con fines clínicos. Las últimas pautas de EUCAST (tablas de puntos de corte versión 9.0, 2019 (EUCAST, 2019) (20), y pautas sobre detección de mecanismos de resistencia versión 2.0, 2017 (EUCAST, 2017) (21), establecen lo siguiente: Enterobacterias con CMI de meropenem de 0,125 g/ml o diámetro de <25 mm deben evaluarse con el fin de detectar la producción de carbapenemasas. Por otro lado, los aislamientos con halos de meropenem de 25 y 27 mm deben someterse a un análisis para detectar carbapenemasas si presentan resistencia a piperacilina-tazobactam con un diámetro ≤ 15 mm y/o temociclina < 11 mm (EUCAST, 2017) (21).

Al utilizar el meropenem de 10 g/ml como agente para la detección, se pudo capturar el 86% de carbapenemasas, incluyendo solo el 40% de los

productores de tipo OXA-48, mientras que la aplicación de las recomendaciones de EUCAST detectó el 98,4% de los aislamientos de CPE, incluyendo el 93% de los productores de OXA-48 (22).

El principal desafío para la detección exitosa de CPE radica en la variabilidad de los resultados obtenidos mediante las plataformas automatizadas. Un estudio nórdico multicéntrico encontró variaciones significativas en las CMI del carbapenem entre los CPE que incluían productores de OXA-48 y OXA-181 (23), mientras que un estudio del Reino Unido mostró que los perfiles de susceptibilidad generados con BD Phoenix, MicroScan y Vitek 2 eran deficientes en la identificación de CPE con enzimas parecidas a OXA-48 (24).

b. Métodos de confirmación fenotípicos

Estos microorganismos se pueden identificar mediante pruebas fenotípicas y a través de pruebas moleculares. Las pruebas fenotípicas más usadas son sinergia basadas en inhibidores, entre ellas tenemos sinergia de doble disco (DDST) o la prueba de disco combinado (CDT); la prueba Blue carba; pruebas colorimétricas como la prueba β -CARBA (Bio-Rad, Marne la Coquette, Francia); el método de inactivación de carbapenemas (CIM); pruebas indirectas de carbapenemasas en dispositivos de prueba de papel; los inmunoensayos de flujo lateral como el ensayo OXA-48 K-SeT (Coris Bioconcept, Gembloux, Bélgica), que se han mejorado para detectar múltiples enzimas (p. ej., KPC, NDM o VIM); ensayos electroquímicos como el BYG Carba; y técnicas basadas en espectrofotometría y espectrometría de masas en las que se destaca el (MALDI-TOF MS).

Por otro lado, los métodos moleculares abarcan la PCR, incluyendo ensayos multiplex internos para identificar distintos genes de carbapenemasas, ensayos comerciales basados en microarrays, sistemas totalmente automatizados de PCR o técnicas de microarrays y secuenciación del genoma mediante la tecnología de secuenciación de próxima generación (12), (25).

i. Pruebas de sinergia basadas en inhibidores

Esta técnica tiene la capacidad de inhibir la acción de las carbapenemasas. El procedimiento consiste en evaluar la capacidad del carbapenémico tanto en presencia como en ausencia del inhibidor.

Las pruebas basadas en inhibidores por lo general, aplican principios de susceptibilidad de disco. Ejemplo, Sinergia de doble disco [DDST] y prueba de disco combinada [CDT]. Una desventaja importante es el tiempo de respuesta que oscila entre 18 y 24 hrs.

Kits de discos comerciales:

- MASTDISCS Combi Carba plus (Mast Group Ltd., Merseyside, Reino Unido).
- Kit de confirmación KPC/MBL y OXA-48 (Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca).
- Kit de discos KPC&MBL&OXA-48 (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia).

Investigaciones de metodologías recientes:

- Huang et al. (2014) evaluaron un enfoque basado en prueba de disco combinado, en el que se añadió avibactam con una diferencia de diámetro de zona entre los discos de temocilina y temocilina-avibactam de 5 mm predecir productores de OXA-48. (Avibactam es un inhibidor de lactamasa no lactámico desarrollado recientemente) (26).
- Tsakris et al., (2015) desarrollaron un método de verificación para OXA-48 que incorporaba discos de imipenem saturados con EDTA y discos de EDTA combinados con ácido fenilborónico (PBA) (27).

ii. Prueba de carba NP

La técnica Carba NP (Nordmann y Poirel), implica la incubación de un lisado bacteriano en una solución que contiene imipenem, sulfato de zinc y rojo fenol, la presencia de carbapenemasa es evidenciada por un viraje de color de rojo a naranja o amarillo debido a la hidrólisis del imipenem. Al observar la publicación original de Nordmann y Poirel se evidencio una sensibilidad y especificidad del 100% para la identificación de diversas carbapenemasas, incluyendo Enterobacterias con enzimas similares a OXA-48.

Aplicación comercial:

- RAPIDEC CARBA NP (bioMérieux)
- Neo-Rapid CARB (Rosco Diagnostica)
- Kit Rapid Carb Blue (Rosco Diagnostica)
- El método Carba NP de tira de papel modificado utiliza tiras de papel de filtro con las soluciones Carba NP y cultivos bacterianos.

Investigaciones y metodologías recientes:

- Blue carba, el cual es una modificación Carba NP desarrollada en Portugal por Peixe y colegas (2013). Esta prueba emplea azul de bromotimol como indicador, junto con el imipenem y cilastatina como antibiótico y sustrato, esta técnica se realiza directamente colonias bacterianas; no obstante, tiene un rendimiento similar al Carba NP. La sensibilidad para CPE con KPC y MBL fueron cercanos al 100%, por otro lado, al igual que el carba NP muestra inconvenientes al tratar con cepas de *K. pneumoniae* mucroide y puede arrojar falsos negativos en el caso de CPE tipo OXA-48 (las sensibilidades varían de 89 a 100%) (28) (29).

iii. Prueba colorimétrica

El método -CARBA (Bio-Rad, Marne la Coquette, Francia), se basa en la modificación del color de un sustrato cromogénico, que inicialmente es incoloro, al entrar en contacto con enzimas hidrolizadoras de carbapenem, vira de color amarillo a rojo anaranjado o violeta, toda esta reacción se lleva a cabo en 30 min a temperatura ambiente, indicando la presencia de actividad hidrolizante de carbapenem. La sensibilidad y especificidad generales del método-CARBA para la detección de CPE son 85,1 % y 92,7 %, respectivamente. Nota, una incubación extendida a 1 hora permite la identificación adicional de algunas variantes de OXA-48 (30).

iv. Método de inactivación de carbapenémicos

Consiste en la incubación inicial durante 2 hrs. Se resuspende una asada 10 µL de la cepa en el tubo con caldo soya tripticasa y homogenizar la muestra añadir el disco de meropenem (Van der Zwaluw et al., 2015). El disco de meropenem se coloca luego en una placa de agar inoculada con una bacteria indicadora de *E. coli* susceptible y se incuba durante 8 h. Si hay una carbapenemasa presente, la actividad del disco de meropenem se inactivará, lo que permitirá el crecimiento sin inhibiciones de la *E. coli* susceptible. Las ventajas del método de inactivación de carbapenémicos incluyeron la rentabilidad, la facilidad de realización y la disponibilidad de reactivos en la mayoría de los laboratorios.

Una evaluación reciente de Tamma et al. de 11 ensayos fenotípicos, incluido el mCIM, encontró una sensibilidad del 100 % para la identificación de CPE de tipo OXA-48. Además, dicho ensayo presento sensibilidad del 98 % y una especificidad del 99 % para todos las CPE (31)

Investigaciones y metodologías recientes:

- Prueba CIMplus, que permite la detección de carbapenemasas en 8 h, con una sensibilidad general del 95,7% y una especificidad del 94,4% para la detección de diferentes carbapenemasas, incluidos 38 aislados que producen enzimas idénticas a OXA-48 (32)
- Muntean et al. (2018) publicaron el método de inactivación rápida de carbapenémicos (rCIM), que es rápido (es decir, los resultados están disponibles en 3 h), rentable y preciso para la detección de CPE (es decir, sensibilidad general del 99% y especificidad del 100%) (33).

v. Inmunoensayo de flujo lateral

El método inmunocromatográfico de flujo lateral está basado en la reacción antígeno-anticuerpo que se lleva a cabo sobre papel cromatográfico, es una prueba sencilla y se obtiene resultado en 15 min, posteriores a la aplicación de la dilución a un cartucho de prueba. El ensayo OXA-48 K-SeT (Coris Bioconcept, Gembloux, Bélgica) fue diseñado para capturar dos epítopos específicos de la enzima similar a OXA-48, incluidos OXA-48, -181, -204, -232 y -244 (Wareham et al., 2016). Este ensayo se ha actualizado a una forma multiplex (ensayo RESIST-3 OKN K-SeT; Coris BioConcept) que puede detectar simultáneamente la presencia de enzimas KPC y NDM. El ensayo mostró una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % para estas carbapenemasas.

Investigaciones y metodologías recientes:

- Coris BioConcept desarrolló el ensayo RESIST-3 OOK K-SeT, que detecta enzimas OXA-48-like y KPC. Este producto fue desarrollado para distinguir entre enzimas similares a OXA-48

con actividades de carbapenemasas altas (es decir, OXA-48, -162, -181 y -232) y débiles (es decir, OXA-163, -108, -247, -405 y -438). El fabricante afirmó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100%, pero el rendimiento no ha sido validado por otros investigadores.

- El ensayo Carba5 es otro ensayo inmunocromatográfico que puede detectar las carbapenemasas más comunes (incluidas OXA-48, -162, -181, -204, -232, -244, -517, -519 y -535) en un casete con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 95,3 % (34).
- El ensayo NG-Test CARBA5 (NG Biotech, Guipry, Francia) puede detectar todos los aislamientos con enzimas similares a KPC, NDM, VIM y OXA-48, pero no se detectaron Enterobacterales con IMP-13 e IMP-14 en el estudio de validación (35).

vi. Espectrometría de masas

El sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF de Bruker, que incorpora un software específico para la detección de carbapenemasas en un plazo de 2 a 3 h, está disponible en algunos laboratorios de microbiología de todo el mundo (36) (37).

Recientemente, Bruker Daltonik dio a conocer un software, nombrado MBT STAR-BL, para estudios automáticos de espectros de masas de hidrólisis de antibióticos, que se añadió en el software MBT Compass utilizado para detectar especies (38)

Más recientemente, se lanzó el kit MBT STAR-Carba IVD (Bruker Daltonik), considerado la primera prueba de detección de resistencia espectrométrica de masas certificado CE-IVD (diagnóstico in vitro), dicha prueba al unirse con el método MBT STAR-BL mostró una

sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,2% para la detección de CPE, incluidos aquellos con variantes OXA-48 de OXA-162, -181, -204, -232 y -244, dentro de un tiempo de respuesta de 55 min (39).

c. Métodos genotípicos

Los métodos por PCR son sensibles y específicos para identificar genes y se consideran los mejores métodos de confirmación. La base para la identificación de estas CPE similares a OXA-48 es primero amplificar los genes similares a blaOXA-48, seguido de la secuenciación del gen para la identificación de los subtipos específicos (por ejemplo, OXA-48, OXA-181, etc.) (40).

Las pruebas moléculas son realizadas principalmente en aislamiento de bacterias cultivadas para la identificación de genes de carbapenemasas. Existen varios métodos de PCR internos, PCR tiempo real y microarrays de ADN que se utilizan de rutina, están destinados para la identificación de carbapenemasas simultáneamente.

La desventaja principal son los costos relativamente altos (si se compara con pruebas fenotípicas), otra desventaja que solo detecta genes de carbapenemasas realizadas en la prueba (en comparación con los ensayos de hidrólisis). Además, los tiempos de respuesta son largos en comparación de la inmunocromatografía que emite resultados en minutos.

i. Ensayos comerciales

Ensayos comerciales de PCR multiplex, para la detección de diferentes genes de carbapenemasas (incluidos los genes similares a OXA). Una de sus grandes desventajas es la aprobación federal/nacional como método de diagnóstico clínico, materiales con control de calidad y formatos listos para usar. Estas pruebas están validadas para la detección de carbapenemasas en muestra biológicas. Su desventaja incluye el costo y su detección incierta para

el subtipo OXA-48 esto debido a la falta de oligonucleótidos específicas.

Investigaciones y metodologías recientes:

Check-Direct CPE (Checkpoints, Wageningen, Países Bajos)

EntericBio CPE (Serosep Limited, Limerick Irlanda)

Amplidiag Ensayo CarbaRVRE (Mobidiag Limited, Espoo, Finlandia)

Amplidiag CarbaRMCR (Mobidiag).

ii. Sistemas totalmente automatizados.

- Sistema GeneXpert (Cepheid, CA)
- El kit inicial Xpert Carba-R (o MDRO)
- Kit Xpert Carba-R
- BD MAX (Becton, Dickinson) tiene el kit comercial BD MAX CPE listo para usar
- El sistema BD MAX permite al usuario desarrollar protocolos y a la par informa ensayos internos y comerciales.
- El sistema Verigene (Luminex, IL) es un sistema automatizado de detección de genes basado en microarrays.
- La prueba BC-GN de Verigene tiene la capacidad de identificar bacterias gramnegativas y detecta genes de carbapenemasas, incluidos los genes blaOXA, a partir de frascos de hemocultivo positivos en un plazo de 2 h (302). Sin embargo, la prueba no puede distinguir blaOXA-48 de otros genes blaOXA (p. ej., blaOXA-23, blaOXA-24 y blaOXA-58).
- El panel de neumonía BioFire FilmArray (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT) contiene un objetivo similar a blaOXA-48, y el panel Unyvero LRT (Curetis USA, Inc., San Diego, CA) contiene varios objetivos bla OXA, incluido el similar a blaOXA-48.

- El método GenePOC Carba creado como prueba para detectar el gen: blaKPC, blaNDM, blaVIM, genes similares a blaOXA-48 y blaIMP.

d. Métodos inmunocromatográficos

Se caracterizan por ser pruebas diagnósticas rápidas (OXA-48 K-Set, CORIS BioConcept), esta prueba de diagnóstico rápido, tiene la capacidad de detectar carbapenemasas tipo OXA-48 y similares, tras el aislamiento de colonias cultivadas en medio sólido en 15 minutos. Tras realizar una comparación con técnicas moléculas, esta prueba fue capaz de detectar treinta y seis cepas de nuestra colección con carbapenemasa OXA-48 (16). La principal limitante de estas pruebas son la identificación de un solo mecanismos de resistencia a la vez. Se evidencia que otras pruebas tiene la capacidad de detecta OXA Y KPC simultáneamente, otras carbapenemasas presentes en nuestro medio como VIM o NDM, no serían detectadas.

2.3. Formulación de hipótesis

Por ser un estudio de tipo descriptivo no amerita el planteamiento de hipótesis

CAPITULO III

DISEÑO METODOLOGÍCO

3.1. Método de la investigación

Por el tipo de investigación se consideró descriptivo.

3.2. Enfoque de la investigación

Estudio de enfoque cuantitativo, porque se analizó los resultados cuantitativos de las pruebas realizadas para alcanzar los objetivos propuestos.

3.3. Tipo de investigación

Estudio de tipo aplicado, ya que se utilizó la información obtenida en la realización de las pruebas.

3.4. Diseño de la investigación

Estudio de tipo descriptivo, porque no se manipularon las variables.

Según el número de mediciones es de corte transversal, debido a que los datos se recolectaron en un solo tiempo.

Según la fuente de toma de datos, es de tipo retrospectivo, ya que los datos se recolectaron desde la realización del proyecto hacia atrás.

3.5. Población, muestra y muestreo

Población:

La población de estudio estuvo conformada por 87 muestras, las cuales fueron enterobacterias con sospecha de carbapenemasas, según su procedencia se evidenció que la mayor cantidad de muestras provienen de

pabellón 81 y de consulta externa 6, de las 87 muestras obtenidas, 56 corresponde a orinas, 12 a muestra bronquial, 6 a muestras de hisopado rectal, 4 muestras de líquido abdominal, 4 a muestras de heces, 4 a muestras de heridas y 1 a muestra de sangre, los cuales correspondieron al periodo del estudio en el servicio de microbiología, hospital de Nivel III -1 de Lima metropolitana.

Muestra:

Estuvo conformada por 53 muestras los cuales fueron positivos a OXA48like procedentes del periodo de estudio en el servicio de microbiología, hospital de Nivel III -1 de Lima metropolitana.

Muestreo:

Se realizará un muestro probabilístico por conveniencia.

Criterios de inclusión

- Todas las muestras positivas para oxa 48 like de cultivos microbiológicos.
- Pacientes que cuenten con historias clínicas completas.
- Cepas confirmadas para productoras de carbapenemasas positivas.

Criterios de exclusión

- Pacientes con datos clínicos incompletos.
- Cepas negativas de bacterias productoras de carbapenemasas.
- Cepas coproductoras de carbapenemasas.

3.6. Variables y Operacionalización

Variable 1: Métodos fenotípicos

Definición operacional: Caracterizado por ayudarnos a clasificar enzimas tipo serino-betalactamasas de las metalo-betalactamasas mediante reacciones específicas de cada método.

Dimensiones	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Escala valorativa (niveles o rangos)
Test de Hodge Modificado	Son pruebas que nos permiten observar y predecir diferentes tipos de enzimas, los cuales son causantes de múltiples resistencias a los antibióticos.	Caracterizado por ayudarnos a clasificar enzimas tipo serino-betalactamasas de las metalo-betalactamasas mediante reacciones específicas de cada método.	Presencia o ausencia de hendidura	Ordinal	Presencia / Ausencia
Método de Inactivación del Carbapenem (mCIM)			Medición de halo	Nominal	Positivo (6-15mm) Intermedio (16-18 mm) Negativo (>19mm)
Método Modificado de Inactivación del Carbapenem (eCIM)			Medición de halo	Nominal	Positivo (6-15mm) Intermedio (16-18 mm) Negativo (>19mm)
Método de sinergia de disco con Ácido Borónico			Deformidad de los halos de inhibición(sinergia)	Ordinal	Presencia / Ausencia
Método de sinergia de doble disco con EDTA			Deformidad de los halos de inhibición(sinergia)	Ordinal	Presencia / Ausencia
Carba NP/Blue carba			Vira de azul a amarillo	Ordinal	Positivo / Negativo

Variable 2: Método – Inmunocromatográfico

Definición operacional: Anticuerpos dirigidos contra antígenos bacterianos resistentes a los antimicrobianos. De tipo: KPC, OXA-48, NDM, VIM e IMP.

Dimensiones	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Escala valorativa (niveles o rangos)
Determinante antigénico, específico para KPC, OXA-48 y NDM.	Prueba rápida que utiliza anticuerpos monoclonales diseñados para detectar proteínas asociadas a la resistencia de carbapenémicos	Anticuerpos dirigidos contra antígenos bacterianos resistentes a los antimicrobianos. De tipo: KPC, OXA-48, NDM, VIM e IMP.	Presencia de bandas en la línea de prueba.	Ordinal	Presencia / Ausencia

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

Documentación pedida por el hospital para la aceptación del proyecto de investigación ver en el anexo 3.

Adquisición de insumos por marca

Producto	Marca
Mueller-Hinton Agar	OXOID
Placas Petri de 150 mm	
Discos de antibióticos	Bioanalyse
Inmunolateralidad	Coris
Blue carba solución madre	
Imipenem + cilastatina	

Cepas crioconservadas

Las cepas para el estudio se obtuvieron del servicio de microbiología, los cuales estuvieron conservadas con glicerol al 20% a menos 70°. Para activarlas se sembró en Agar TSI, pasada las 18 horas se resembro en Agar sangre y Agar MacConkey.

MÉTODOS FENOTÍPICOS:

▪ TEST DE HODGE MODIFICADO

MATERIALES:
1. Agar Mueller-Hinton
2. Patrón 0.5 McFarland o turbidímetro
3. Solución salina o caldo Mueller-Hinton
4. Discos de ertapenem y meropenem de 10 µg
5. Cepa problema con un crecimiento de 18 horas a 37°C.

6. Cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 con un crecimiento de 18 horas a 37°C.
7. Control positivo <i>K. pneumoniae</i> , ATCC BAA 1705 con un crecimiento de 18 horas a 37°C.
8. Hisposos estériles, asa estéril de 10 ul.

PROCEDIMIENTO:

1. En 2 ml de solución salina agregar una asada de 1 ul de la cepa *E. coli* ATCC® 25922
2. Embeber un hisopo estéril con la suspensión obtenida e inocular en una placa de Agar Mueller-Hinton como se realiza para la prueba de difusión de disco.
3. Dejar secar la placa por 3 a 10 minutos antes de aplicar el disco (de ertapenem o meropenem de 10 µg).
4. Colocar el disco en el centro de la placa Petri, aplicar presión suavemente con una pinza estéril, sin mover el disco de su posición para asegurar el contacto completo del disco con el agar.
5. Usando un asa o hisopo estéril seleccione de tres a cinco colonias de la Cepa problema e inocular en línea recta desde el borde del disco hasta el borde de la placa Petri, la estría debe tener de 20 a 25 milímetros de largo.
6. Realizar el mismo procedimiento para el control positivo y el control negativo.
7. Incubar a 37 °C de 18 a 20 horas.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO

Resultado positivo: Se observará la formación de una punta de flecha, esto debido al crecimiento *Escherichia coli* ATCC 25922 en la intersección

del halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa productora de carbapenemasa.

Resultado negativo: No se observará la formación de una punta de flecha, debido a que no se encuentra presente la carbapenemasa y por consiguiente se inhibe la cepa indicadora ATCC 25922.

▪ **MÉTODO MODIFICADO DE INACTIVACIÓN DE CARBAPENEMES (MCIM – MODIFIED CARBAPENEM INACTIVATION METHOD)**

MATERIALES:
1. Patrón 0.5 MacFarlán o turbidímetro
2. Cepa problema con un crecimiento de 18 horas a 37°C.
3. Caldo TSA
4. Discos de meropenem de 10 µg
5. Agar Mueller-Hinton
6. Cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 con un crecimiento de 18 horas a 37°C.
7. Hisopos estériles, asa estéril 10 ul.

PROCEDIMIENTO:

1. Prepara una solución estandarizada al 0.5 MF con la cepa problema en solución salina.
2. Colocar un disco de meropenem, dentro de la suspensión con la cepa problema e incubar por 4 horas.
3. Prepara una solución 0,5 Macfarlán (MF) de la cepa *E. coli* ATCC® 25922 en solución salina.
4. Embeber un hisopo con la suspensión de *E. coli* ATCC® 25922 he inocular en una placa de Agar Mueller-Hinton como se realiza para la prueba de difusión de disco.
5. Dejar secar la placa por 3 a 10 minutos antes de aplicar el disco (disco de meropenem de 10 µg).

6. Luego de las 4 horas remover el disco de meropenem de manera aséptica y colocar sobre una placa de Agar Mueller-Hinton previamente inoculada con una suspensión estandarizada de *Escherichia coli* ATCC25922. No colocar más de 4 discos de meropenem en las placas de 100mm y 8 discos en las placas de 150mm.
7. Incubar la placa Petri a 37 °C, de 18 – 24 horas.

Interpretación de los resultados:

Carbapenemasa positivo: halo entre 6-15mm, o 16-18 mm con colonias intra- halo.

Carbapenemasa negativo: halo \geq 19 mm.

Indeterminado: halo entre 16-18 mm, o \geq 19 mm con colonias intra- halo.

▪ **MÉTODO DE SINERGIA DE DISCO CON ÁCIDO FENILBORÓNICO**

MATERIALES:
1. Agar Mueller-Hinton
2. Patrón 0.5 MacFarlán o turbidímetro
3. Solución salina o caldo Mueller-Hinton
4. Disco imipenem de 10 μ g
5. Disco meropenem 10 μ g
6. Disco con ácido Fenilborónico 300 μ g
7. Cepa problema con un crecimiento de 18 horas a 37°C
8. Control positivo <i>K. pneumoniae</i> , ATCC BAA 1705 con un crecimiento de 18 horas a 37°C
9. Control negativo <i>K. pneumoniae</i> , ATCC BAA 1706

Procedimiento:

1. Prepara una solución 0,5 Macfarlán (MF) de la cepa problema en solución salina o caldo Mueller-Hinton.

2. Sumerja un hisopo estéril en el inóculo, rote entre las paredes para eliminar el exceso de líquido.
3. Sembrar en el agar Mueller-Hinton en tres direcciones diferentes para asegurar la distribución uniforme del inóculo.
4. Dejar secar la placa de 3-10 minutos antes de aplicar los discos
5. Utilizando pinzas estériles, coloque el disco de ácido borónico en el medio del agar y a los costados los discos de imipenem y meropenem a una distancia de 24 mm.
6. Coloque también un disco imipenem en combinación con ácido borónico.

Interpretación de los resultados:

Se considera positivo al observar sinergia o ensanchamiento del halo de inhibición entre los discos de carbapenémicos y ácido fenilborónico en forma de huevo.

▪ **MÉTODO DE SINERGIA DE DOBLE DISCO CON EDTA**

MATERIALES:
Agar Mueller-Hinton
Patrón 0.5 Macfarlán o turbidímetro
Solución salina o caldo Mueller-Hinton
Discos de imipenem y meropenem de 10 µg
Cepa problema con un crecimiento de 18 horas a 37°C.
Disco de EDTA

Procedimiento:

1. Prepara una solución 0,5 Macfarlán (MF) de la cepa problema en solución salina o caldo Mueller-Hinton.
2. Sumerja un hisopo estéril en el inóculo, rote entre las paredes para eliminar el exceso de líquido

3. Sembrar en el agar Mueller-Hinton en tres direcciones diferentes para asegurar la distribución uniforme del inóculo
4. Dejar secar la placa de 3-10 minutos antes de aplicar los discos
5. Colocar el disco de EDTA en medio de la placa y los discos de imipenem y meropenem a 15 mm de distancia del disco de EDTA.

Interpretación de los resultados:

Se considera positivo si se observa sinergia o ensanchamiento del halo de inhibición entre el disco de los carbapenémicos y el disco de EDTA en forma de brazo abierto.

▪ **BLUE-CARBA**

MATERIALES:

Reactivo de azul de bromotimol

Reactivo Sulfato de Zinc Heptahidratado

Imipenem (imipenem + Cilastatina o Tienen-MSD)

100 ml de agua estéril ajustada a pH 7.0

Procedimiento

Preparación de la solución A

Pesar 40 mg de azul de bromotimol y disolverlo en 100 ml de agua destilada, homogenizar por 15 min. Añadir gradualmente Hidróxido de sodio (NaOH 1N) para ajustar el pH de la solución a 7.0 y homogenizar nuevamente.

Pesar 1.6 mg de Sulfato de Zinc Heptahidratado ($ZnSO_4 + 7H_2O$), añadir a la solución y homogenizar, este reactivo no varía el pH.

Preparación de la solución B

Pesar 6 mg de Imipenem/Cilastatina por cada 1 mililitro de solución A

Para 3ml se solución A corresponde 18 mg de Imipenem/Cilastatina.

Añadir y homogenizar de 2 a 3 minutos.

Verificar que el color se mantenga una vez añadido el imipenem.

La solución B se puede almacenar en refrigeración hasta por 2-3 semanas.

Ensayo del Test Bioquímico de Blue-CARBA

1. Añadir 100 mL de la solución B en dos viales para control positivo y negativo, así mismo añadir 100mL para la muestra problema.
2. Cargar empleando un asa descartable de 1 ul completa de colonias *Escherichia coli* ATCC25922, como control negativo.
3. Homogenizar completamente la muestra en la solución, retirar el asa y tapar el vial.
4. Cargar empleando un asa descartable de 1 ul completa de colonias *K. pneumoniae*, ATCC BAA 1705, como control positivo, homogenizar.
5. El control positivo presentara un color amarillo en el lapso de 5 -15 min.
6. El control negativo conservara su color.
7. En el tubo restante añadir la cepa problema, luego encubar a 37 °C por 2 horas como máximo. Es necesario homogenizar cada 15 minutos durante dos veces.
8. Las lecturas de las reacciones se deben realizar cada 5 minutos.
9. Para la interpretación final de los resultados considerar la siguiente tabla:

Interpretación de los resultados fenotípicos

Tubo Control	Tubo de reacción	Interpretación
Azul	Amarillo	Test positivo productora de Carbapenemasas

Verde	Amarillo	Test positivo productora de Carbapenemasas
Azul	Azul	Test negativo no productora de Carbapenemasas
Amarillo	Azul/verde/amarillo	Test Invalido

▪ **TEST DE INMUNOCROMATOGRFÍA DE FLUJO LATERAL CORIS**

Es una prueba sencilla, basada en una tecnología de membranas con nano partículas de oro coloidal.

Este test está desarrollado para detección de carbapenemasas a partir del aislamiento de una sola colonia del cultivo primario.

Identifica: OXA-48, KPC, NDM y VIM e IMP. Mediante la sensibilización de una membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo monoclonal dirigido contra las carbapenemasas.

MATERIALES:

- El Kit contiene 2 cartuchos de flujo lateral y un desecante, cada cartucho contiene una tira sensible.
- Un tampón LY-A 15ml.
- Tubos desechables semirrígidos con gotero para recoger la muestra

PREPARACIÓN DE LA PRUEBA

1. La muestra problema debe tener una temperatura de 15-30°C.
2. Prepare un tubo semirrígido y añadir 12 gotas de tampón.
3. Obtener las colonias de la muestra problema con un asa bacteriológica. Introducir el asa bacteriológica hasta el fondo del tubo semirrígido que contiene el tampón.
4. Homogenizar bien antes de retirar el asa.
5. Insertar el gotero al tubo con la solución.
6. Agitar la solución para homogenizarla.
7. Agregar 3 gotas de la solución al pocillo de los dos cartuchos
8. Cartucho 1: NDM, KPC y OXA-48
9. Cartucho 2: IMP y VIM

10. Hacer la lectura en un máximo de 15 min.

Interpretación de los resultados:

Resultado negativo de la prueba: Da una sola línea de color rojo purpura, en la línea del control.

Resultado positivo de la prueba: Da una de color rojo purpura, en la línea del control y se hace visible otra línea roja purpura en alguna de las líneas de las pruebas.

Resultado invalido: Cuando no aparece la línea roja purpura en el control.

3.7.2. Descripción de instrumentos

Para el estudio de investigación, se elaborarán fichas Microbiológicas para la recolección de datos (**ANEXO 2**).

3.7.3. Validación

Para documentar la evidencia sobre la validez diagnóstica de los métodos fenotípicos y del kit de detección de carbapenemasas (KPC, IMP, NDM, VIM y OXA-48) por Inmunoensayo de flujo lateral (inmunocromatografía). Se llevará a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva en las plataformas: PubMed, Biblioteca Cochrane y LILACS. Asimismo, Se contará con el apoyo de profesionales acreditados como evaluadores.

3.7.4 Confiabilidad

No aplica test de confiabilidad ya que el instrumento es una ficha de recolección de datos, dichos datos están respaldados por el hospital.

Validación del juicio de expertos

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

Para el estudio se utilizaron la data del hospital HNAL, los resultados fueron comparados con el programa Excel, para determinar la estadística descriptiva y así alcanzar la validación de los métodos utilizados en este estudio.

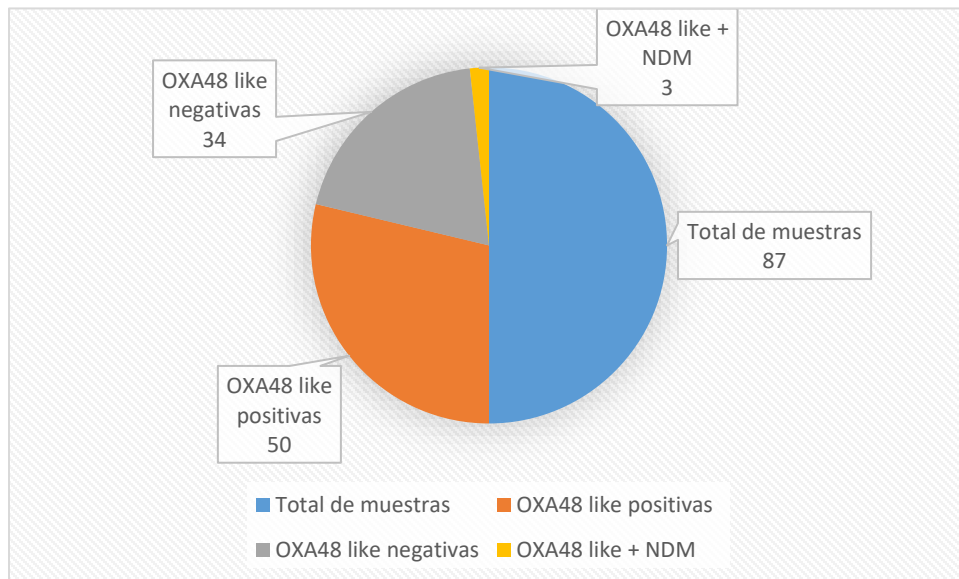
3.9. Aspectos éticos

Esta investigación fue elaborada con resultado obtenidos de la base de datos del sistema y las historias clínicas, por lo tanto, no se necesitó de consentimiento informado, pero se contó con autorización del hospital para acceder a la información. Los datos obtenidos serán empleados únicamente para este proyecto, en estricta concordancia con los principios éticos de la investigación.

PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Análisis descriptivo de los resultados

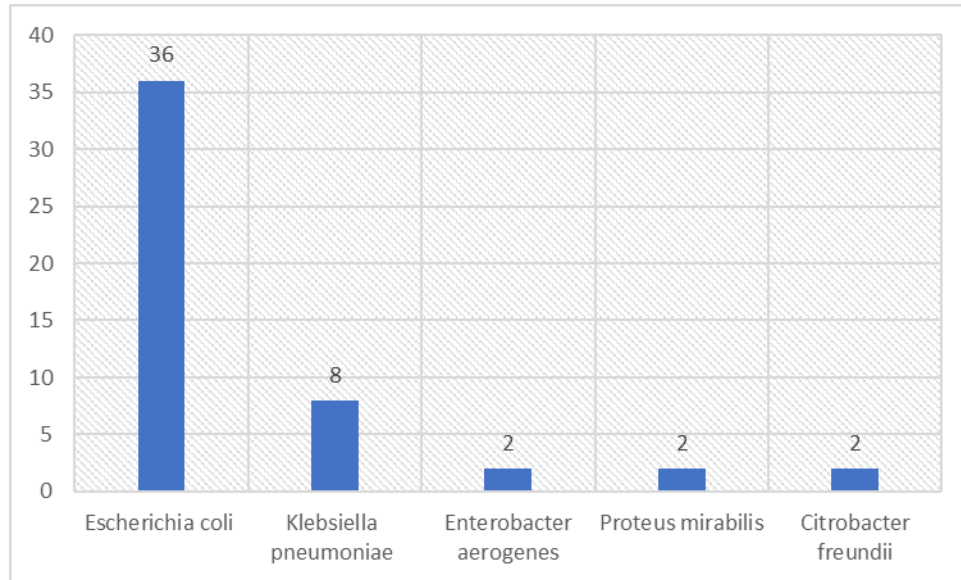
Tabla 1: Frecuencia de bacterias productoras OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima en los meses de octubre a diciembre 2024.



Fuente: muestras obtenidas del servicio de microbiología, Hospital nacional arzobispo Loayza, 2024.

Según los resultados obtenidos en la tabla N° 1, se puede observar que en los 3 meses estudio se obtuvo un total de 87 muestras positivos para carbapenemasas, de los cuales 50 fueron muestras positivas para OXA-48-like, 3 presentaban doble carbapenemasa OXA48like + NDM y 34 negativas.

Tabla N° 2: Especies bacterianas identificadas con el fenotipo de resistencia OXA-48_{like}, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima en los meses de octubre a diciembre 2024.



Fuente: muestras obtenidas del servicio de microbiología, Hospital nacional arzobispo Loayza, 2024.

Tabla N° 2, se observa que el gen OXA 48_{like} se presenta de acuerdo a su frecuencia en las siguientes bacterias, *Escherichia coli*, 36 (72%), seguida de *Klebsiella pneumoniae*, 8 (16%), *Enterobacter aerogenes* 2 (4%), *Proteus mirabilis*, 2 (4%) y *Citrobacter freundii*, 2 (4%).

Tabla N° 3: Sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos.

Método fenotípico	VP	FN	FP	VN	% Sen	% Esp
THT	45	2	1	5	95.7 (95,5 - 100,0)	83.3 (74,6 - 97.0)
mCIM	49	2	0	2	96 (88,5 - 97,7)	100 (90,5 - 100,0)
Blue carba	46	1	1	5	97.8 (94,2 - 99,8)	83.3 (81.8 - 99.3)

VP: verdadero positivo, FN: falso negativo, FP: falso positivo, VN: verdaderos negativos, Sen: sensibilidad, Esp: especificidad.

En la tabla N° 3, en cuanto a la sensibilidad se puede observar que el Test de Hodge tiene una sensibilidad de 95.7%, el método mCIM tiene una sensibilidad de 96% y el método blue carba tiene una sensibilidad de 97.8%.

En la tabla N° 3, en cuanto a la especificidad se puede observar que el Test de Hodge tiene una especificidad de 83.3%, el método mCIM tiene una especificidad de 100% y el método blue carba tiene una especificidad de 83%.

Discusión de resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo evidenciar que los métodos fenotípicos empleados como el MCIM y el Test de Hodge pueden predecir la presencia de carbapenemasas, el Blue Carba (método fenotípico colorimétrico) es positivo en casi todas las carbapenemasas excepto en las carbapenemasas de tipo OXA 48like dándonos un resultado negativo, debido a que no hidroliza el imipenem (siendo el imipenem el responsable de acidificar el medio, esto da como consecuencia el viraje de color), con respecto al método de sinergia simultanea se pudo evidenciar que los discos de EDTA y APB no presentaron sinergia con los carbapenémicos, descartando la presencia de carbapenemasas de tipo Metalo y KPC, los discos acompañantes como el TPZ y ETP se mostraron resistentes, el disco de CZA fue sensible, mostrando un patrón característico de la enzima OXA 48like, a la par se utilizó la inmunolateralidad como método Gold estándar, el cual dio positivo a todas las cepas testeadas confirmando la presencia del gen OXA 48like.

De acuerdo el objetivo N°2 de nuestro estudio, Mora, et al. Evaluó las infecciones asociadas a carbapenemasas de tipo OXA 48 obteniendo como resultado, que la mayor frecuencia de esta enzima se presenta en *Klebsiella pneumoniae*, 57 (86,5%); *Enterobacter cloacae*, 5 (7,6%); *Escherichia coli*, 3 (4,5%); *Morganella morganii*, 1 (1,5%), concluyendo que el germen más aislado con este gen es *Klebsiella pneumoniae*. En este estudio se observó que la mayor frecuencia del gen OXA 48like se presentó en *Escherichia coli*, 36 (72%), *Klebsiella pneumoniae*, 8 (16%), *Enterobacter aerogenes* 2 (4%) *Proteus mirabilis* 2 (4%), *Citrobacter freundii* 2 (4%). Evidenciándose que la distribución de este gen es variable.

De acuerdo al estudio realizado por Araya, et al. Quien utilizo dos métodos, fenotípicos y genotípico: en este estudio hemos comparado los resultados fenotípicos. Hodge con Tritón (THT), ácido borónico, EDTA, y Blue Carba, se testeo 16 cepas de *Klebsiella pneumoniae* para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana, obteniendo los siguientes resultados, positivas por el test de Hodge THT, pero negativas para el método colorimétrico Blue Carba, no se expresó sinergia con los discos de EDTA y Acido fenilborónico, descartando la presencia de KPC y Metalo carbapenemasas. Mediante el método inmunocromatográfico se detectó el antígeno tipo OXA48. Comparados con los resultados obtenidos en este estudio hallamos similitud, el Test de Hodge positivo, el Blue Carba negativo y la inmunolateralidad positiva para el gen OXA 48ike. Comparando este estudio con el realizado por Parreño, et al, en los antecedentes utilizados, obtenemos los siguientes resultados: de las tres técnicas utilizadas por el autor, este estudio comparo dos, el método de inhibición de discos y el test inmunocromatográfico, por el patrón característicos de las OXA 48like, en el método de discodifusión el autor obtuvo un 62% de sensibilidad, el test inmunocromatográfico obtuvo una sensibilidad de 95%, siendo los resultado similares a los obtenidos en este estudio, tanto en el método de discodifusión donde se obtuvo un 80% de sensibilidad y en el método de inmunocromatografía bilateral obteniendo un 98% de sensibilidad.

Hopkins, et al. Evaluó la sensibilidad y especificidad del método inmunocromatográfico multiplex NG-Test CARBA 5 obteniendo como resultados, que todas las cepas que presentan esta carbapenemasa dan positivo en un tiempo de 2 a 6 min, mostrando un 95% de sensibilidad y especificidad. Siendo los resultados iguales a este estudio. Además, en este estudio se evaluó los métodos fenotípicos obteniendo los siguientes resultados, Test de Hodge tiene una

sensibilidad de 95.7% y especificidad de 83.3%, el método de mCIM tiene una sensibilidad de 96% y especificidad de 100% y em método de blue carba tiene una sensibilidad de 97.8% y especificidad de 83%.

Finalmente, de los métodos fenotípicos y la frecuencia de esta carbapenemasa, se evidencia que estos métodos empleados, si predicen la presencia de la carbapenemasa, se observó en los resultados obtenidos que en su gran mayoría todos siguen un patrón característico sugestivo para OXA48like, respecto a la frecuencia de este gen se puede reflejar que no es tan frecuente, ya que en los tres meses de estudio solo se puedo obtener 53 cepas de los cuales 50 fueron OXAs puras y 3 OXA + NDM.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

1. Con respecto a la frecuencia del gen OXA 48like, en los meses de estudio se obtuvo un total de 53 muestras, de los cuales 50 fueron positivos para OXA 48like y 3 fueron coproductores los cuales tenían una doble carbapenemasa (OXA + NDM).
2. Con respecto a las especiales bacterias identificadas, se observó que la bacteria con el mayor número del gen OXA48like se encuentra en *Escherichia coli*, 36 (72%), seguida de *Klebsiella pneumoniae*, 8 (16%), *Enterobacter aerogenes* 2 (4%), *Proteus mirabilis*, 2 (4%) y *Citrobacter freundii*, 2 (4%).
3. Los métodos fenotípicos utilizados, obtuvieron la siguiente sensibilidad para el Test de Hodge una sensibilidad de 95.7%, para el MCIM, una sensibilidad de 96%, para en blue carba se obtuvo una sensibilidad de 97.8%. concluyendo que los métodos empleados pueden identificar la presencia de carbapenemasas.
4. En cuanto a la especificidad se puede observar que el Test de Hodge tiene una especificidad de 83.3%, el mCIM tiene una especificidad de 100% y el blue carba tiene una especificidad de 83%. Observándose que el MCIM tiene la mayor especificidad. En el método de discodifusión, se evidencio que los discos de EDTA y APB no presentaron sinergia con los carbapenémicos, descartando la presencia de carbapenemasas de tipo Metalo y KPC, los discos acompañantes como el TPZ y ETP se mostraron resistentes, el disco de CZA fue sensible, demostrando el patrón característico de OXA 48like.

Recomendaciones

1. Se recomienda realizar más estudios para poder estandarizar una guía de procedimientos, que ayuden a la identificación de estos tipos de resistencia.
2. Observar patrones característicos de bacterias, que presenten el gen OXA 48like ya que por lo observado en este estudio podemos concluir que en bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras se muestra claramente la resistencia, mientras que en bacterias que presentan el gen Ampc no cumple con este tipo de patrón
3. Se recomienda para estudios posteriores utilizar el disco de temociclina como un marcador fenotípico, debido a que nos ayuda a diferenciar las Blee con hiperproducción de la OXA 48like.
4. Se recomienda utilizar el disco de Avibactam como métodos fenotípicos debido a que es un potente inhibidor de carbapenemasas de tipo OXA 48like.

5. REFERENCIAS

Norah A. Albekairi, Dong-Qing Wei (2025). Elucidating the resistance mechanisms and binding pattern of novel Oxa-48-like carbapenemases covalent inhibitors: A hybrid experimental and in silico approach. *Journal of Molecular Structure*; Volume 1321, Part 4, 5 February 2025. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.140073>

Hernando Parreño, N., Sampere Martínez, A. "Evaluación de dos técnicas fenotípicas y un panel molecular multiplex comercial para la detección de diferentes carbapenemasas." *Revista Española de Quimioterapia* 36.6 (2023): 655.

Araya, I., Roach-Poblete, F., Tapia, T., Rodas, P. I., Villamil, A., Agüero, R. Hormazábal, J. C. "Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo OXA-48 circulantes en Chile." *Revista chilena de infectología* 39.5 (2022): 551-558.

Mora-Guzmán, I., Rubio-Pérez, I., Domingo-García, D., Martín-Pérez, E. "Infecciones asociadas a enterobacterias productoras de carbapenemasas OXA-48 en pacientes quirúrgicos: consumo de antibióticos y evolución de sensibilidades." *Revista Española de Quimioterapia* 33.6 (2020): 448.

Chiou Jiachi, Cheng Qipeng, Tim-fat Shum Perry, Ho-yin Wong Marcus, Edward Wai-chi Chan, Sheng Chen (2021). Structural and Functional Characterization of OXA-48: Insight into Mechanism and Structural Basis of Substrate Recognition and Specificity. *Int J Mol Sci*; 22(21):11480. doi: 10.3390/ijms222111480. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8583920/>

Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. 2018. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 73:3523–3526. <https://doi.org/10.1093/jac/dky342>

12. Pitout, J.; Peirano, G.; Kock, M.M.; Strydom, K.A.; Matsumura, Y. (20189). The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. Clin. Microbiol. Rev. 2019, 33, e00102-19. <http://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>

13. Sehra Gule, Azam Sadiq, Ahmad Sajjad, Ali Amjad, Khan Ibrar, Asad Ullah, Muhammad Waqas, Noor Rehman, Muhammad Absar, Abdulrahman Alshammari, Norah A. Albekairi, Dong-Qing Wei (2025). Elucidating the resistance mechanisms and binding pattern of novel Oxa-48-like carbapenemases covalent inhibitors: A hybrid experimental and in silico approach. Journal of Molecular Structure; Volume 1321, Part 4, 5 February 2025. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.140073>

14. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. (2012). Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother 56:559 –562. <https://doi.org/10.1128/AAC.05289-11>

15. De Jonge, B.L.; Karlowsky, J.A.; Kazmierczak, K.M.; Biedenbach, D.J.; Sahm, D.F.; Nichols, W.W. In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae isolates collected during the INFORM Global Surveillance Study (2012 to 2014). Antimicrob. Agents Chemother. 2016, 60, 3163–3169. <http://doi.org/10.1128/AAC.03042-15>

16. Poirel Laurent, Héritier Claire, Tolün Venus, Nordmann Patrice (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother; 48(1):15-22. doi: 10.1128/AAC.48.1.15-22.2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14693513/>

17. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. (2018). OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 37:587– 604. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3112-7>

18. Chiou Jiachi, Cheng Qipeng, Tim-fat Shum Perry, Ho-yin Wong Marcus, Edward Wai-chi Chan, Sheng Chen (2021). Structural and Functional Characterization of OXA-48: Insight into Mechanism and Structural Basis of Substrate Recognition and Specificity. Int J Mol Sci; 22(21):11480. doi: 10.3390/ijms222111480. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8583920/>

19. CLSI (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

20. EUCAST The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2019). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0. <http://www.eucast.org>.

21. EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. July (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf.

22. Fattouh R, Tijet N, McGeer A, Poutanen SM, Melano RG, Patel SN. (2015). What is the appropriate meropenem MIC for screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in low-prevalence settings? *Antimicrob Agents Chemother* 60:1556 –1559. <https://doi.org/10.1128/AAC.02304-15>

23. Haldorsen B, Giske CG, Hansen DS, Helgason KO, Kahlmeter G, Löhr IH, Matuschek E, Österblad M, Rantakokko-Jalava K, Wang M, Småbrekke L, Samuelsen Ø, Sundsfjord A, NordicAST CPE Study Group. (2018). Performance of the EUCAST disc diffusion method and two MIC methods in detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to meropenem: the NordicAST CPE study. *J Antimicrob Chemother* 73: 2738 –2747. <https://doi.org/10.1093/jac/dky276>.

24. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, Steer JA, Zhang J, Livermore DM. (2010). Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 48:2999 –3002. <https://doi.org/10.1128/JCM.00341-10>

25. Rivera-Izquierdo Mario, Láinez-Ramos-Bossini Antonio J., Rivera-Izquierdo Carlos, Jairo López-Gómez, Nicolás Francisco Fernández-Martínez, Pablo Redruello-Guerrero, Luis Miguel Martín-delosReyes, Virginia Martínez-Ruiz, Elena Moreno-Roldán and Eladio Jiménez-Mejías (2021). OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacterales in Spanish Hospitals: An Updated Comprehensive Review on a Rising Antimicrobial Resistance. *Antibiotics* 1, 10, 89. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010089>
<https://repositoriosalud.es/rest/api/core/bitstreams/53d1021b-fec4-4cd7-ac64-0e42a7a05c89/content>

26. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. (2014). Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79:252–254. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.010>

27. Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, Glupczynski Y. (2015). Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Clin Microbiol* 53:1245–1251. <https://doi.org/10.1128/JCM.03318-14>

28. García-Fernández S, Morosini MI, Gijón D, Beatobe L, Ruiz-Garbajosa P, Domínguez L, Cantón R, Valverde A. (2016). Detection of carbapenemase production in a collection of Enterobacteriaceae with characterized resistance mechanisms from clinical and environmental origins by use of both Carba NP and Blue-Carba tests. *J Clin Microbiol* 54:464 – 466. <https://doi.org/10.1128/JCM.02580-15>

29. Pires J, Tinguely R, Thomas B, Luzzaro F, Endimiani A. (2016). Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods* 122:33–37. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.01.002>

30. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, Decré D, Lavollay M, Podglajen I. 2016. Assessment of carbapenem resistance in

Enterobacteriaceae with the rapid and easy-to-use chromogenic Carba test. *J Clin Microbiol* 54:3065–3068. <https://doi.org/10.1128/JCM.01912-16>

31. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Ferraro MJ, Thomson RB, Jenkins SG, Limbago BM, Das S. (2017). Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 55:2321–2333. <https://doi.org/10.1128/JCM.00193-17>

32. Caméléna F, Cointe A, Mathy V, Hobson C, Doit C, Bercot B, Decré D, Podglajen I, Dortet L, Monjault A, Bidet P, Bonacorsi S, Birgy A. (2018). Within-a-day detection and rapid characterization of carbapenemase by use of a new carbapenem inactivation method-based test, CIMplus. *J Clin Microbiol* 56:e00137-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00137-18>.

33. Muntean MM, Muntean AA, Gauthier L, Creton E, Cotellon G, Popa MI, Bonnin RA, Naas T. (2018). Evaluation of the rapid carbapenem inactivation method (rCIM): a phenotypic screening test for carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 73:900 –908. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx519>

34. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, Plaisance M, Oueslati S, Dortet L, Jousset A, Simon S, Naas T, Volland H. (2018). A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 73:909 –915. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx521>.

35. Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. 2018. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 73:3523–3526. <https://doi.org/10.1093/jac/dky342>

36. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. (2012). Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50:2441–2443. <https://doi.org/10.1128/JCM.01002-12>
37. Burckhardt I, Zimmermann S. (2011). Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 49:3321–3324. <https://doi.org/10.1128/JCM.00287-11>
38. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 53:1731–1735. <https://doi.org/10.1128/JCM.03094-14>
39. Dortet L, Tandé D, de Briel D, Bernabeu S, Lasserre C, Gregorowicz G, Jousset AB, Naas T. (2018). MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: comparison of the commercialized MBT STAR-Carba IVD kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC CARBA NP. *J Antimicrob Chemother* 73:2352–2359. <https://doi.org/10.1093/jac/dky209>
40. Matsumura Y, Pitout JD. (2016). Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Expert Rev Mol Diagn* 16:783–794. <https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1172964>

Anexos

ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título de la investigación: Métodos de Detección Fenotípica e Inmucromatografica para el Diagnostico de OXA-48_{like}, en Cultivos Microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima, 2024

FORMULACION DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	Hipótesis	Variables	METODOLOGIA
<p>PROBLEMA GENERAL</p> <p>¿Cuál la validez diagnostica de los métodos fenotípicos e inmunocromatografía para la identificación de OXA-48like, en cultivos microbiológicos en un Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL</p> <p>Demostrar la validez diagnostica de los métodos fenotípicos e inmunocromatografía para la identificación de OXA-48like, en cultivos microbiológicos en un Hospital de Nivel III-1, Lima 2024</p>	<p>Hipótesis general:</p> <p>No amerita</p>	<p>Variable 1: métodos fenotípicos</p> <p>Dimensiones:</p> <p>Test de Hodge Modificado</p> <p>Método de Inactivación del Carbapenem (mCIM)</p> <p>Método Modificado de Inactivación del Carbapenem (eCIM)</p> <p>Método de sinergia de disco con Ácido Borónico</p> <p>Método de sinergia de doble disco con EDTA</p> <p>Carba NP/Blue carba</p>	<p>Tipo de investigación: aplicado.</p> <p>Método y diseño de investigación: Descriptiva, de corte transversal, Retrospectivo</p> <p>Población: todos los cultivos intrahospitalarios positivo a enterobacterias con sospecha de carbapenemasas que se procesaron en el periodo del estudio</p> <p>Muestra: todos los cultivos intrahospitalarios positivos a carbapenemasas que se procesaron en el periodo del estudio</p>
<p>PROBLEMA ESPECIFICO</p> <p>¿Cuál es la frecuencia de bacterias productoras OXA-48like, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?</p> <p>¿Cuáles son las especies bacterianas identificadas con el fenotipo de resistencia OXA-48like, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?</p> <p>¿Cuál es la sensibilidad de los métodos fenotípicos en comparación con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48like, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?</p> <p>¿Cuál es la especificidad de los métodos fenotípicos en comparación con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48like, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024?</p>	<p>OBJETIVO ESPECIFICO</p> <p>Indicar la frecuencia de bacterias productoras OXA-48like, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.</p> <p>Indicar las especies bacterianas identificadas con el fenotipo de resistencia OXA-48like, en cultivos microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.</p> <p>Comparar la sensibilidad de los métodos fenotípicos con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48like, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.</p> <p>Indicar la especificidad de los métodos fenotípicos en comparación con la inmunocromatografía en la identificación de microorganismos con el fenotipo OXA-48like, Hospital de Nivel III-1, Lima 2024.</p>	<p>Hipótesis nula:</p> <p>No amerita</p>	<p>Variable 2: método inmunocromatográfico.</p> <p>Dimensiones:</p> <p>Determinante antigénico, específico para KPC, OXA-48 y NDM.</p>	

ANEXO 2: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

DATOS GENERALES							
CODIGO DEL PACIENTE	GENERO			EDAD	FECHA		
	Femenino	<input type="checkbox"/>	Masculino	<input type="checkbox"/>			
HISTORIA CLINICA	NUMERO DE EXAMEN			PROCEDENCIA			
DATOS DE LABORATORIO							
TIPO DE EXAMEN							
GERMEN AISLADO							
RECUENTO DE COLONIAS							
RESULTADO DEL CULTIVO				POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO	<input type="checkbox"/>
ANTIBIOGRAMA: INFORMACIÓN DE LA SENSIBILIDAD							
ANTIBIOTICO	INTERPRETACION			VALOR CMI / DISCO DIFUSION			
MÉTODO FENOTÍPICO	CORIS						
INMUNOCROMATOGRAFÍA	OXA	KPC	NDM	VIM	IMP		

Ítem N°	Criterio	Si	No	Observación
1	La información permite dar respuesta al problema	X		
2	El instrumento propuesto responde a los objetivos del estudio	X		
3	El instrumento contiene a las variables de estudio	X		
4	La estructura del instrumento es adecuada	X		
5	El instrumento responde a la operacionalización de la variable	X		
6	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento	X		
7	Los ítems son claros en lenguaje entendible	X		
8	El número de ítems es adecuado para su aplicación	X		

Observación (precisar si hay suficiencia):

-----Hay suficiencia-----

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable [X] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador Dr./ Víctor Raúl Huasmán Cárdenas

DNI:70092305

Especialidad del validador: Laboratorio clínico y anatomía patológica

Fecha: 10/04/2025



Firma del Juez experto

Item N°	Criterio	Si	No	Observación
1	La información permite dar respuesta al problema	x		
2	El instrumento propuesto responde a los objetivos del estudio	x		
3	El instrumento contiene a las variables de estudio	x		
4	La estructura del instrumento es adecuada	x		
5	El instrumento responde a la operacionalización de la variable	x		
6	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento	x		
7	Los items son claros en lenguaje entendible	x		
8	El número de items es adecuado para su aplicación	x		

Observación (precisar si hay suficiencia):

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable [x] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador Mg. Valenzuela Martinez Stefany
DNI:46368715

Especialidad del validador: Laboratorio clínico y anatomía patológica

Fecha: 30/04/2025



Firma del Juez experto

Ítem N°	Criterio	Si	No	Observación
1	La información permite dar respuesta al problema	X		
2	El instrumento propuesto responde a los objetivos del estudio	X		
3	El instrumento contiene a las variables de estudio	X		
4	La estructura del instrumento es adecuada	X		
5	El instrumento responde a la operacionalización de la variable	X		
6	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento	X		
7	Los ítems son claros en lenguaje entendible	X		
8	El número de ítems es adecuado para su aplicación	X		

Observación (precisar si hay suficiencia):

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable [X] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador Mg. Luis Alberto Quintana Alfaro

DNI: 08135723

Especialidad del validador: Tecnólogo Medico

Fecha: 02/08/2025



Firma del Juez experto

ANEXO 3: REQUISITOS DEL HOSPITAL



PERÚ
Ministerio de Salud

Viceministerio de Prestaciones y Aseguramiento en Salud

Hospital Nacional Arzobispo Loayza

Comité de Investigación Institucional (OADEI)

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL (OADEI)

INFORME DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

INFORME DE EVALUACION N° -CII-HNAL/2025

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Sánchez Alejos Cristofer Enrique

TITULO DEL PROYECTO: Métodos de Detección Fenotípica e Inmucromatografica para el Diagnostico de OXA-48like, en Cultivos Microbiológicos, Hospital de Nivel III-1, Lima, 2024

REVISOR: Dr. Carlos Cruzado Grau

Dr. LUIS NOVOA MILLONES
Presidente del Comité de Investigación Institucional
Presente. -

Por medio de la presente informo a Ud. que he Evaluado el proyecto de Investigación de la referencia, el cual ha sido calificado como:

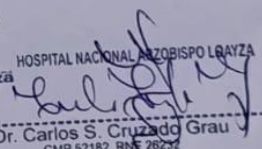
PROYECTO:

- APROBADO

Atentamente

Lima, 08 de Junio del 2025


MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL ARZOBISPO LOAYZA
Dr. LUIS EDMUNDO NOVOA MILLONES
Presidente
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL
C. M. P. 59078 R.S.M.D. 29816
PRESIDENTE CII


HOSPITAL NACIONAL ARZOBISPO LOAYZA
Dr. Carlos S. Cruzado Grau
CMP 52182 RNE 26232

Firma y Sello de
Revisor

Aprobación	OADEI	64
------------	-------	----

Firma y sello
JEFE OADEI



Hereby Certifies that

**CRISTOFER ENRRIQUE
SANCHEZ ALEJOS**

has completed the e-learning course

**ICH GOOD CLINICAL
PRACTICE E6 (R2)**

with a score of

89%

on

13/05/2025

This e-learning course has been formally recognised for its quality and content by the following organisations and institutions



*This ICH E6 GCP Investigator Site Training meets the Minimum Criteria for ICH GCP Investigator Site Personnel Training identified by **TransCelerate BioPharma** as necessary to enable mutual recognition of GCP training among trial sponsors.*

Global Health Training Centre
globalhealthtrainingcentre.org/elearning

Certificate Number 900220e8-c71f-47ef-a64f-00d4f78284fa Version number 0

ANEXO 4:



Materiales utilizados: Agar Mueller-Hinton, placas Petri y balanza.

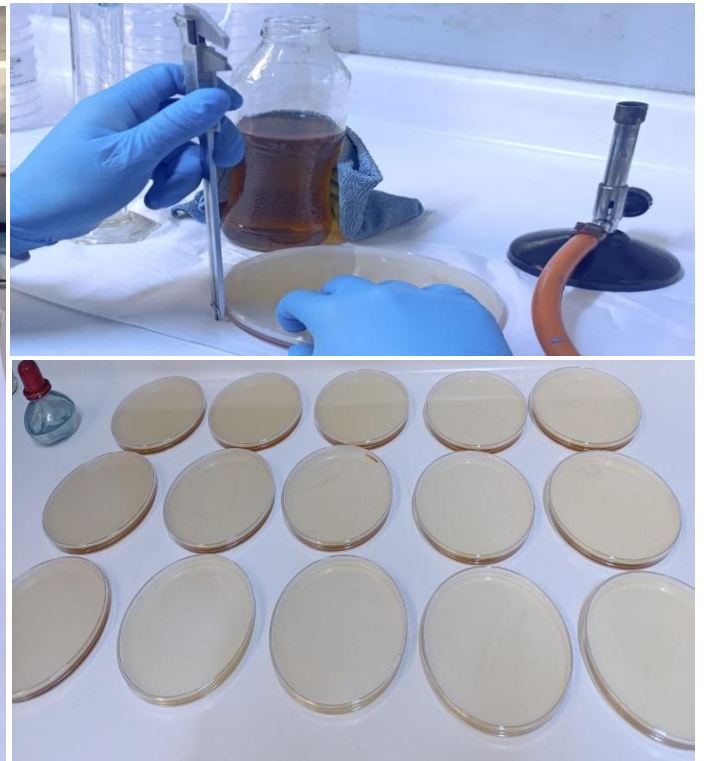


Discos utilizados: MEM, AMC, ETP, TPZ, ATM, FOX, EDTA, APB, IMP y CZA.

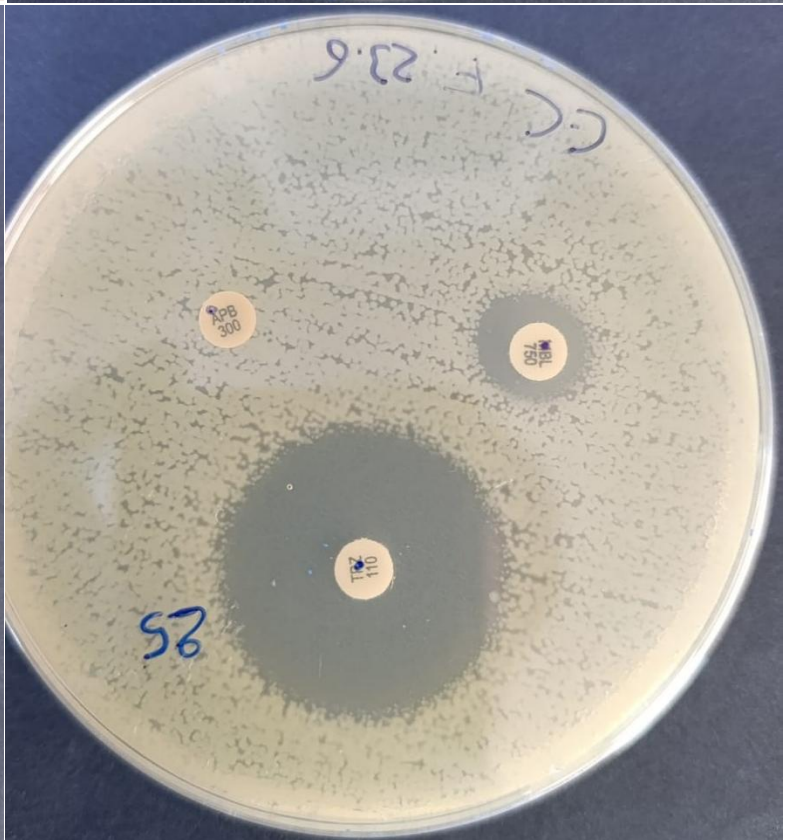
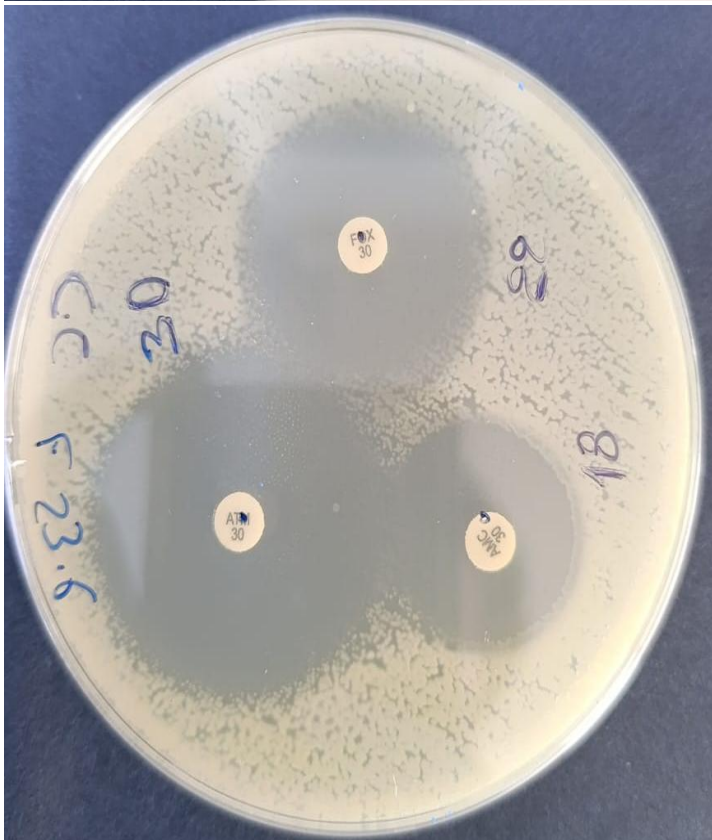
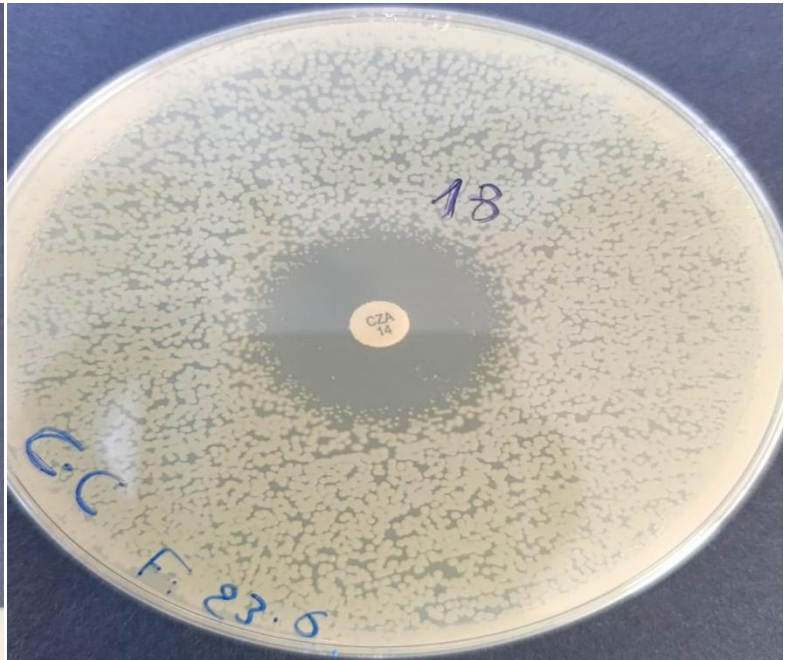
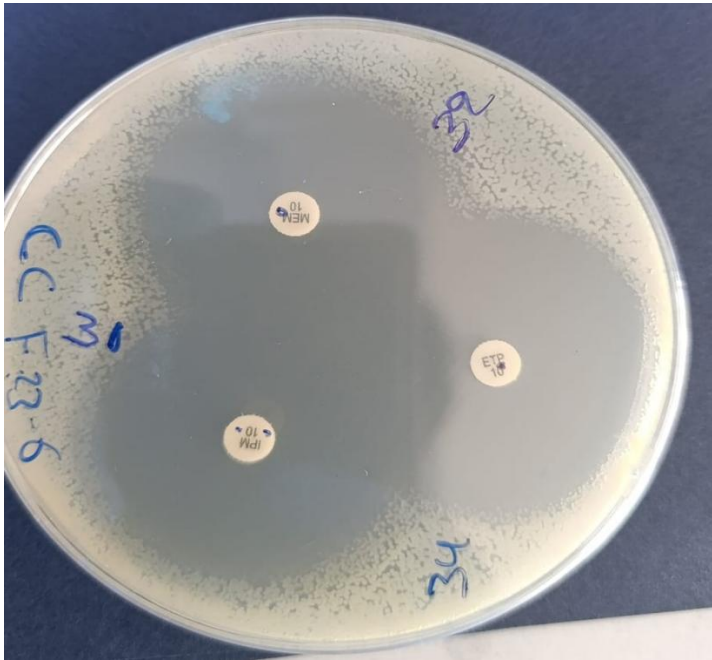


Autoclavado de los medios a utilizar.

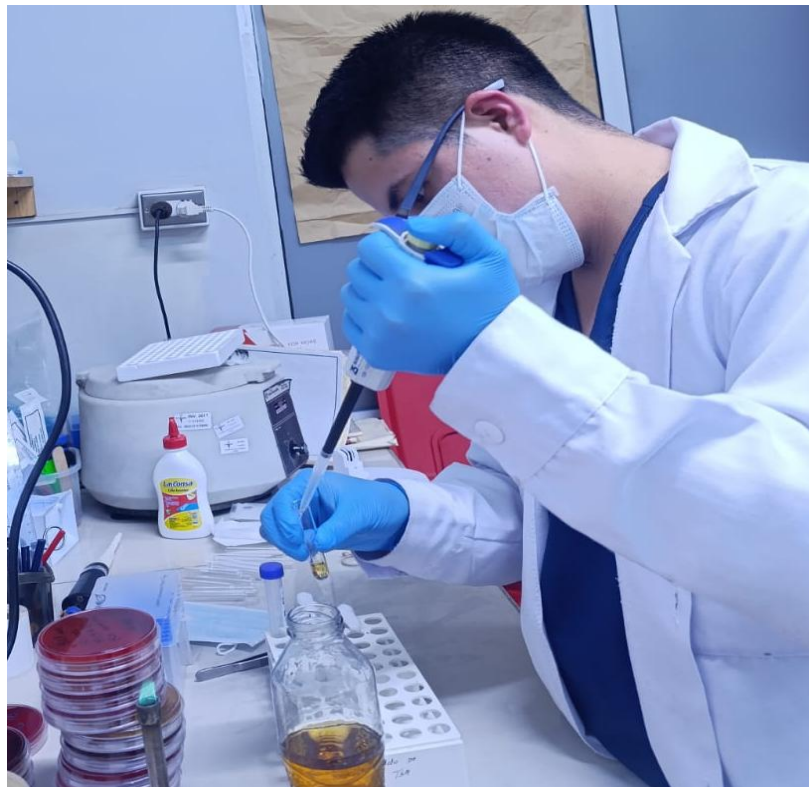
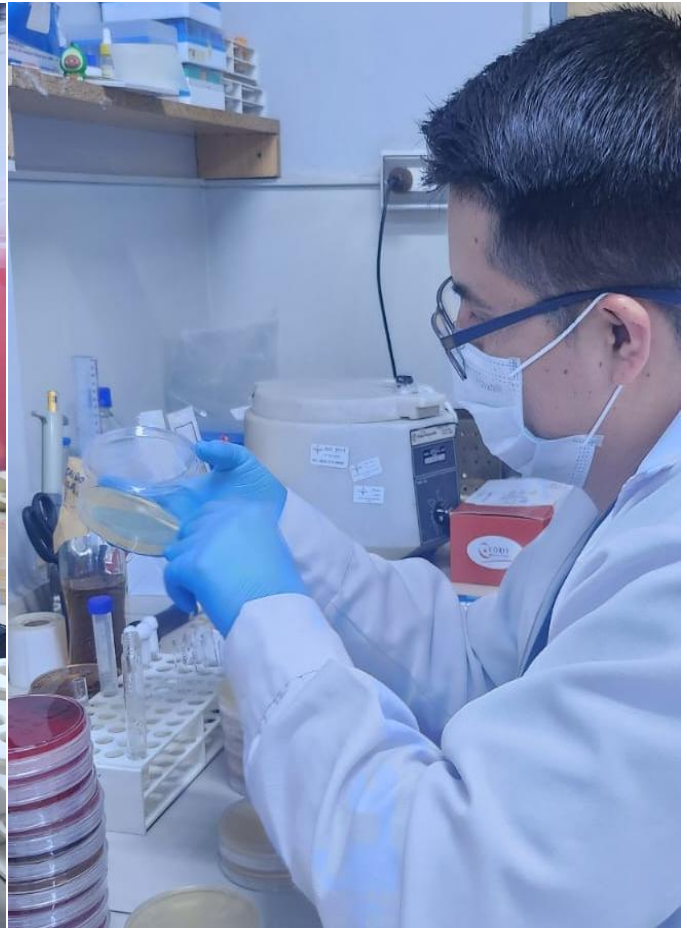
Plaqueado de los medios y su medida a 0.4 cm.



Control de calidad de los discos utilizados, a la cepa control *E. coli* ATCC25922 y al Agar Mueller-Hinton.

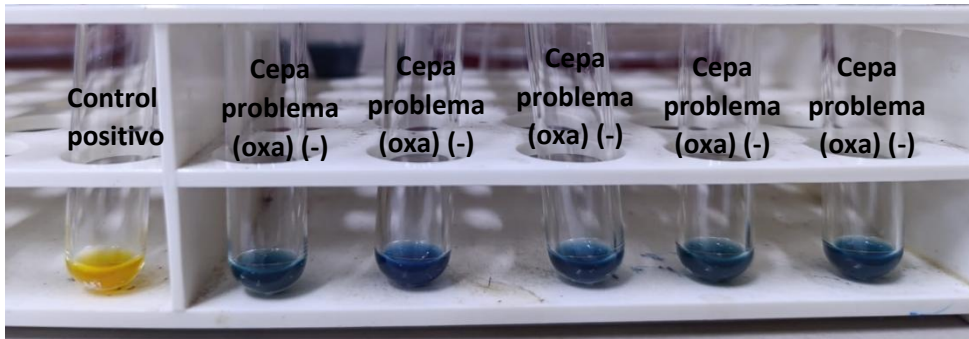


Procedimiento de los métodos.



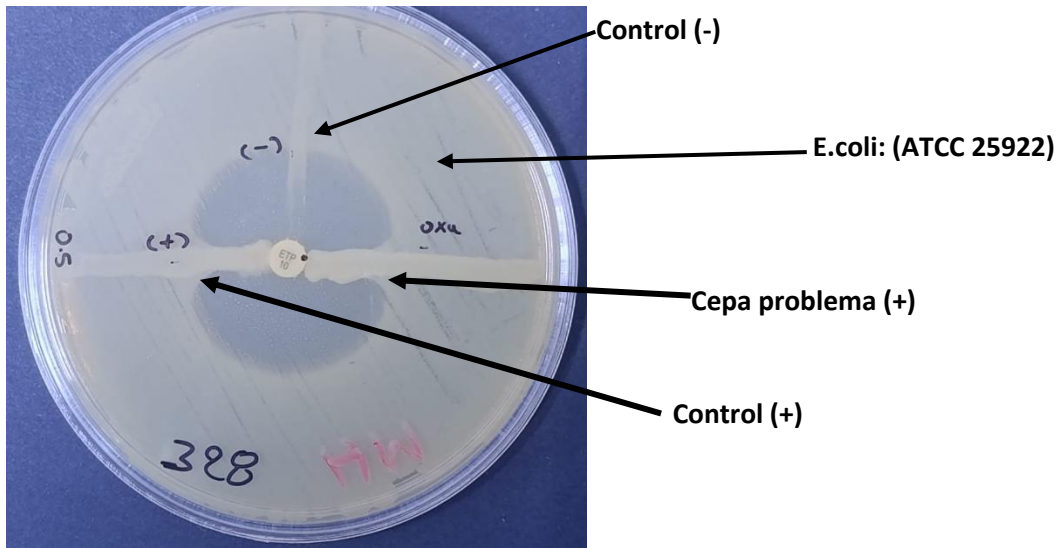
INTERPRETACIÓN DE LOS MÉTODOS

BLUE CARBA: Específico para las carbapenemasas



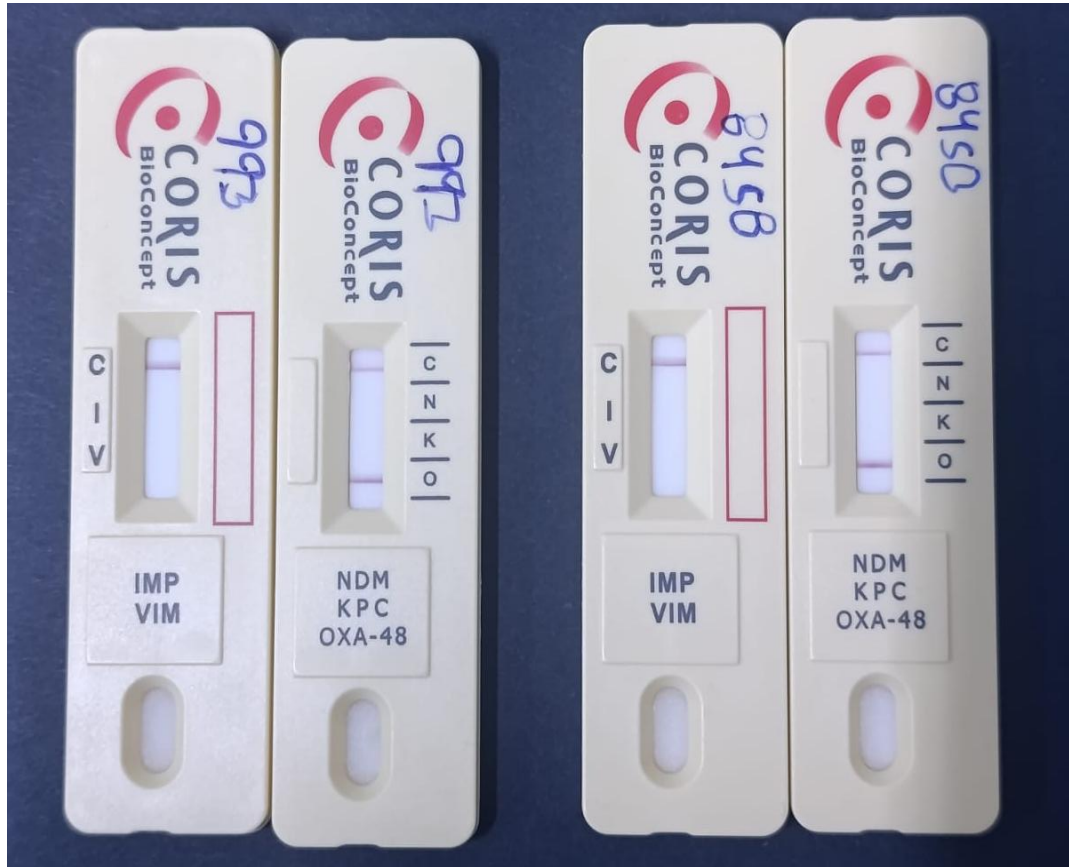
Método colorimétrico, tiene un 95.3% de sensibilidad y un 93% de especificidad, en las carbapenemasas de tipo OXA48like este método es negativo debido a que el gen OXA 48like no hidroliza el imipenem.

TEST DE HODGE:



Método fenotípico que ayuda a predecir la presencia de carbapenemasas, en resultados positivos se observa una punta de flecha, esto debido a que hay un crecimiento del E.coli: ATCC25922, un resultado negativo no se observa la hendidura respectiva.

Inmunolateralidad:



En la imagen se observa positividad para el gen OXA 48like, los resultados son interpretables hasta los 15 min.

● 13% de similitud general

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 12% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

FUENTES PRINCIPALES

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

1	repositorio.uwiener.edu.pe Internet	2%
2	repositorio.essalud.gob.pe Internet	2%
3	repositorio.unfv.edu.pe Internet	1%
4	repositorio.xoc.uam.mx Internet	1%
5	ncbi.nlm.nih.gov Internet	<1%
6	hdl.handle.net Internet	<1%
7	archivosdemedicina.com Internet	<1%
8	revinf.cl Internet	<1%