



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE  
TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO  
Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**“DETECCIÓN FENOTÍPICA DE METALOBETALACTAMASAS EN  
*Pseudomonas aeruginosa*, AISLADAS EN CLÍNICAS PRIVADAS  
DE LIMA, PERIODO 2016 - 2017”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO TECNÓLOGO  
MÉDICO EN EL ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y  
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**CARMEN VIOLETA, CÓRDOVA RAMÍREZ**

**ASESOR:**

**LIC. PILAR, ALVA BETALLELUZ**

**Lima, Perú**

**2017**

# HOJA DE APROBACIÓN

CARMEN VIOLETA, CÓRDOVA RAMÍREZ

**“DETECCIÓN FENOTÍPICA DE METALOBETALACTAMASAS EN  
*Pseudomonas aeruginosa*, AISLADAS EN CLÍNICAS PRIVADAS  
DE LIMA, PERIODO 2016 - 2017”**

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del Título de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Alas Peruanas

---

---

---

LIMA – PERÚ

2017

Se dedica este trabajo:

A Dios, por darme la fuerza, la salud y por siempre iluminarme.

A mis hijos, mi eterna inspiración, son los que me dan la fortaleza para continuar en esta constante lucha, a Wilson por brindarme siempre su apoyo.

A mis padres y hermanos, que siempre me brindaron su apoyo incondicional, que siempre estuvieron allí, para darme el aliento que necesitaba.

Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta Tesis:

A Dios, a mi familia y amigos que de una u otra forma me brindaron su apoyo para concluir con mi tesis.

A la Dra. Ana Prada jefa del servicio de Microbiología del laboratorio donde ejecuté mi proyecto.

A mis asesores y profesores, gracias por su paciencia dedicación, motivación y criterio que han hecho menos complicado poder desarrollar mi tesis.

**EPÍGRAFE:**

Uno de los primeros deberes del médico es educar a las masas para evitar que tomen medicina.

William Osler

29 diciembre de 1919

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas (MBLs) en *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), aisladas en Clínicas Privadas; según tipo de muestra, procedencia y diferentes servicios asistenciales.

**Material y Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo de tipo transversal, en 300 cepas consecutivas y no repetitivas de *P. aeruginosa*, aisladas entre el periodo de abril 2016 a julio 2017, en Lima (Perú). De las cuales 89/300, (29,7%) aislamientos cumplieron el criterio de inclusión. La ejecución se desarrolló en un laboratorio particular de Miraflores. En el procedimiento se emplearon tres métodos para la detección de la enzima MBLs: Prueba de sinergia de doble disco, Prueba de disco combinado con inhibidor (EDTA) y test de Hodge Modificado (cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603). **Resultados:** De las 89 cepas, 53 fueron productoras de MBLs (59,6%), 53 fueron positivos a la Prueba de Sinergia de doble disco (59,6%), 39 lo fueron a la Prueba de Disco Combinado con inhibidor (EDTA) (43,8%) y 52 resultaron positivas al Test de Hodge Modificado (58,4%). De los 36 aislamientos no productores de Metalobetalactamasas, 5 dieron positivo al Test de Hodge Modificado, probable carbapenemasa tipo KPC u OXA. **Conclusiones:** El resultado de este estudio detalla un incremento significativo de las enzimas MBLs en muestras clínicas que perfila una alarma y preocupación en la terapia de diferentes infecciones intra y extrahospitalaria, se recomienda concientizar a la población en general para el buen uso de los antimicrobianos y de esta manera lograr disminuir estos mecanismos de resistencia, que deja sin alternativa terapéutica a los pacientes infectados por esta bacteria multirresistente.

**Palabras claves:** *Pseudomonas aeruginosa*, Metalobetalactamasa, Imipenem, Meropenem, Método fenotípico.

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the phenotypic frequency of metallo- $\beta$ -lactamase (MBLs) in *Pseudomonas aeruginosa*, isolated in Private Clinics; According to type of sample, source and different care services. **Material and Methods:** A cross - sectional descriptive study was carried out in 300 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from April 2016 to July 2017 in Lima, Peru. Where 89/300, (29, 7%) strains of *Pseudomonas aeruginosa* met the inclusion criteria. That execution was developed in a private laboratory in Miraflores. Three methods were performed for the detection of the enzyme MBLs: Double Disc Synergy Test, Combined Disc Test with Inhibitor (EDTA) and Modified Hodge Test (strain *K. pneumoniae* ATCC 700603). **Results:** Of the 89 strains, 53 were MBLs producers (59.6 %), 53 were double-disc Synergy Test (59, 6%), 39 were to the Combined Disc Test with inhibitor) (43,8%) and 52 were positive to the Modified Hodge Test (58.4%). Of the 38 isolates are not producing Metallo- $\beta$ -lactamase (45, 0%), 5 tested positive for Modified Hodge, likely carbapenemase type KPC. **Conclusions:** The results of this study details a large increase of MBLs enzyme in clinical samples that shows a great alarm and concern in the therapy of different intra and extra hospital infections, therefore; it is recommended to raise awareness in the general population for the good use of antimicrobials so we decrease these mechanisms of resistance, which leaves without alternative therapeutics for this multiresistant bacteria.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, metallo- $\beta$ -lactamase, Imipenem, Meropenem, Phenotypic method.

## ÍNDICE

<b>CARÁTULA</b> .....	01
<b>HOJA DE APROBACIÓN</b> .....	02
<b>DEDICATORIA</b> .....	03
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	04
<b>EPÍGRAFE</b> .....	05
<b>RESUMEN</b> .....	06
<b>ABSTRACT</b> .....	07
<b>ÍNDICE</b> .....	08
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	09
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	
1.1. Planteamiento del Problema.....	14
1.2. Formulación del Problema.....	16
1.2.1. Problema General.....	16
1.2.2. Problemas Específicos.....	16
1.3. Objetivos.....	17
1.3.1. Objetivo General.....	17
1.3.2. Objetivos Específicos.....	18
1.4. Justificación.....	18
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	
2.1. Bases Teóricas.....	20
2.2. Antecedentes.....	39
2.2.1. Antecedentes Internacionales.....	39
2.2.2. Antecedentes Nacionales.....	42
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b>	
3.1. Diseño del Estudio.....	44
3.2. Población.....	44
3.2.1. Criterios de Inclusión.....	44
3.2.2. Criterios de Exclusión.....	44
3.3. Muestra.....	45
3.4. Operacionalización de Variables.....	45
3.5. Procedimientos y Técnicas.....	46
3.6. Plan de Análisis de Datos.....	49
<b>CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	
4.1. Resultados.....	50
4.2. Discusión.....	62
4.3. Conclusiones.....	65
4.4. Recomendaciones.....	66
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>ANEXOS</b> .....	71
<b>MATRIZ DE CONSISTENCIA</b> .....	75



## LISTA DE TABLAS

Tabla N°1: Características funcionales y moleculares de los principales grupos de $\beta$ -lactamasas.....	30
Tabla N°2: Clasificación general de las carbapenemasas.....	32
Tabla N°3: Distribución de la población.....	50
Tabla N°4: Frecuencia fenotípica de MBLs en <i>P. aeruginosa</i> .....	52
Tabla N°5: Métodos fenotípicos de MBLs en <i>P. aeruginosa</i> .....	53
Tabla N°6: Coincidencia de métodos fenotípicos de MBLs en <i>P. aeruginosa</i>	54
Tabla N°7: Comparación de métodos fenotípicos de MBLs en <i>P. aeruginosa</i>	55
Tabla N°8: Distribución según tipo de muestra.....	56
Tabla N°9: Distribución de MBLs, según tipo de muestra.....	57
Tabla N°10: Distribución según su procedencia.....	58
Tabla N°11: Frecuencia de aislamientos según los diferentes servicios asistenciales.....	59

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Distribución de la población.....	50
Gráfico N° 2: Frecuencia fenotípica de MBLs en <i>P. aeruginosa</i> .....	52
Gráfico N° 3: Métodos fenotípicos de MBLs en <i>P. aeruginosa</i> .....	53
Gráfico N° 4: Coincidencia de métodos fenotípicos de MBLs en <i>P. aeruginosa</i> .....	54
Gráfico N° 5: Comparación de métodos fenotípicos de MBLs en <i>P. aeruginosa</i> .....	55
Gráfico N° 6: Distribución según tipo de muestra.....	56
Gráfico N° 7: Distribución de MBLs, según tipo de muestra.....	57
Gráfico N° 8: Distribución según su procedencia.....	58
Gráfico N° 9: Frecuencia de aislamientos según los diferentes servicios asistenciales.....	59

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo que ha sido aislado en una variedad de ambientes y superficies, al igual que es considerado como parte de la microflora normal en individuos sanos. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista y uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones intrahospitalarias, sobretodo en pacientes predispuestos, pacientes inmunosuprimidos, con alteraciones de las barreras físicas (quemaduras, cirugía, lesiones oculares, procedimientos invasivos) y las enfermedades subyacentes, como fibrosis quística y diabetes mellitus. Pueden causar infección en pacientes con: Neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel y de tejidos blandos. Siendo común su aislamiento en pacientes de unidades de cuidados intensivos. *P. aeruginosa* se caracteriza por la supervivencia durante periodos largos de tiempo en fómites con escasas fuentes alimenticias como: aires acondicionados, ventiladores, soluciones de limpieza, jabones líquidos, agua, antisépticos, equipos médicos como fibrobroncoscopios. Las opciones terapéuticas en *P. aeruginosa* comúnmente son escasas debido a que esta bacteria posee una resistencia intrínseca a un grupo de drogas y además tiene la capacidad de adquirir resistencia contra varias clases de drogas. Dicha bacteria reúne mecanismos de virulencia y panresistencia más graves (1 - 6).

El tratamiento de elección para infecciones causadas por *P. aeruginosa* son los carbapenémicos, como el meropenem e imipenem. No obstante, el gran aumento alarmante en todo el mundo y en América Latina, considerando a

Perú, donde la prevalencia de infecciones causadas por *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos se ha incrementado más rápidamente con respecto a otras regiones, genera una gran preocupación.

Las Metallo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) han surgido como uno de los primordiales mecanismos de resistencia adquirida en *P. aeruginosa*. Son las carbapenemasas de mayor variedad molecular, representando una gran amenaza clínica, lo cual conlleva a un riesgo epidemiológico provocado por la gran capacidad de hidrolizar todos los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo a los carbapenem (7).

Once tipos de enzimas MBLs en diversos microorganismos han sido identificados, la gran mayoría en *Pseudomonas spp.* Los genes de adquisición de MBLs se encuentran ubicados en integrones o insertados en elementos genéticos móviles como los plásmidos o transposones. La detección es complicada con el incremento de casos en todo el mundo y la diseminación de MBLs.

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda el Test de Hodge Modificado (MHT), cuando exista sospecha de producción de carbapenemasas. No obstante, CLSI no dispone de una guía para la detección confiable de MBLs.

Existen métodos fenotípicos que se emplean para la detección de MBLs, los cuales se caracterizan por poseer habilidad por agentes quelantes como zinc y compuestos basados en thiol, que inhiben la actividad de las MBLs.

Además se conoce poco acerca de la sensibilidad y especificidad de estos métodos, por lo que este estudio intenta probar las diferentes pruebas

fenotípicas disponibles, para dilucidar y determinar cuál de los métodos, o combinación de métodos, pueden emplearse de forma fiable y efectiva.

Es primordial que los laboratorios de microbiología clínica realicen cotidianamente la búsqueda de carbapenemasas, de esta manera se lograría detectar este principal mecanismo de resistencia, lo que permitirá beneficiar principalmente al paciente y a la comunidad.

Para el desarrollo de este procedimiento se requiere de personal capacitado además de los recursos necesarios que garantice el desenvolvimiento de los procedimientos microbiológicos y el análisis confiable de los resultados (7, 8)

## **CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1.1. Planteamiento del Problema**

En el año 2011, la organización mundial de la salud (OMS) seleccionó la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos como el tema del Día Mundial de la Salud, destacando la necesidad de establecer una estrategia común y de buscar las causas relacionadas con la emergencia y extraordinaria diseminación de bacterias multiresistentes. En el 2012 se publicó el documento "The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action", el cual exhorta la necesidad de revisar el aumento progresivo de bacterias multidrogas resistentes (1).

Los bacilos Gram negativos no fermentadores, son los principales responsables de las infecciones intrahospitalarias a nivel de Latinoamérica. Existe una creciente preocupación debido a los perfiles de resistencia presentados por estos bacilos. Principalmente se observa una resistencia extrema en *P. aeruginosa*(1, 2).

*P. aeruginosa*, manifiesta resistencia elevada a los aminoglucósidos debido a la impermeabilidad de la membrana externa. Aproximadamente el 20 % de los aislamientos recuperados en Argentina en el 2011, presentaron este mecanismo de resistencia. Se ha observado la presencia de casetes cromosómicos que codifican resistencia para aminoglucósidos en los mismo integrones que codifican la síntesis de metalobetalactamasas (MBLs) (2). En el

año 2013 en el servicio de Microbiología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza (HNAL) en Lima – Perú, se aisló por primera vez una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de una carbapenemasa de tipo KPC, la misma que fuera descrita inicialmente en EEUU, y actualmente se encuentra difundida a nivel mundial (3).

El tratamiento contra infecciones por *P. aeruginosa* puede ser muy complicado, ya que conjuntamente con su resistencia natural, puede adquirir mecanismos de resistencia para casi la totalidad de los antimicrobianos que están disponibles para tratamiento de los pacientes, incluso el uso cada vez mayor de los carbapenemes que poseen alta actividad contra *P. aeruginosa*, actualmente ha incrementado la aparición de cepas portadoras de las enzimas MBLs, lo cual es alarmante, debido a que deja sin alternativa terapéutica a los pacientes, ya que este mecanismo imposibilita el uso de todos los antimicrobianos del grupo de los betalactámicos(4). Esta complicación eleva los costos del tratamiento, según informe del Instituto Nacional de Salud, los antimicrobianos representan el 11% de consumo total de fármacos en el Perú, lo cual conlleva a un gasto de más de 65 millones de dólares que aquejan, en primera instancia la economía de los hogares (5).

Por ello es necesaria una política eficiente y responsable de manejo de las terapias antibióticas por parte de los médicos tratantes, y un adecuado sistema de vigilancia y detección de MBLs por parte de los laboratorios. Se conocen algunos métodos fenotípicos para la detección de MBLs en cepas de *P. aeruginosa*, donde se acepta la sensibilidad y especificidad de estos métodos.

Actualmente no se conoce la magnitud de la resistencia en nuestro país, es decir urge conocer la epidemiología de resistencia de la *P. aeruginosa*, la cual se hará mediante la aplicación de 2 métodos utilizados con frecuencia en los laboratorios para detectar fenotípicamente la presencia de MBLs. Las pruebas utilizadas con frecuencia son la prueba de sinergia de doble disco y prueba de discos combinados con inhibidor los cuales son métodos más específicos, de fácil interpretación y lectura (3, 4, 6).

Para obtener resultados confiables es necesario contar con personal capacitado, recursos que garanticen el buen desarrollo de los procedimientos microbiológicos y el análisis fiable de los resultados; logrando la detección oportuna de este mecanismo de resistencia lo que repercutirá directamente en el beneficio del paciente y la comunidad (6).

## **1.2. Formulación del Problema**

### **1.2.1. Problema General:**

¿Cuánto es la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017?

### **1.2.2. Problemas Específicos:**

#### **Problema específico 1**

- ¿Cuánto es la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima,



periodo 2016 - 2017, según tipo de muestra?

### **Problema Específico 2**

- ¿Cuántos es la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según su procedencia?

### **Problema Específico 3**

- ¿Cuántos es la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según los diferentes servicios asistenciales?

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo General:**

Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017.

### **1.3.2. Objetivos Específicos:**

#### **Objetivo específico 1**

- Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según tipo de muestra.

### **Objetivo Específico 2**

- Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según su procedencia.

### **Objetivo Específico 3**

- Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *P. aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según los diferentes servicios asistenciales.

#### **1.4. Justificación**

El reporte mundial y nacional del aumento de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, el incremento de las infecciones graves, como sepsis en la Unidad de cuidados intensivos (UCI) entre otras áreas hospitalarias y el desarrollo de mecanismos de resistencia mediados por enzimas, genera un grave impacto en el ámbito clínico y epidemiológico, por lo que se deben implementar medidas de control para evitar su diseminación. Dado que en el Perú ya tenemos aislamientos de cepas carbapenemasas positivas, es de vital importancia que los laboratorios de microbiología clínica, hagan seguimiento en la búsqueda de MBLs para un eficaz tratamiento antimicrobiano y de esa manera contribuir al control de la resistencia antimicrobiana.

En nuestro país son pocos los estudios realizados para la identificación

fenotípica de estas enzimas, e incluso su identificación a nivel hospitalario en las entidades nacionales y privadas es infrecuente ya que los insumos a utilizar elevan los costos, alarga los tiempos de respuesta y además, de la necesidad de contar personal entrenado. El no hacer una correcta identificación del mecanismo de resistencia, podrían conllevar a fracasos terapéuticos debido al tratamiento medicado equivocado del paciente con infección por *P. aeruginosa*.

El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *P. aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas y demostrar la necesidad de implementar los métodos fenotípicos de manera rutinaria en la lucha contra la resistencia bacteriana, como una alternativa al método Gold estándar por detección genotípica, las cuales resultan muy costosas y difíciles de implementar.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Bases Teóricas**

#### **2.1.1. *Pseudomonas aeruginosa***

La especie *P. aeruginosa* fue descubierta y aislada por primera vez en 1882 por Gessard, en vendajes teñidos de un color azul verdoso, debido a la producción de piocianina. *P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo no fermentador, no esporulado, aeróbico estricto, móvil; el cual se encuentra distribuido en el medio ambiente. Este microorganismo simboliza una alarma para la salud pública debido a su resistencia a los carbapenémicos, por lo que tiene un lugar importante lo cual conlleva una importancia en el plan epidemiológico (7-9). Su aislamiento es infrecuente en muestras clínicas de personas que gozan de buena salud, pero se incrementa cuando se presenta alguna alteración del sistema inmune del hospedero o en alguna barrera física (uso de catéter, sonda o tubo endotraqueal) (7).

*P. aeruginosa* es conocida como un patógeno oportunista asociado a infecciones intrahospitalarias (10), es el segundo patógeno más comúnmente aislado en neumonía hospitalaria, la tercera causa de infección urinaria, y la cuarta causa de infección de herida quirúrgica, además de ser el séptimo microorganismo más comúnmente aislado del torrente sanguíneo, según datos recientes del programa SENTRY (Antimicrobial surveillance Program)(7).

En infecciones adquiridas en la comunidad no es tan común aislar *P. aeruginosa*, sin embargo en la actualidad, los pacientes con SIDA son considerados un grupo de riesgo para infecciones adquiridas en la comunidad (7).

#### **2.1.1.1. Factores de virulencia y Patogénesis**

*P. aeruginosa*, posee factores de virulencia y panresistencia que se consideran actualmente como los más importantes, entre las bacterias patógenas en humanos (2, 10). La presencia de polisacáridos en su membrana externa, dificulta la penetración de fármacos, además carecen de porinas de alta permeabilidad que permitan el ingreso de estos (11).

La existencia de adhesinas conlleva a la colonización de los tejidos, las más representativas son las fimbrias, también existen otras adhesinas que están compuestas por lipopolisacáridos, flagelos, proteínas de la membrana externa y alginato. Las adhesinas, exotoxinas, proteasas, hemolisinas y el sistema de secreción tipo III, son los factores que presentan un rol importante en la patogénesis de *P. aeruginosa*. Es interesante anotar que dicha bacteria no siempre infecta a las personas inmunocompetentes o tejidos que no estén dañados, aun estando presente este grupo de factores de virulencia (7).

Los instrumentales médicos como catéteres, tubos endotraqueales y lentes de contacto son colonizados por *P. aeruginosa* debido a la formación de biofilm, considerándose un papel importante en la patogénesis de dicha bacteria, que favorece a contribuir a la infección de

las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística (7). La transmisión de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos puede producirse tanto por vía endógena como exógena. La transmisión endógena está establecida por la colonización de un germen sensible a múltiples fármacos que se convierte en un germen resistente por la exigencia de uso de antimicrobianos. Johnson, et al., establecieron esta variedad de transmisión como la razón de adquisición de *P. aeruginosa* resistente a imipenem (IPM) en unidades de cuidados intensivos en 19 % de los casos (9).

La vía exógena se encuentra comúnmente asociada a la transmisión a través de las manos contaminadas de los trabajadores de la salud y la contaminación de superficies ambientales o de dispositivos médicos por procesos inapropiados de limpieza y desinfección (9).

### **2.1.2. Mecanismos de Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa***

Debido a la elevada resistencia intrínseca que presenta este microorganismo ante diferentes familias de antimicrobianos, conocemos escasas opciones terapéuticas efectivas para las infecciones causadas por esta bacteria (10). Hasta el momento no existen conceptos definitivos sobre el nivel de resistencia bacteriana y en una diversidad de estudios podemos encontrar como: Multidrogo resistencia MDR (resistencia a todos los fármacos empíricos, con excepción uno o dos, o bien resistencia a más de tres clases de antimicrobianos); extensa-drogo resistencia XDR (resistencia a todos los antibióticos potencialmente efectivos); y pan-drogo

resistencia PDR (resistencia a siete antimicrobianos usados en el tratamiento empírico de primera línea (cefepima, ceftazidima, imipenem, meropenem, piperacilina –tazobactam, ciprofloxacino y levofloxacino)(12). La problemática de las infecciones por *P. aeruginosa*, es la limitación de opciones terapéuticas, lo cual se debe a la incrementada resistencia intrínseca a diferentes familias de antimicrobianos como: aminopenicilinas, aminopenicilinas combinadas con inhibidores, cefalosporinas de 1º y 2º generación, cefamicinas, ertapenem, trimetoprima sulfametoxazol, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, glucopéptidos, antiguas quinolonas, novobiocina y nitrofurantoina. La resistencia antimicrobiana se debe a la presencia de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de tipo AmpC, una membrana poco permeable y un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos que le otorga la denominada impermeability-mediated resistance. También esta bacteria tiene una alta probabilidad de adquirir resistencia a través de variados mecanismo de resistencia llamados antipseudomónicos (7).

La alteración de las bombas de eflujo, como por ejemplo MexAB-OprM involucra la sensibilidad a diversas familias de antimicrobianos simultáneamente, como las penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y MEM. Se observa alteraciones en la permeabilidad a causa de mutaciones en los genes que codifican para las porinas presentes en la membrana externa, las que son primordiales en la resistencia a carbapenemas (13).

La pérdida de OprD, una porina empleada por los carbapenemes y no por otros  $\beta$ -lactámicos, para su ingreso a la célula, se relaciona con resistencia al IPM y sensibilidad reducida al MEM. La resistencia adquirida es consecuencia de una alteración fisiológica o estructural en la bacteria no siendo predecible, pueden o no estar comprometidas alteraciones genéticas. Las alteraciones genéticas que pueden presentarse son: la mutación, transducción, transformación o conjugación. La inducción de un fenotipo puede presentarse, el cual va depender de las condiciones del medio, para mantenerse estable aun cuando el factor de exposición desaparece o es inestable desapareciendo junto con el factor de exposición, esto solo ocurre cuando no hay modificación genética (6,7, 10).

#### **2.1.2.1. Resistencia a los $\beta$ -lactámicos**

La función de los  $\beta$ -lactámicos es impedir la última etapa de la síntesis de peptidoglicano conocida como proteínas ligadoras de penicilina (PenicilinBinding Proteins, PBP) (2, 7).

La actividad antimicrobiana de los  $\beta$ -lactámicos consiste en penetrar la pared celular y atacar las PBP, en el caso de los Gram positivos este método es favorecido por la gran cantidad de peptidoglicano que posee una característica más hidrofílica. Sin embargo en los Gram negativos como *P. aeruginosa* esta técnica se complica, puesto que presenta lipopolisacáridos en su membrana externa lo cual complica el ingreso del fármaco, adicionalmente a ello *P. aeruginosa* no posee porinas de alta



permeabilidad que favorezcan el ingreso del fármaco al interior de la célula. Debido a ello solo algunos  $\beta$ -lactámicos expresan actividad frente a *P. aeruginosa* (2, 7, 13).

### 2.1.2.2. Impermeabilidad

En *P. aeruginosa* observamos que la permeabilidad de su membrana externa para compuestos hidrofílicos es solo 1 – 8 % de la apreciada en *E. coli*; debido a que la composición así como la capacidad funcional de las porinas importantes de *P. aeruginosa* son muy divergentes de las *E. coli* y otras enterobacterias, reduciendo considerablemente el acceso del antimicrobiano (7).

Es precisa la necesidad de porinas específicas, cuando existe baja permeabilidad para poder captar nutrientes. Las porinas en *P. aeruginosa* pueden ser divididas en tres grandes familias: la familia de OprD de porinas específicas (19 miembros), la familia OprM de porinas de eflujo y familia TonB-interacción. Se consideran solo las de tipo OprD importantes en la asimilación de antibióticos (6, 7, 10).

La pérdida de la porina OprD es un significativo mecanismo de resistencia a carbapenemes provocada por la impermeabilidad adquirida. El ingreso del IPM y otros carbapenemes (aun cuando no de otros  $\beta$ -lactámicos) sucede mediante la porina OprD que se encuentra en la membrana externa y es específica para el transporte de aminoácidos dibásicos y glutamato: la similitud estructural entre estos y los carbapenemes justifica la capacidad para penetrar la membrana empleando la OprD. La afinidad

y habilidad de difusión de IPM es por poco 70 veces más alta que la de MEM, lo cual se debe a la naturaleza más hidrofílica de IPM. La carencia de esta porina (junto con la producción AmpC) puede establecer la resistencia a IPM. Por otra parte IPM tiene la destreza de escoger, intratratamiento, cepas con mutaciones en la OprD. La habilidad de esta bacteria para eliminar los antimicrobianos que atraviesan en la misma membrana, utiliza sistemas de expulsión activa, lo cual es tan significativo así como también la baja permeabilidad de su membrana externa (7,13).

### **2.1.2.3. Sistema de eflujo**

Las bombas de eflujo son transportadores de membrana que eliminan de la bacterias sustancias tóxicas, sustancias anfipáticas que podrían destruir la bacteria. Los sistemas de eflujo activos (bombas de eflujo) inherente de la especie manifiestan una amplia especificidad de sustratos, considerando responsables en parte de la resistencia natural en *P. aeruginosa*, dicha bacteria manifestaba estos complejos enzimático, mucho antes de la existencia de los antimicrobianos (7,13). Este complejo llamado MexAB- OprM es uno de los sistema de eflujo, que se expresa en cepas salvajes de *P. aeruginosa*, MexB es una proteína que actúa como bomba en la membrana citoplasmática, OprM es una porina que impulsa la exportación de sustancias localizado en la membrana externa y MexA una proteína ligadora de los dos componentes anteriores ubicada en el espacio periplásmico. Esta bomba tiene la habilidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración  $\beta$ -

lactámicos (excepto IPM), cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetracicilinas y trimetoprim.

La capacidad de MexA-MexB-OprM para eliminar MEM pero no IPM es debido a la diferente estructura que expulsa al exterior al antibiótico y una proteína de fusión de membrana (MFP) encargada de establecer un nexo de unión entre ambas (7,13).

Los sistemas de eflujo se dividen en cinco clases, cuya característica es de poder expulsar los antimicrobianos: la súper familia mayor facilitador (MFS), la familia cassette de unión- ATP (ABC), la familia de resistencia-nodulación-división (RND), la familia pequeña multidroga resistentes (SMR) y la familia de expulsión de competentes tóxicos y multidrogas (MATE). Todas las bombas de expulsión de los carbapenémicos pertenecen a la familia RND, los llamados sistema tripartitos. Un transportador de reflujo ubicado en la membrana citoplasmática, una porina de tipo *channe-tunnel* en la membrana externa que expela al exterior al antimicrobiano y una proteína de fusión de membrana (MFP) encargada de establecer un nexo de unión entre ambas. Los responsables de la impermeabilidad a la mayor parte de los antibióticos se deben a estos sistemas de expulsión (7,13).

Los antimicrobianos específicamente la ciprofloxacina, actúan sobre la bomba de expulsión permitiendo ser estimuladas. También pueden sobreexpresarse estas bombas cuando existe modificaciones mutacionales, inclusive de una base nucleotídica en el ADN cromosómico de la bacteria. Dicha sobreexpresión de MexAB-OprM, involucra la

actividad de quinolonas, penicilinas, cefalosporinas e incluso MEM pero no IPM. El comportamiento de resistencia a quinolonas y algunos  $\beta$ -lactámicos, que involucran a MEM e IPM está relacionado con la sobreexpresión de otra bomba de expulsión, MexEF-OprN. Esta última bomba es considerada de gran importancia ya que su expresión está íntimamente vinculada con el gen Mex T, que también está conectado en la mutación que da lugar a la pérdida de la porina OprD como se apreciará posteriormente. Los  $\beta$ -lactámicos, las quinolonas, el MEM y los aminoglucósidos sin interferir la actividad del IPM son afectados por la sobreexpresión de MexXY-OprM (7,13).

Cuando se observa en un antibiograma resistencia a las penicilinas y cefalosporinas antipseudomonas, además vemos que la sensibilidad es afectada a MEM, IPM o aminoglucosidos, podemos sospechar que la resistencia se deba a un mecanismo mediado por bombas de expulsión, pero va depender de la clase de bomba de expulsión que se presente (13).

#### **2.1.2.4. $\beta$ -lactamasas**

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámicos de los antibióticos, de esta manera destruyen el sitio activo del antimicrobiano e impiden su actividad. Los  $\beta$ -lactámicos para lograr su efecto precisan tener un anillo  $\beta$ -lactámicos intacto. El antimicrobiano es desactivado por la acción de la  $\beta$ -lactamasas el cual produce la rotura del anillo.

Existe subclasificación de  $\beta$ -lactámicos las cuales se determinan por la habilidad de inhibir determinados subgrupos de  $\beta$ -lactámicos que va depender, quien presente mayor sensibilidad a ser atacada por la enzima, las denominadas son: penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam inhiben a la  $\beta$ -lactamasas, aunque no todas son sensibles, ni responden de igual forma esta inhibición (2, 3, 7).

Las  $\beta$ -lactamasas no son tan eficaces frente a las cefalosporinas de 3<sup>o</sup> generación, las cuales manifiestan mayor estabilidad, siendo más efectivas frente a bacterias Gram negativas que a Gram positivas. La ceftazidima, cefalosporina de 3<sup>o</sup> generación, manifiesta mayor efectividad frente *P. aeruginosa* y una cefalosporina de 4<sup>o</sup> generación cefepime que expresa igual eficacia que la ceftazidima frente a *P. aeruginosa*. Estas dos cefalosporinas, ceftazidima y cefepime presentan una estructura bipolar (zwitterion) quiere decir iones bipolares con carga negativa en el ácido carboxílico y carga positiva en el nitrógeno del anillo lateral, lo cual favorece a una penetración más rápida de la membrana de los Gram negativos. Las  $\beta$ -lactamasas no son tan eficaces frente a los carbapenemes ya que no logran hidrolizarlos en su mayoría, los carbapenemes se crean como una alternativa en el tratamiento contra las bacterias multirresistentes (7,13) (Tabla N° 1).

Tabla 1. Características funcionales y moleculares de los principales grupos de  $\beta$ -lactamasas

Bush-Jacoby 2009	Bush-Jacoby-Medeiros 1995	Ambler, 1980	Inhibida por		Características funcionales
			AC	EDTA	
1	1	C	NO	NO	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de penicilinas; hidroliza cefiminas
1e	NI	C	NO	NO	Incrementa hidrólisis de ceftazidima y otras oxanino- $\beta$ -lactámicos
2a	2a	A	SI	NO	Mayor hidrólisis de penicilinas que cefalosporinas
2b	2b	A	SI	NO	Similar hidrólisis de penicilinas y cefalosporinas
2be	2be	A	SI	NO	Mayor hidrólisis de oxanino- $\beta$ -lactámicos (CTX,CAZ,CRO,ATM)
2br	2br	A	NO	NO	Derivadas de TEM resistentes a los inhibidores (IRT)
2ber	NI	A	NO	NO	Mayor hidrólisis de oxanino- $\beta$ -lactámicos combinados con inhibidores
2c	2c	A	SI	NO	Mayor hidrólisis de carbenicilina
2ce	NI	A	SI	NO	Mayor hidrólisis de carbenicilina, cefepime y cefprome
2d	2d	D	Variable	NO	Mayor hidrólisis de oxacilina o cloxacilina
2de	NI	D	Variable	NO	hidrólisis de Oxacilina, cloxacilina y oxanino- $\beta$ -lactámicos
2df	NI	D	Variable	NO	hidrólisis de Oxacilina, cloxacilina y carbapenems
2e	2e	D	SI	NO	Hidroliza cefalosporinas, inhibidas por ac. clavulánico pero no aztreonam
2f	2f	A	SI	NO	Mayor hidrólisis de carbapenems, oxanino- $\beta$ -lactámicos, cefiminas
3a	3	B(B1) B(B2)	NO	SI	Amplio espectro de hidrólisis incluyendo carbapenems pero no aztreonam
3b	3	B(B3)	NO	SI	Hidrólisis preferentemente de carbapenems
NI	4	Desconocido			

Adaptado de Ambler y Bush<sup>20,21</sup>

*P. aeruginosa* manifiesta diversos mecanismos de resistencia, donde las betalactamasas son la principal causa de resistencia para los antibióticos betalactámicos. Debido a la presencia de una enzima AMPC cromosómico inducible, tiene la capacidad de ser inducida por los propios  $\beta$ -lactámicos específicamente cefalotina y ampicilina. El grado de resistencia, es influido por el grado de represión de la Amp-C, cuando esto se manifiesta hay resistencia a penicilinas y cefalosporinas (ceftazidime, cefepime) (13). Dicha bacteria posee una resistencia intrínseca a diversos  $\beta$ -lactámicos, pero también puede presentar un mecanismo de resistencia adquirida del tipo betalactamasa de espectro extendido (BLEE), carbapenemasas del tipo *K. pneumoniae* carbapenemasa (KPC) y MBLs (8,13). Antes del tratamiento los  $\beta$ -lactámicos aparentemente sirven, pero clínicamente no se observa

mejora en el paciente y en unos días se manifiesta la inducción en su totalidad de la enzima. Las BLEE se manifiestan por presentar resistencia a penicilinas y a cefalosporinas, las cuales son codificadas por plásmidos, el cual se obtienen mediante el transporte de DNA extracromosomal. Carbapenemasas es un tipo de enzima que demuestra resistencia a carbapenémicos. La PSE-1 y la PSE-4, son  $\beta$ -lactamasas que son adquiridas por plásmidos. PER-1, es otra BLEE que confiere verdadera resistencia a ceftazidima pero pierde su acción al adicionar clavulanato. Existe otra BLEE que produce resistencia a monobactámicos, penicilinas, cefalosporinas, pero consideran a carbapenémicos, son los TEM, SHV y OXA (3, 11,13).

### **Carbapenemasas**

Actualmente los carbapenemes son considerados como los betalactámicos con el espectro de actividad más amplio. En infecciones intrahospitalaria estos antimicrobianos son sumamente importantes en el tratamiento, primordialmente de infecciones causadas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (3).

Los bacilos Gram negativos resistentes a los carbapenémicos por producción de betalactamasa con la capacidad de hidrolizar este grupo de antimicrobianos, se han relacionado a elementos genéticos transferibles, los que actualmente se vienen dispersando generando incertidumbre y preocupación. La producción de  $\beta$ -lactamasas en *P. aeruginosa* sucede frecuentemente, éstas pueden ser codificadas por genes localizados en el cromosoma o en plásmidos. Dichas enzimas denominadas

genéricamente como carbapenemasas se agrupan en las diversas clases de Ambler que comprende la variedad de grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010 (14). Existe más de una clasificación de  $\beta$ -lactamasas. La clasificación de Ambler, las divide en 4 clases (A, B, C y D) de acuerdo a su estructura molecular y la de Bush, que también las divide en 4 grupos funcionales (1, 2, 3 y 4) se basa en sus características de afinidad por el sustrato y la acción de los inhibidores (7, 11) (Tabla N° 2).

**Tabla 2. Clasificación general de las carbapenemasas**

Clase molecular <sup>1</sup> (Grupo funcional <sup>2</sup> )	Enzimas	Inhibición por		ATM	Microorganismos	Localización genética
		CLA	EDTA			
A (2f)	Sme, IMI, NmCA	±	-	R	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Crom
	KPC	+	-	R	Enterobacterias	PI
	GES	+	-	R	Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PI
B (3)	L1 CcrA Cpha BclI	-	+	S/R <sup>3</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Bacillus cereus</i>	Crom
	IMP, SPM, SIM, GIM, VIM, AIM, DIM, KHM, NDM	-	+	S	Enterobacterias <i>Pseudomonas</i> spp. BGNNF	PI (Crom) <sup>4</sup>
D (2df)	OXA (OXA-48)	±	-	S	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacterias	Crom, PI

<sup>1</sup>Según la clasificación de Ambler, <sup>2</sup>según la clasificación de Bush y Jacoby, 2010; <sup>3</sup>puede aparecer resistente por la coexistencia con otros mecanismos de resistencia, <sup>4</sup>ocasionalmente de codificación cromosómica. CLA, ácido clavulánico; ATM, aztreonam; BGNNF, bacilos gramnegativos no fermentadores; PI, plasmídica; Crom, cromosómica

### 2.1.3. Metalobetalactamasas

Las MBLs son consideradas el grupo más importante de las carbapenemasas, pertenecientes a la clase B o grupo 3 de Bush y



Jacoby, actúan contra los carbapenemes. A mediados de los 60 fueron descubiertas las MBLs y fueron detectados solamente en especies con baja patogenicidad, en los 90 con la expansión de genes que codifican MBLs en elementos de DNA móviles entre patógenos Gram Negativos, estas enzimas han incrementado su importancia clínica. Este grupo de enzimas de MBLs está formado por una variedad genética, con porcentajes de identidad de secuencia de entre el 20% y 40%. Sin embargo, se encuentra un motivo conservado dado por cuatro residuos de histidina (H), una aspargina (D) y una cisteína (C), que se ubican según una secuencia consenso HXHXD(X)55-74H(X)18-24C(X)37-41H, lo cual se corresponde a los ligandos con dos átomos de Zinc ++. (11, 15).

Existen las metalobetalactamasas que tienen la habilidad de hidrolizar las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos pero no el aztreonam; estas son IMP y VIM, descritas en Japón y Europa (13).

Estas carbapenemasas se inhiben por agentes quelantes de cationes divalentes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), mercapto acetato de sodio, compuestos tiólicos como el ácido 2-mercaptopropiónico, o el ácido dipicolínico y requieren cationes divalentes ( $Zn^{+2}$ ) como cofactor para su actividad catalítica, que impiden la acción de las serino- $\beta$ -lactamasas. Las principales enzimas son las IMP y VIM que tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos betalactámicos con la excepción del aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Con parecidas características se han señalado enzimas de los grupos SPM, GIM, SIM, AIM, DIM y KHM, y más recientemente la enzima NDM-1 que ha provocado una

importante alarma mediática debido al perfil mutirresistente o panresistente de los aislados que la producen, esta característica hidrolítica que presenta la enzima es parecida a la de otras MBL (2, 10,11).

Las MBLs se encuentran en genes cassettes, principalmente ubicados en integrones tipo 1 y en algunos casos se han encontrado en plásmidos o trasposones, las cuales son transferibles, relacionándose a otros genes de resistencia ubicados en los mismos genes cassetes debido a ello confiere a las cepas portadoras resistencia a múltiples antibióticos.

Se han identificado varias familias de MBLs, estas se dividen según sus características bioquímicas en tres subgrupos. El subgrupo 3a incluye enzimas con amplio espectro de hidrólisis para penicilinas, cefalosporinas e IPM, diversidad de enzimas de este grupo requieren de  $Zn^{+2}$ , para desarrollarse. El grupo que consiste en enzimas que hidrolizan específicamente carbapenemes, los cuales se consideran reales carbapenemasas, en su totalidad de enzimas de este subgrupo requieren  $Zn^{+2}$  para su desenvolvimiento y son inhibidas por el EDTA, son llamados Subgrupo 3b. El último subgrupo 3c integra enzimas que hidrolizan aceleradamente ampicilina (7, 11).

#### **2.1.3.1. Detección de Metalobetalactamasas**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método de referencia para la detección de MBLs en cepas de *P. aeruginosa*, puesto que tiene la capacidad de detectar los genes responsables de este mecanismo de

resistencia. Sin embargo la mayoría de laboratorios de bacteriología clínico no pueden realizar estas pruebas moleculares debido a su alto costo. Por otro lado existen pocos métodos fenotípicos para la detección de MBLs (4).

Para clasificar a las betalactamasas, existen dos aspectos; la ubicación de los genes (cromosómicos o plasmídicos) y el espectro de acción. Nos referiremos fundamentalmente a las de clase A, llamada también betalactamasas plasmídicas, comprenden a las serin enzimas que se encuentran en plásmidos, mientras las de clase C son las cromosómicas (11).

En la actualidad el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) no sugiere ninguna prueba para la detección de aislamientos productores de MBLs, debido a que estos mecanismos no predominan en EUA. Aunque ningún procedimiento fenotípico ha sido recomendado para la pronta detección de MBLs en el laboratorio de microbiología en la atención primaria. Sin embargo se recomienda uso de EDTA, la especificidad y la sensibilidad de este ensayo fueron comparables a los de análisis de PCR utilizando cebadores específicos para bla (IMP), por lo tanto, esta prueba sería valiosa para el uso diario en laboratorios clínicos (18). Pueden utilizarse discos que contienen agentes quelantes preparados en el laboratorio, como EDTA (etilendiaminotetraacético 1  $\mu$ mol o 5  $\mu$ moles, equivalentes a 375  $\mu$ g o 187  $\mu$ g respectivamente), o ADP (ácido dipicolínico, 55  $\mu$ moles, equivalente a 920  $\mu$ g), o bien discos comerciales (11, 16).

Para detectar la presencia de carbapenemasas debemos considerar que no hidrolizan el aztreonam por lo tanto en un antibiograma se observa sensible y también, catalizan la ruptura del anillo betalactámico empleando cationes divalentes ( $Zn^{2+}$ ) por lo que su actividad se inhibe en presencia de agentes quelantes de iones, como el EDTA. Algunos aislamientos presentan simultáneamente otros mecanismos de resistencia, una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) donde el aztreonam aparecerá resistente (11, 14).

No existe un método fenotípico estandarizado, sin embargo, se han diseñado diversidad de técnicas para identificar fenotípicamente estas enzimas (11, 14). Entre los métodos desarrollados tenemos: prueba de Sinergia de doble disco (DDS), prueba de discos combinados con inhibidor, el Test de Hodge modificado (MHT), el Blue Carba Test (BCT), etc (3, 4, 7).

### **Prueba de Sinergia de doble disco (DDS)**

La prueba de sinergia de doble disco, fue desarrollada y descrita por primera vez por Arakawa y colaboradores en el año 2000, quienes recomendaron el uso de discos de CAZ y discos de ácido 2-mercaptopropiónico para el desarrollo de la prueba, el procedimiento de la prueba es sencillo y económico para el screening de aislamientos productores de MBLs (tipo IMP-1) (18). Más adelante, Lee y colaboradores (2001) usaron discos de IMP y de EDTA para desarrollar esta prueba. En el año 2003, fue examinado el desempeño usando un disco de EDTA (750 ug)- más- SMA (2mg). Resumiendo este último como

el más eficaz (19, 20).

Para realizar la prueba se requiere, un cultivo fresco de la cepa problema el cual es suspendido (0.5 McFarland) e inoculado en un agar Mueller-Hinton. En el que se coloca el disco empapado con el antimicrobiano IPM (puede ser MEM o CAZ) y otro de EDTA a una distancia centro-centro de 1.0 – 2.0 cm (la separación óptima puede variar en función del inoculo). Se deja incubar a 35°C por 18 horas, la apreciación de una ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al EDTA (sinergia) o de una “zona fantasma (inhibición de crecimiento) entre el carbapenémico y el EDTA se interpreta como positivo (14, 21).

#### **Prueba de discos combinados con inhibidor**

El uso de los discos de IPM con EDTA para confirmar aislamientos de *Pseudomonas sp* productoras de MBLs, fue recomendado por Yong y colaboradores en el año 2002, los que determinaron la viabilidad de emplearlos. Ellos concluyeron que la prueba, usando IPM + EDTA (750ug), era sencillo de realizar y que demostraba una alta sensibilidad en diferenciación de aislamiento productores de MBLs (22).

#### **Test de Hodge modificado (MHT) – cepa *K.pneumoniae* ATCC 25922**

En el año 2011, Pasteran y colaboradores, publicaron un artículo donde manifiestan una nueva modificación del Test de Hodge. En el cual ellos emplean una nueva cepa indicadora *K.pneumoniae* ATCC 700603, la cual sustituye a la cepa *E.coli* ATCC 25922. Este cambio reportó la capacidad de detección en cepas productoras de carbapenemasas.

(100% sensibilidad y 98% especificidad), incluyendo muestras de *P. aeruginosa* (19,20).

Para el desarrollo del Test de Hodge, se sigue los lineamientos estandarizados para la realización de un antibiograma por el método de difusión en disco. El agar Mueller Hinton es empleado para la inoculación a partir de una suspensión en caldo Trypticase de soya de la cepa indicadora *K. pneumoniae* ATCC 700603, con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland. Luego se coloca un disco con un carbapenémico (ertapenem, imipenem o meropenem) en el centro de la placa. Posteriormente, se inocula 3-5 colonias de la cepa problema formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con carbapenémico hacia el borde de la placa. Se incuba a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 16-20 horas. Se considera un MHT positivo cuando existe una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora (19, 20).

Posteriormente se han llevado a cabo diversos estudios de comparación de métodos, como se muestra, en el año 2008, Behere y colaboradores llevan a cabo un estudio de comparación de cuatro técnicas fenotípicas de detección de MBLs y determinaron que esta prueba era mejor que la prueba de sinergia de doble disco y tenía una sensibilidad equivalente a la prueba de E-test (23).

Puede ser incorporada dentro de las pruebas de rutina de cualquier laboratorio de Microbiología debido a su fácil desempeño y bajo costo (23, 24). Como criterio empleamos un punto de corte, lo que da ventaja a esta

prueba de discos combinados (25). Realizamos un antibiograma siguiendo el protocolo estándar, inoculamos una placa de agar Mueller-Hintona partir de una suspensión de la cepa problema (0.5 escala MacFarland), en el que colocamos discos de MEM y MEM-EDTA (en caso de MBLs). También puede utilizarse discos con IPM y IPM-EDTA. Incubamos a 35°C durante 16 – 20 horas. Resultado positivo consideramos cuando existe una diferencia en los halos mayor o igual a 5mm (14).

#### **2.1.4. Tratamiento**

Las opciones terapéuticas para tratar infecciones por *P. aeruginosa* son: aminoglucósidos, fluoroquinolonas, penicilinas de amplio espectro, monobactámicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y carbapenemes (7).

## **2.2. Antecedentes**

### **2.2.1. Antecedentes Internacionales**

Pagniez G, Radice M, Cuirolo A, Rodriguez O, Rodriguez H, Vay C, et al. En el estudio sobre “Prevalencia de MBLs en *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires”, realizado en el periodo 2002 al 2004, en Argentina, encontraron 91 aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems y sensibles a Aztreonam. El

ensayo de detección fenotípica de MBLs utilizando discos de EDTA mostró 100% de sensibilidad y especificidad (27).

Bolaños C, Lannacone J, en la investigación sobre los “Patrones fenotípicos de resistencia en *P. aeruginosa* a nivel de Sudamérica”; realizado en el periodo 2003 – 2014 en Perú, determinaron que Brasil fue el país que mayor cantidad de trabajos aportó sobre el tema lo que corresponde a un 28,6% de los estudios encontrados. Argentina y Colombia fueron los países donde se encontraron los cuatro patrones fenotípicos de resistencia: AMPC desreprimido (AMPCd), BLEE y las carbapenemasas KPC, MBLs. Las MBLs y BLEE fueron las de mayor prevalencia encontrada con un 21,9% y 18,5% respectivamente en Sudamérica. En el periodo 2007 – 2010, se detectaron en Sudamérica, los cuatro patrones fenotípicos de resistencia AMPCd, BLEE, KPC, MBL de *P. aeruginosa* con una prevalencia de 3,4%, 14,1%, 12,6%, 23,1% respectivamente, además el método más usado fue el doble disco difusión para la detección de BLEE y MBLs. Se debe resaltar que en los países de Bolivia, Ecuador, Paraguay y Uruguay no se encontraron registros para el análisis de los cuatro patrones fenotípicos de resistencia (8).

Bareja R, Grover S, Singh A, Shinu P, Sharma M, Kumar A, et al. En el estudio, sobre “Rapid detection of metallo- $\beta$ -lactamase in carbapenm resistant clinical isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species”, realizado en la India, en el periodo 2006 al 2009 encontraron en 98 aislamientos de muestras de líquido pleural, orina, aspirado traqueal, tubo endotraqueal, sangre de pacientes en un hospital de Manipal, 94 cepas



de *P. aeruginosa* de las cuales el 74,5% fueron cepas con patrón fenotípico MBLs, utilizando para su detección discos de MEM (10µg) y MEM/EDTA (10µg/930µg) (17).

Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Bakšytė G, Macas G, Sakalauskas R, en la investigación sobre “Characteristics of Carbapenem-Resistant *P. aeruginosa* Strains in Patients with Ventilator-Associated Pneumonia in Intensive Care Units”, en Lituania realizaron un estudio comparativo a partir de muestras de aspirado bronquioalveolar de pacientes con neumonía, a los cuales se aisló *P. aeruginosa*, en el año 2003 con 90 aislamientos fueron resistentes a IPM en 53,3% y productoras de MBLs en 15,8%; en el 2008 con 101 aislamientos, se incrementó a 87,8% las cepas resistentes a IPM y las cepas productoras de MBLs aumentaron a 61,9% (28).

Perozo AJ, Castellano MJ, Chávez T, Ling E, Arraiz N (2013). En el estudio “Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *P. aeruginosa*”, realizado en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, en Venezuela, evaluaron cuatro métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas (método de sinergia del doble disco con EDTA, método del disco combinado de IPM y MEM con EDTA, método de E-Test- MBLs y el método de Hodge modificado), con un método de referencia (PCR). En este estudio se analizaron 294 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los cultivos de rutina practicados con fines diagnósticos. Donde se obtuvo buena sensibilidad y

especificidad de los métodos fenotípicos empleados (obteniéndose un alto porcentaje por encima del 90 %) (4).

### **2.2.2. Antecedentes Nacionales**

Díaz J.A, en Perú en el año 2008, en su tesis “Detección de MBLs en *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008”, realizó 186 aislamientos de cepas de *P. aeruginosa* identificadas en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, cuyas cepas fueron resistentes a los carbapenemas usando la prueba de sinergia de doble disco con EDTA, el 7% de las cepas presentó el patrón fenotípico MBLs (29).

Gonzales E, Taboada WV, Champi R, Soto J, Flores W, Lovera M, et al. En un trabajo de investigación “Metallo- $\beta$ -lactamasas en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en Lima, Perú” (2011), realizado en seis hospitales de públicos de Lima (uno pediátrico, uno materno-infantil, uno oncológico y tres generales), evaluaron 51 aislamientos de *P. aeruginosa*, resistentes a ceftazidima y con sensibilidad reducida a carbapenémicos. El método de aproximación de discos con sustratos (ceftazidima, imipenem y meropenem) y con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fue el ensayo fenotípico empleado. A través de este método, se detectaron M $\beta$ LS en el 15,7% de los aislamientos (10).

Gonzales E, en la investigación titulada “Detección y caracterización molecular de MBLs en aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados en el Instituto Nacional de Salud del niño Lima- Perú”, entre marzo 2011 y

febrero 2012, detectó la presencia de MBLs, por métodos fenotípicos, de un total de 115 aislamientos, 25 de ellos resultaron resistentes a la ceftazidima y con sensibilidad reducida a los carbapenemes (halos menores a 21 mm de IPM y/o MEM), observando una prevalencia del 21,7% de producción de MβLs, concluyendo que este no es el principal mecanismo de resistencia a los carbapenémicos presentado por *P. aeruginosa* en el INSN. La prueba de detección fenotípica empleando EDTA; determinó que la sensibilidad fue del 92% y especificidad del 100% (7).

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1. Diseño del Estudio**

El estudio es observacional, descriptivo de corte transversal.

### **3.2. Población**

Conformado por 300 aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes muestras biológicas: Heridas, líquidos biológicos, orina, punta de catéter, sangre y vías respiratorias; resistentes a IPM, MEM, obtenidos en el periodo de abril 2016 a julio 2017; los aislamientos corresponden a pacientes ambulatorios y hospitalizados de diferentes clínicas privadas. Dichas muestras procedieron de diferentes servicios asistenciales como: Gastroenterología, geriatría, medicina, oncología, pediatría y urología. Todos los procedimientos se realizaron en el servicio de Microbiología clínica de un laboratorio Particular de Miraflores.

#### **3.2.1. Criterios de Inclusión:**

- Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de muestras clínicas.
- Cepas resistentes a meropenem
- Cepas resistentes a imipenem

#### **3.2.2. Criterios de Exclusión:**

- Aislamiento de *P. aeruginosa* del medio ambiente.
- Cepas sensibles a meropenem
- Cepas sensibles a imipenem

### 3.3. Muestra

Se evaluaron 89 aislamientos de *P. aeruginosa* que cumplieron el criterio de inclusión, las cuales fueron recuperados durante el periodo que comprende el estudio, el tipo de muestreo se determinó por conveniencia.

### 3.4. Operacionalización de Variables

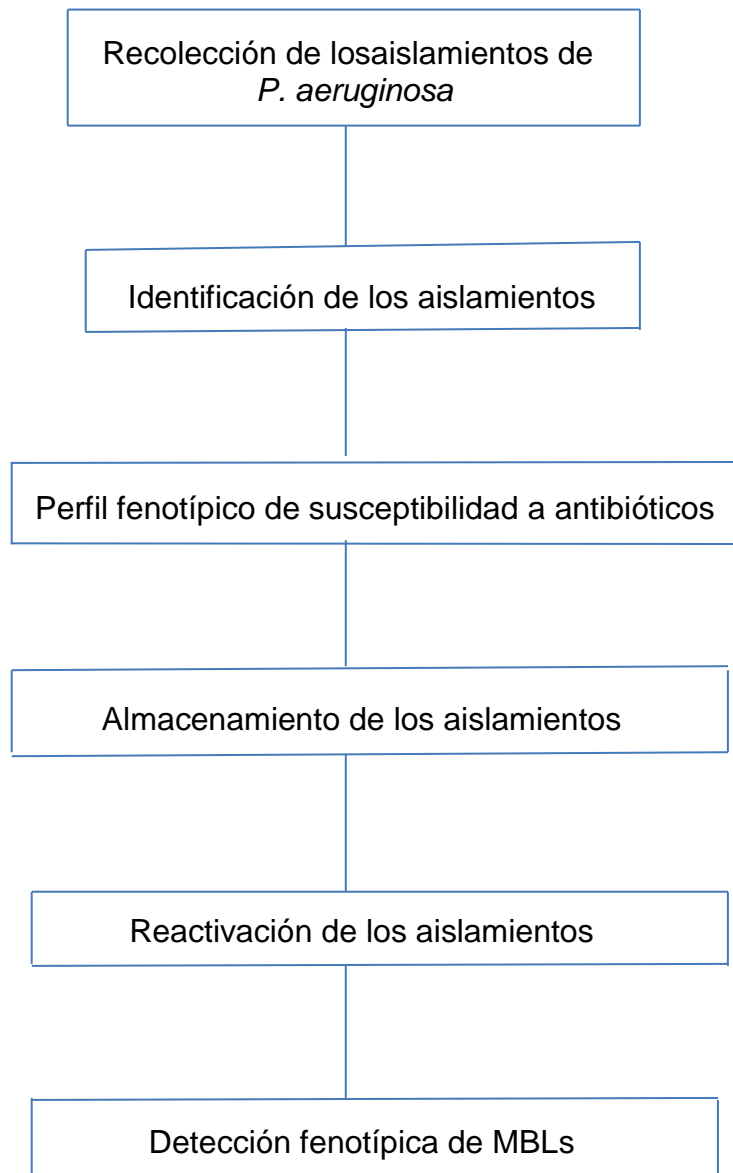
Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala de Medición	Forma de Registro
<b><u>Principal:</u></b> Metalobetalactamasas	Enzimas que tiene la capacidad de hidrolizar los carbapenemes.	Método de difusión en disco.	Cualitativa	• Nominal
<b><u>Secundarias:</u></b> Según tipo de muestra	Las diferentes muestras biológicas y diferente tipo de secreciones.	Ficha de recolección de datos	Cualitativo	• Nominal
Según su procedencia	Si el paciente es hospitalizado o ambulatorio.	Ficha de recolección de datos	Cualitativo	• Nominal
Según los diferentes servicios asistenciales	Considerar de qué servicio proviene.	Ficha de recolección de datos	Cualitativo	• Nominal

### 3.5. Procedimientos y Técnicas

#### Técnicas e instrumentos de medición

- Antibiograma por disco difusión según el método de Kirby Bauer.
- Detección fenotípica de MBLs con discos de ácido etilendiaminotetraacético.

#### PLAN DE PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS



### **A.- Recolección de los aislamientos de *P. aeruginosa***

Se evaluaron 300 aislamientos de *P. aeruginosa* aisladas de muestras biológicas. Los aislamientos se recuperaron del medio TSI a agar Mac Conkey e incubaron a 35°C por 18-20 horas.

### **B.-Identificación de los aislamientos**

Para el aislamiento se utilizó en la siembra primaria agar Mac Conkey, la identificación de las colonias, se realizó usando los medios de diferenciación bioquímica: Citrato, SIM, Agar Hierro de Kliger(KIA) y el Agar Hierro Lisina (LIA), Voges proskauer Rojo Metilo (MRVP), Urea; adicionalmente la prueba de Oxidasa.

### **C.- Perfil fenotípico de susceptibilidad a antibióticos**

Para la susceptibilidad antimicrobiana, se empleó la técnica de disco difusión, de acuerdo con la recomendaciones de la "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI, 2016).

Se incluyeron los siguientes antimicrobianos: discos conteniendo aztreonam 30µg (AZT), ceftazidima 30µg (CAZ), cefepima 30µg (FEP), imipenem 10µg (IPM), meropenem 10µg (MEM), piperacilina/tazobactam 100/10µg (TZP), amikacina 5µg (AK), gentamicina 10µg (GE), ciprofloxacina 5µg (CIP) y colistin 10µg (COL) (Oxoid®). Después del tiempo de incubación, los diámetros de los halos de inhibición para cada uno de los antimicrobianos se registraron e interpretaron de acuerdo con las normas CLSI (2016).

Los aislamientos con resistencia a carbapenemes (IMI y/o MEM), fueron identificadas como posibles productoras de MBLs y pasaron a los métodos

fenotípicos.

#### **D.- Almacenamiento de los aislamientos**

Las cepas fueron almacenadas en crioviales, y conservadas con agua destilada estéril en ambiente oscuro, hasta su ejecución. Se les asignó un código de identificación en la ficha de recolección de datos de procedencia de la cepa. (Anexo 1).

#### **E.- Reactivación de los aislamientos**

Las cepas conservadas, se reactivaron, inoculando en medio de agar MacConkey incubaron a 35°C por 18-20 horas, para proceder con el desarrollo de las pruebas de detección de MBLs.

#### **F.- Detección fenotípica de MBLs**

Para la detección de la enzima MBLs, se desarrolló 3 pruebas: Prueba de sinergia de doble disco (DDS), prueba de disco combinado con inhibidor (EDTA). Prueba para detección de Carbapenemasa, se empleó como apoyo para el estudio, el Test de Hodge modificado (MHT) – cepa *K.pneumoniae* ATCC 25922 (Anexo 2 - 4).

El medio de Mueller-Hinton que se empleó fue de la casa comercial Oxoid. Los discos utilizados para las pruebas de detección de MBLs fueron sometidos a control de calidad con cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

La información de cada aislamiento fue registrada en su respectiva ficha de recolección de datos (anexo 1) para su posterior interpretación y análisis.



### **3.6. Plan de Análisis de Datos**

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS versión 23.0, se determinaron medidas de tendencia central. Se emplearon tablas de frecuencia y de contingencia.

## CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1. Resultados

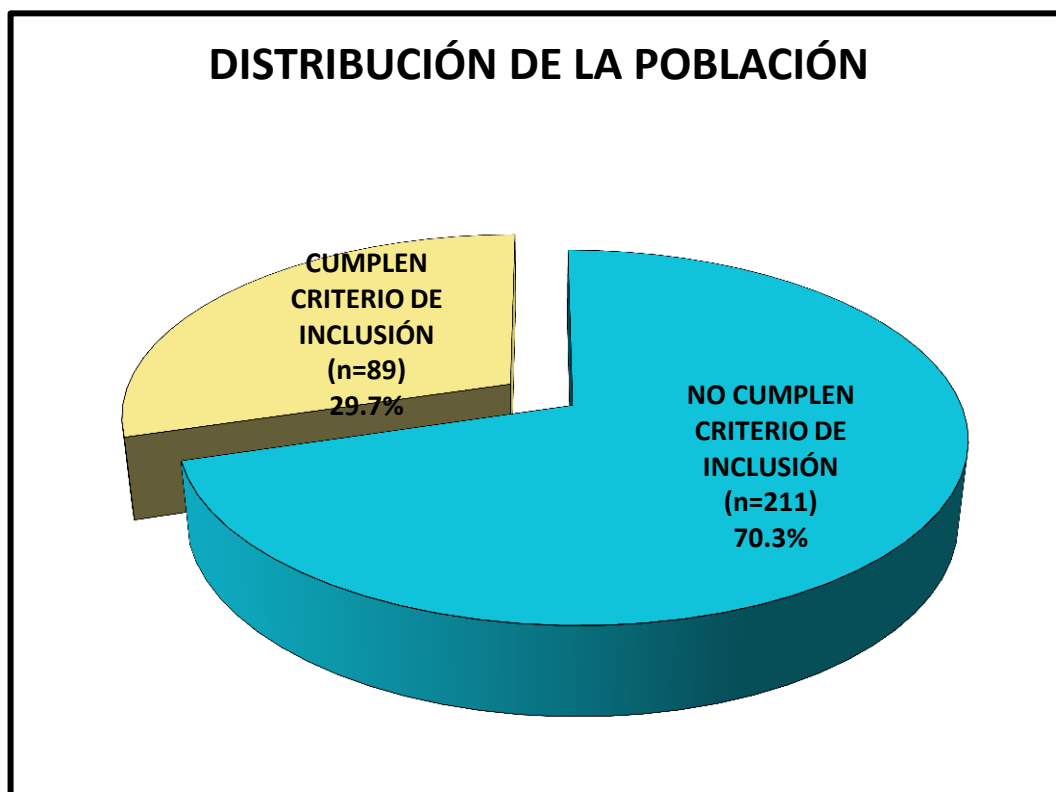
#### DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN

Tabla n°3: Distribución de la población

CEPA DE <i>P. aeruginosa</i>	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NO CUMPLEN CRITERIO DE INCLUSIÓN (n=211)	211	70.3%
CUMPLEN CRITERIO DE INCLUSIÓN (n=89)	89	29.7%
<b>TOTAL:</b>	<b>300</b>	<b>100%</b>

Se han evaluado 300 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes hospitalizados y ambulatorios de diferentes muestra biológicas, de las cuales 211 (70,3 %) no cumplieron el criterio de inclusión y 89 (29,7 %) si cumplieron el criterio de inclusión.

Gráfico n° 1: Distribución de la población



### **Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa***

De los 89 aislamientos de *P. aeruginosa* considerados en el estudio; 53 fueron productoras de MBLs (59,6%); 53/89 fueron positivos a la Prueba de Sinergia de doble disco (59,6%), 39/89 fueron positivos a la Prueba de Disco Combinado con inhibidor (EDTA) (43,8%) y 52/89 dieron positivos al Test de Hodge Modificado (58,4%). De los 36/89 aislamiento no productores de MBLs (40,4%), 5 dieron positivo al Test de Hodge Modificado, probable carbapenemasa tipo KPC u OXA. Podría tratarse de falsos positivos, ya que la prueba no es específica para la detección de MBLs solo es de utilidad para la detección de carbapenemasa.

Considerándose a las pruebas de sinergia doble disco para la detección de MBLs y al test de Hodge para la detección de carbapenemasa, con mayor sensibilidad, frente a la prueba de disco combinado con inhibidor para la detección de MBLs, respectivamente. Siendo el 59,6% de los 89 aislamientos productores de MBLs.

**Objetivo General:**

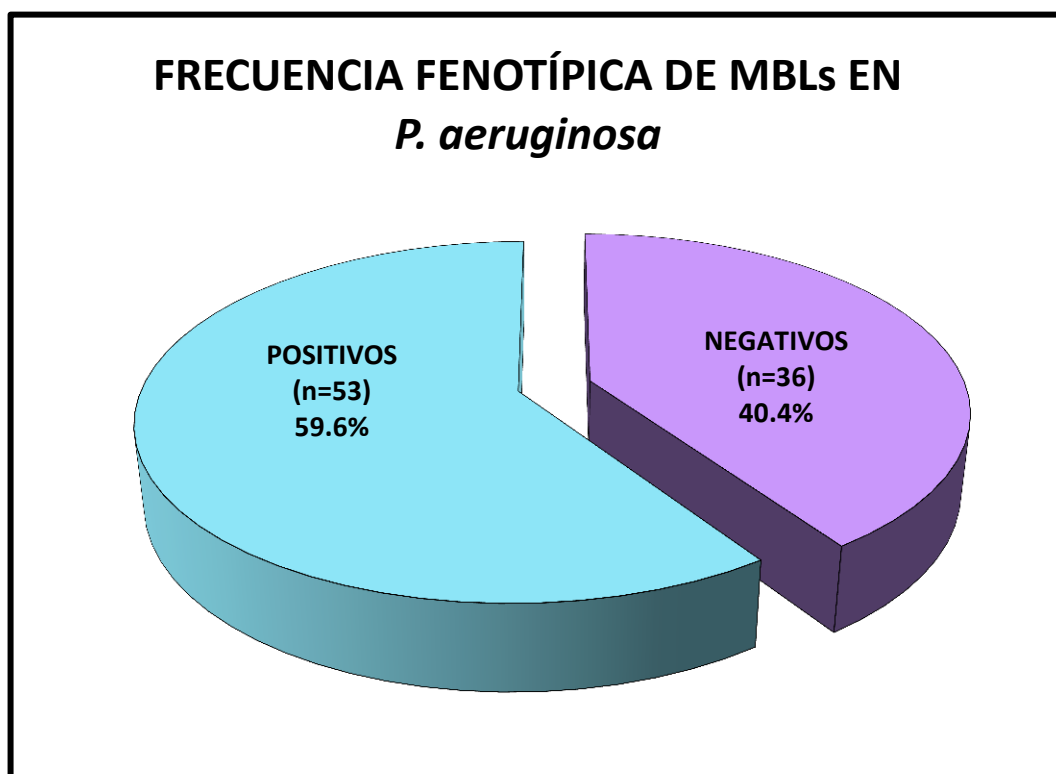
Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *P. aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017.

**Tabla n° 4:** Frecuencia fenotípica de MBLs en *P. aeruginosa*

CEPA DE <i>P. aeruginosa</i>	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NEGATIVOS (n=36)	36	40.4%
POSITIVOS (n=53)	53	59.6%
<b>TOTAL:</b>	<b>89</b>	<b>100%</b>

De 89 aislamientos de *P. aeruginosa*, 53 (59,6%) fueron productores de la enzima MBLs.

**Gráfico n° 2:** Frecuencia fenotípica de MBLs en *P. aeruginosa*

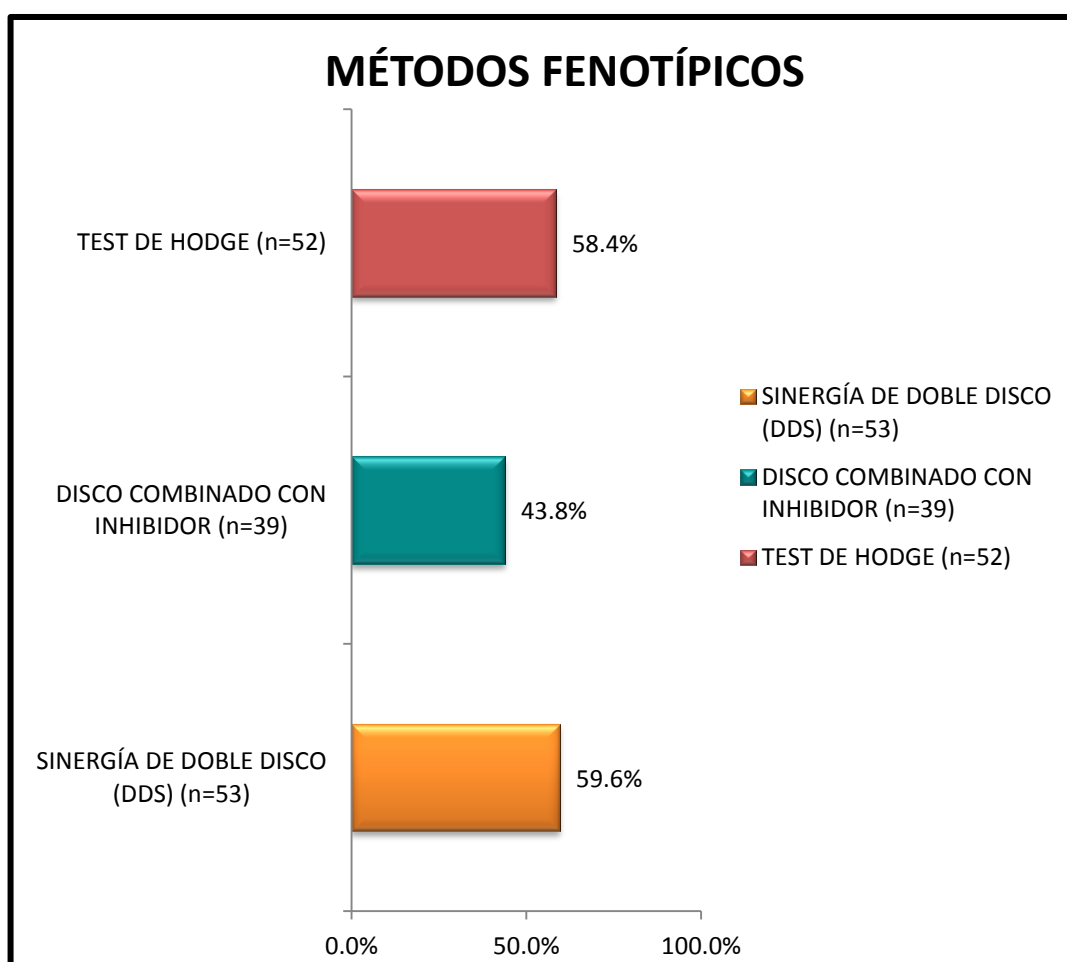


**Tabla n° 5:** Métodos fenotípicos de MBLs en *P. aeruginosa*

MÉTODO FENOTÍPICO	TOTAL - CEPAS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
SINERGÍA DE DOBLE DISCO (DDS) (n=53)	89	53	59.6%
DISCO COMBINADO CON INHIBIDOR (n=39)	89	39	43.8%
TEST DE HODGE (n=52)	89	52	58.4%

De los diferentes resultados obtenidos, el método que tuvo mayor sensibilidad fue la prueba de sinergia de doble disco (DDS) con 53 (59,6 %) aislamientos positivos, seguido del Test de Hodge modificado (MHT), cepa indicadora: *K. pneumoniae* ATCC 700603 con 52 (58,4%) aislamientos positivos y la prueba de discos combinados con inhibidor (EDTA) con 39 (43,8%) aislamientos positivos.

**Gráfico n°3:** Métodos fenotípicos de MBLs en *P. aeruginosa*

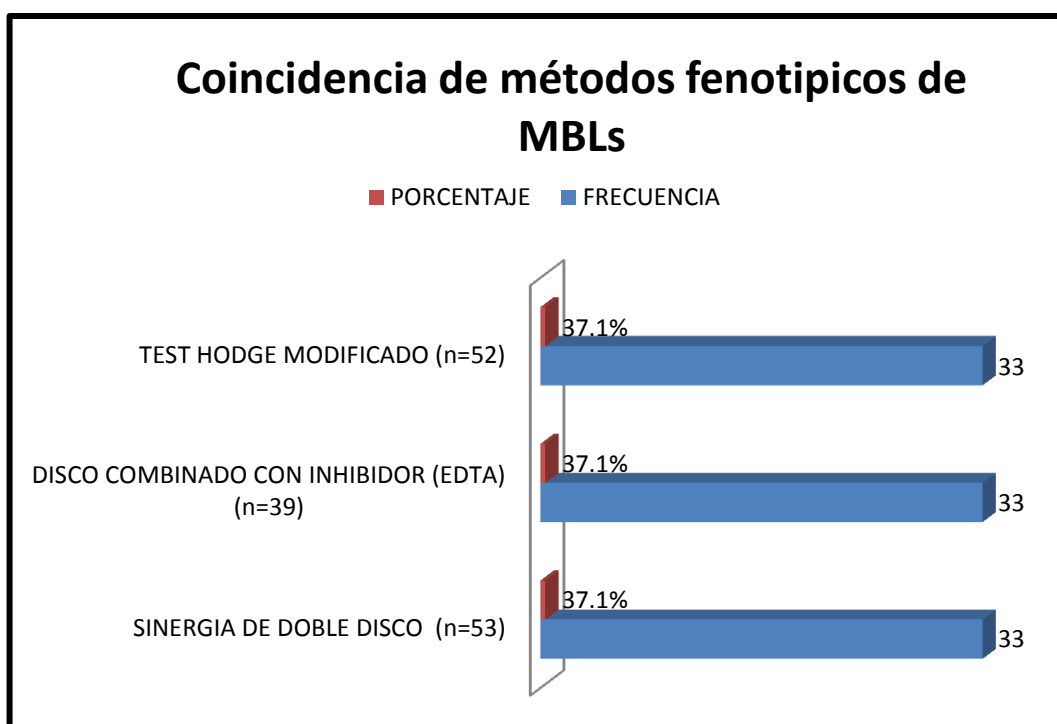


**Tabla n° 6:** Coincidencia de métodos fenotípicos de MBLs en *P. aeruginosa*

MÉTODOS FENOTÍPICOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
SINERGIA DE DOBLE DISCO (n=53)	33	37.1%
DISCO COMBINADO CON INHIBIDOR (EDTA) (n=39)	33	37.1%
TEST HODGE MODIFICADO (n=52)	33	37.1%

En la tabla 6 muestra del total de pruebas que fueron 53, de las cuales los tres métodos coincidieron en 33 (37,1%) ensayos cada prueba.

**Gráfico n°4:** Coincidencia de métodos fenotípicos de MBLs en *P. aeruginosa*

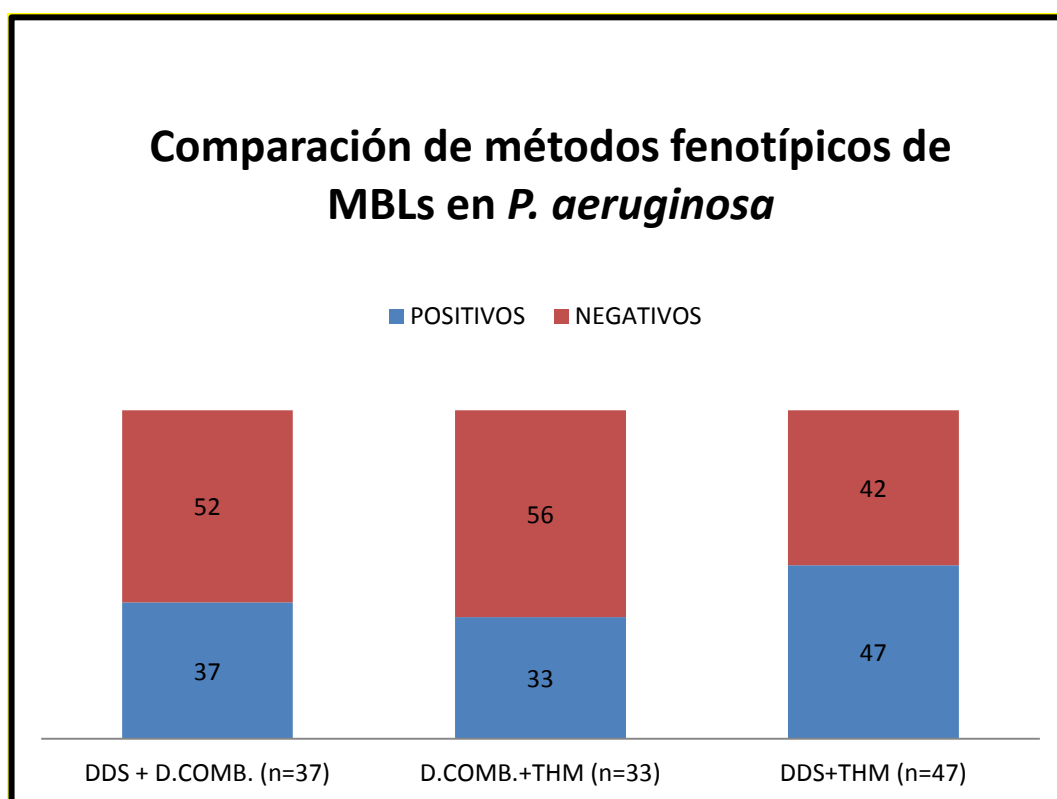


**Tabla n° 7:** Comparación de métodos fenotípicos de MBLs en *P. aeruginosa*

FRECUENCIA	DDS + D.COMB. (n=37)	D.COMB.+THM (n=33)	DDS+THM (n=47)
POSITIVOS	37	33	47
NEGATIVOS	52	56	42

Se han evaluado 89 cepas de *P. aeruginosa*, procedentes de clínicas privadas, de las cuales, la combinación de métodos que tuvo más sensibilidad fue: La prueba de sinergia de doble disco con test de Hodge modificado (*K. pneumoniae* ATCC 700603) dando positivo a 47/53 cepas; seguido de: La prueba de sinergia de doble disco + disco combinado con EDTA 37/53; finalmente la combinación de: disco combinado + test de Hodge cuyo resultado fue 33/53; siendo la prueba que mostró menos sensibilidad.

**Gráfico n°5:** Comparación de métodos fenotípicos de MBLs en *P. aeruginosa*



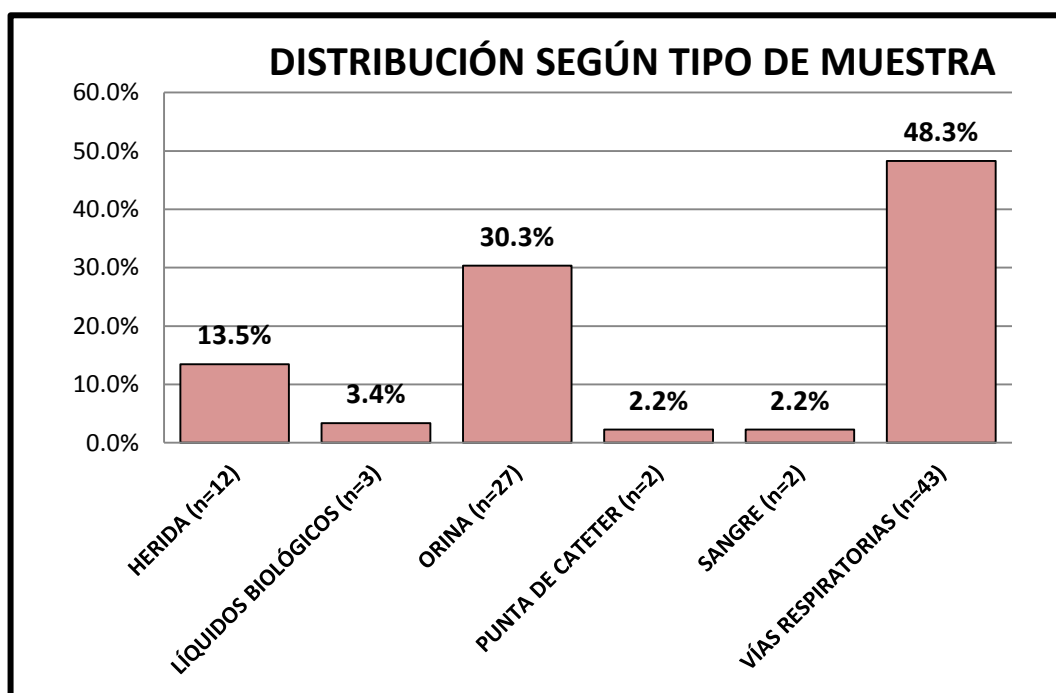
**Objetivo Específico 1:** Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *P. aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 – 2017, según tipo de muestra.

**Tabla n° 8:** Distribución según tipo de muestra

TIPO DE MUESTRAS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
HERIDA (n=12)	12	13.5%
LÍQUIDOS BIOLÓGICOS (n=3)	3	3.4%
ORINA (n=27)	27	30.3%
PUNTA DE CATETER (n=2)	2	2.2%
SANGRE (n=2)	2	2.2%
VÍAS RESPIRATORIAS (n=43)	43	48.3%
<b>TOTAL:</b>	<b>89</b>	<b>100%</b>

Las muestras que predominaron en el estudio fueron de vías respiratorias 43/89, seguidas de las muestra de orina 27/89, herida 12/89, y en menor proporción fueron de líquidos biológicos 3/89, catéter 2/89 y finalmente las muestras de sangre 2/89.

**Gráfico n°6 :** Distribución según tipo de muestra



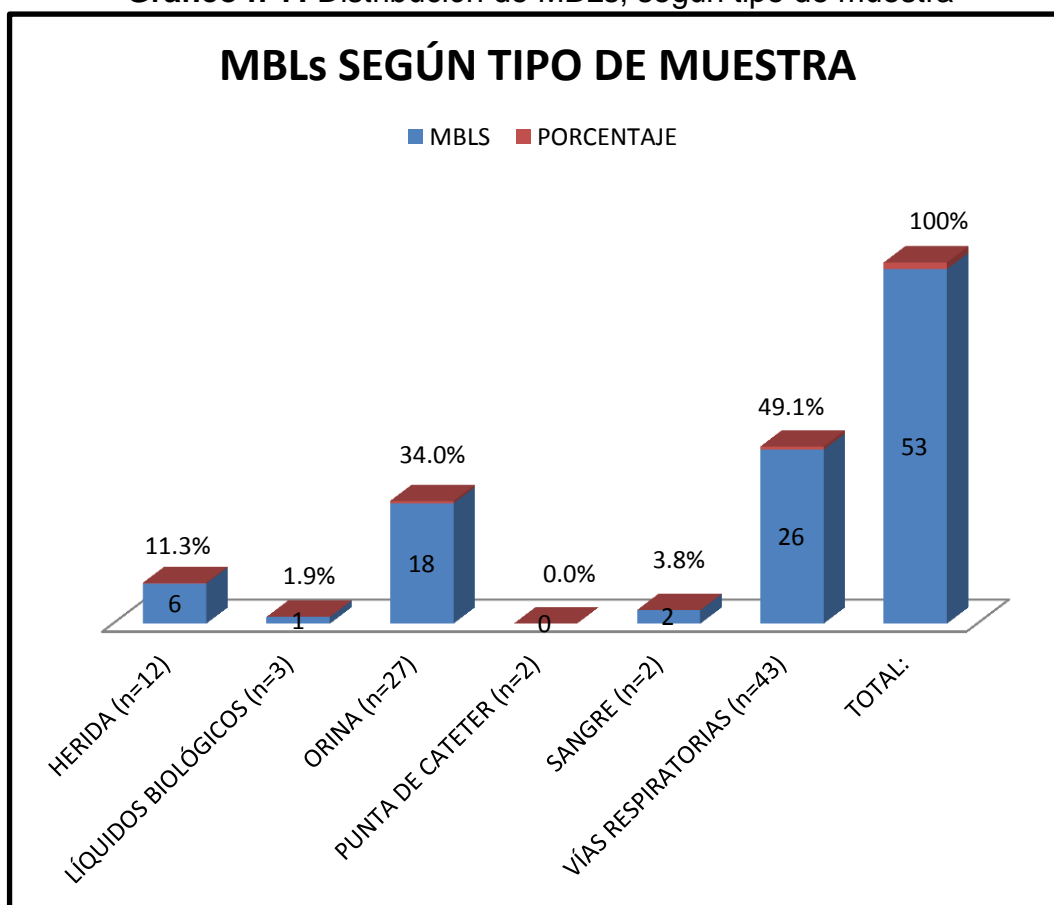


**Tabla n° 9:** Distribución de MBLs, según tipo de muestra

TIPO DE MUESTRAS	MBLS	PORCENTAJE
HERIDA (n=12)	6	11.3%
LÍQUIDOS BIOLÓGICOS (n=3)	1	1.9%
ORINA (n=27)	18	34.0%
PUNTA DE CATETER (n=2)	0	0.0%
SANGRE (n=2)	2	3.8%
VÍAS RESPIRATORIAS (n=43)	26	49.1%
<b>TOTAL:</b>	<b>53</b>	<b>100%</b>

De las 53 cepas aisladas, procedentes de las diferentes clínicas privadas, las que mostraron mayor producción de MBLs fueron las muestra de vías respiratorias 26/53 (49,1%), seguida de las muestra de orina 18/53 (34,0%), herida 6/53 (11,3%), sangre 2/53 (3,8%), finalmente las muestra de líquidos biológicos 1/53 (1,9%).

**Gráfico n°7:** Distribución de MBLs, según tipo de muestra



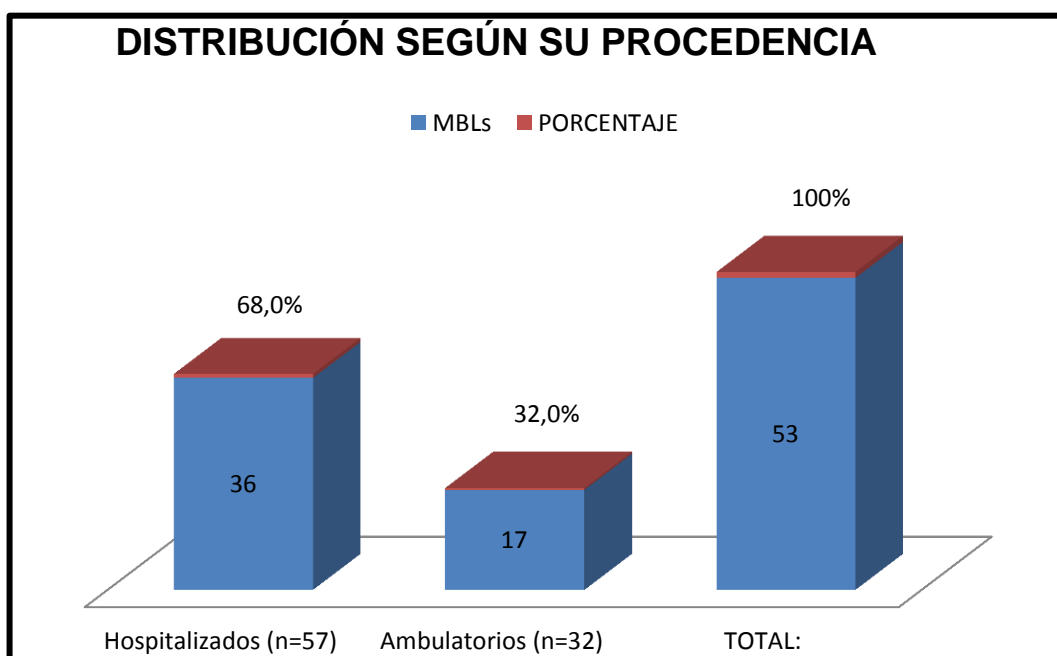
**Objetivo Específico 2:** Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *P. aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 – 2017, según su procedencia.

**Tabla n°10:** Distribución según su procedencia

PROCEDENCIA	MBLs	PORCENTAJE
Hospitalizados (n=57)	36	68,0%
Ambulatorios (n=32)	17	32,0%
<b>TOTAL:</b>	53	100%

Las muestras que más predominaron fueron de pacientes hospitalizados 36/53 (68,0%), pacientes ambulatorios 17 (32,0%). De las 53 cepas productoras de MBLs, 36 fueron de pacientes hospitalizados, lo cual representa 68% de frecuencia. Asimismo 17 fueron de pacientes ambulatorios lo cual representa 32%.

**Gráfico n°8:** Distribución según su procedencia



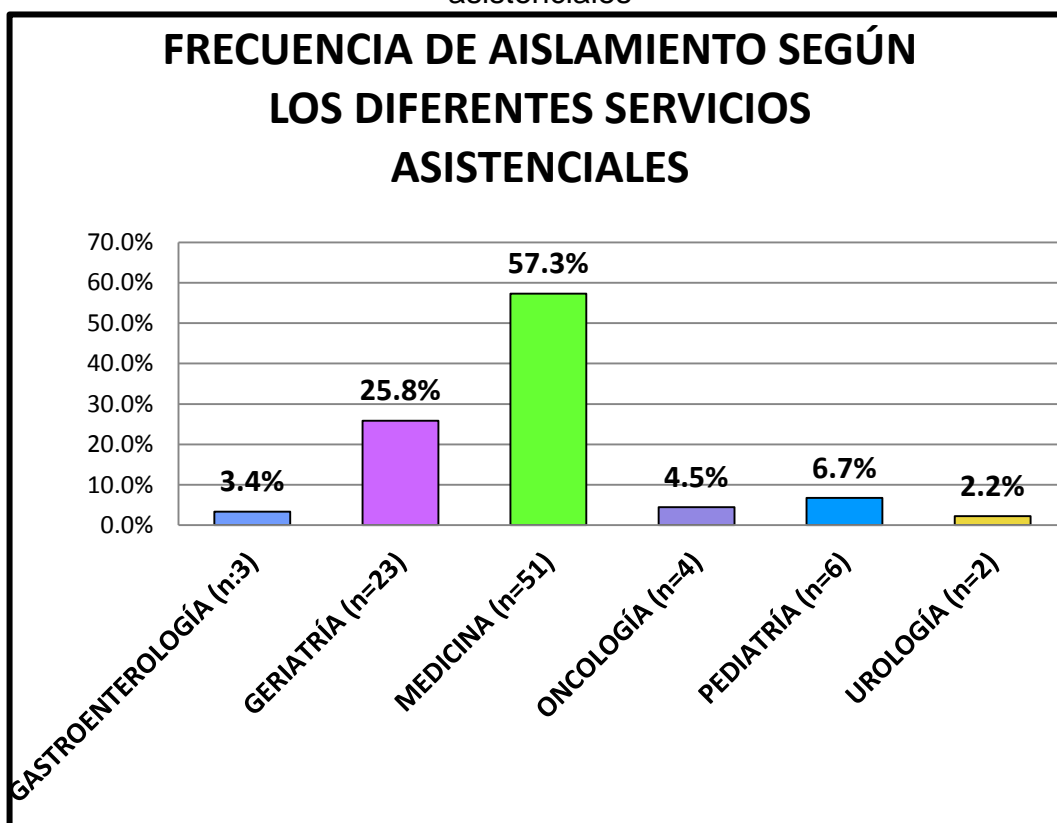
**Objetivo Específico 3:** Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en *P. aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según los diferentes servicios asistenciales.

**Tabla n° 11:** Frecuencia de aislamientos según los diferentes servicios asistenciales

SERVICIO ASISTENCIAL	FRECUENCIA	PORCENTAJE
GASTROENTEROLOGÍA (n=3)	3	3.4%
GERIATRÍA (n=23)	23	25.8%
MEDICINA (n=51)	51	57.3%
ONCOLOGÍA (n=4)	4	4.5%
PEDIATRÍA (n=6)	6	6.7%
UROLOGÍA (n=2)	2	2.2%
<b>TOTAL:</b>	<b>89</b>	<b>100%</b>

Las muestras fueron de los diferentes servicios asistenciales, siendo las que más predominaron: Medicina 51/89 (57,3%), seguida de Geriatria 23/89 (25,8%), y con menor frecuencia de: Pediatría 6/89 (6,7%), Oncología 4/89 (4,5%), en Gastroenterología 3/89 (3,4%), Urología 2/89 (2,2%).

**Gráfico n°9:** Frecuencia de aislamientos según los diferentes servicios asistenciales

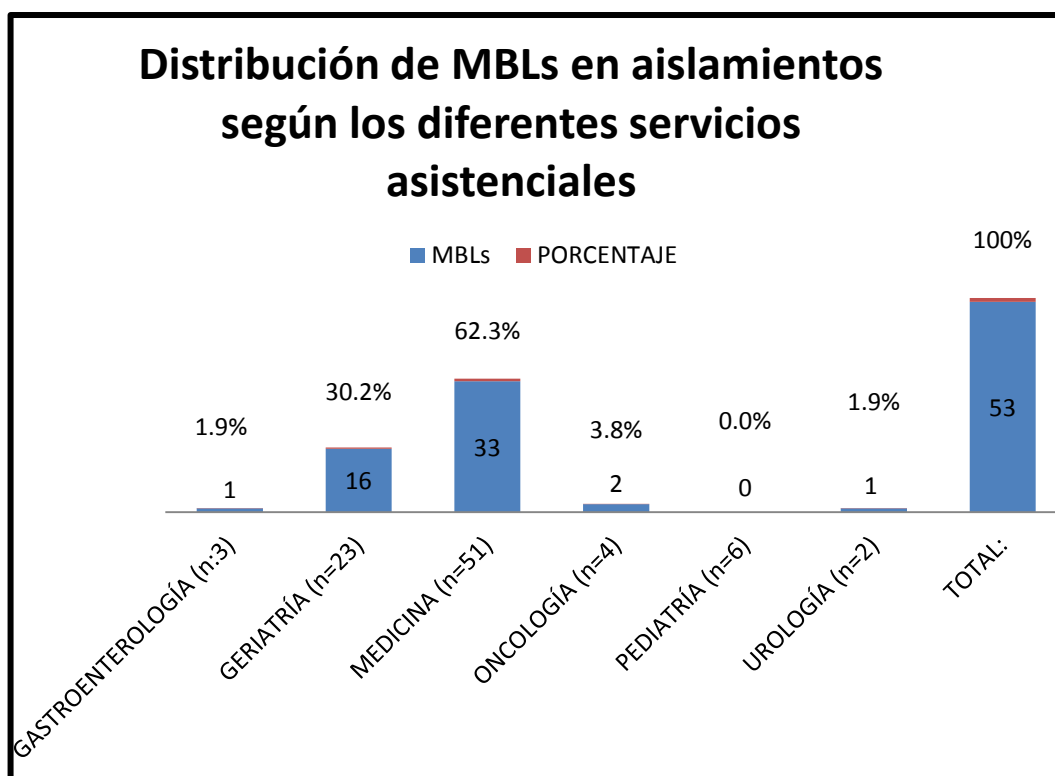


**Tabla n° 12:** Distribución de MBLs en aislamientos según los diferentes servicios asistenciales

SERVICIO ASISTENCIAL	MBLs	PORCENTAJE
GASTROENTEROLOGÍA (n:3)	1	1.9%
GERIATRÍA (n=23)	16	30.2%
MEDICINA (n=51)	33	62.3%
ONCOLOGÍA (n=4)	2	3.8%
PEDIATRÍA (n=6)	0	0.0%
UROLOGÍA (n=2)	1	1.9%
<b>TOTAL:</b>	<b>53</b>	<b>100%</b>

De las 53 cepas productoras de MBLs. Los que más predominaron fueron 33 (62,3%) de pacientes procedentes del servicio de Medicina. Seguido de Geriatria que fueron 16 (30,2%). 2 (3,8%) dieron positivo a pacientes del servicios de oncología, 1 (1,9 %) que corresponde a pacientes que procedieron del servicio urología, 1 (1,9%) fue positivo a paciente que provenían del servicio de gastroenterología. Finalmente el servicio que no presento cepas productoras de MBLs fue de pediatría 0%.

**Gráfico n° 10:** Distribución de MBLs en aislamientos según los diferentes servicios asistenciales



## 4.2. Discusión

*P. aeruginosa* es uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones intrahospitalarias, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, en alteraciones de las barreras físicas (quemaduras, cirugías) y de enfermedades subyacentes, (fibrosis pulmonares, quísticas y diabetes mellitus).

Además presenta un alto índice de presentar resistencia intrínseca a los antibióticos y de adquirir mecanismos de resistencia, los cuales pueden ser por mutación o adquisición de nuevos genes.

La detección de Metalobetalactamasas (MBL) en *P. aeruginosa* en el laboratorio, requiere de técnicas especiales, que por el momento aún no están estandarizados, pero las pruebas fenotípicas de tamizaje se basan en la propiedad que las MBLs poseen de ser inhibidas por quelantes metálicos.

El grado de inhibición depende a la familia a la que pertenece, del tipo de quelante usado (EDTA, MPA, etc.).

En este trabajo de tesis realizado con cepas obtenidas que pertenecen al periodo abril 2016 – julio 2017, es multicéntrico y fenotípico en 300 cepas, de las cuales 89 cumplieron el criterio de inclusión, aquellas que eran resistentes a Carbapenemes (Imipenem y/o Meropenem).

Si bien es cierto, la situación epidemiológica es particular para cada institución de salud, éstas llevan una reciprocidad en el porcentaje de MBLs encontradas.

Las MBLs fueron detectadas por dos métodos Doble Disco (DDS) y Disco Combinado (DCOM).

Por el método del doble disco se obtuvieron 53 cepas que corresponde al 59.6% y por el método de Disco combinado se obtuvieron 39 cepas que corresponde al 43.8%. Estos porcentajes difieren, ya que estos son altos comparándolos con estudios anteriores.

En los estudios de G. Paniez en 2006 “Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires” los resultados llegaron al 11%.

En “Detección y caracterización molecular de metalo- $\beta$ -lactamasas en aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados en el instituto nacional de salud del niño” Lima – Perú del año 2013; se detectaron el 20% de cepas productoras de MBLs.

Según la compilación de estudios de Carlos Bolaños en el 2016 “Patrones fenotípicos de resistencia en *P. aeruginosa* de muestras clínicas a nivel de Sudamérica”. En el periodo 2007 – 2010 en Sudamérica los hallazgos obtenidos fueron del 23.1% de MBL en *P. aeruginosa*, en Asia, en el mismo periodo, el porcentaje hallado de MBL fue el mismo.

En el presente estudio, en todos los centros de salud se obtuvieron porcentajes de más de 50% de MBL, aquí colocas los porcentajes en cada clínica.

Las MBLs han emergido en el mundo entero como un importante mecanismo de resistencia a los carbapenemes entre bacilos Gram negativos no fermentadores. Las informaciones actuales, sobre las presencia de estas enzimas en el Perú, están en estudio. Patrones fenotípicos de resistencia en *P. aeruginosa* de muestras clínicas a nivel de Sudamérica.

### 4.3. Conclusiones

- En esta investigación se encontró una tasa de frecuencia 59.6% (53/89) de MBLs en *P. aeruginosa* aisladas en clínicas privadas de Lima, periodo 2016-2017.
- De las 53 cepas aisladas, procedentes de las diferentes clínicas privadas, las que mostraron mayor la producción de MBLs fueron las muestra de vías respiratorias 26/53(49,1%), seguida de las muestra de orina 18/53 (34,0%), herida 6/53 (11,3%), sangre 2/53 (3,8%), finalmente las muestra de líquidos biológicos 1/53 (1,9%).
- De las 53 cepas productoras de MBLs, 35 fueron de pacientes hospitalizados, lo cual representa 69% de frecuencia. Asimismo 16 fueron de pacientes ambulatorios lo cual representa 31%.
- De las 53 cepas productoras de MBLs. Los que más predominaron fueron 33 (62,3%) de pacientes procedentes del servicio de Medicina. Seguido de Geriatría que fueron 16 (30,2%). 2 (3,8%) dieron positivo a pacientes del servicios de oncología, 1 (1,9 %) que corresponde a pacientes que procedieron del servicio urología, 1 (1,9%) fue positivo a paciente que provenían del servicio de gastroenterología. Finalmente el servicio que no presentó cepas productoras de MBLs fue de pediatría 0%.

#### 4.4. Recomendaciones

- La detección de MBL en *P. aeruginosa* a partir de muestras clínicas se ha observado en muchas partes del mundo. Lo cual permite apreciar la creciente de los últimos años y que pueden ser responsables de epidemias hospitalarias graves y prolongadas.
- Ante los resultados presentados, se observa la gran importancia de la caracterización molecular de las MBL producidas por *P. aeruginosa* presentes en nuestro medio. Las dificultades de tratamiento causados por variantes multirresistentes y de los impactos clínicos y epidemiológicos deben activar a los equipos de vigilancia epidemiológica en las diferentes instituciones de salud, para así promover los controles necesarios para evitar su diseminación.
- Se recomienda continuar el presente trabajo de manera más profunda, para determinar y caracterizar genotípicamente, a las MBLs responsables de la resistencia a carbapenemes en aislamientos de *P. aeruginosa* a través de un estudio por Biología molecular.
- El método de sinergia de doble disco es el más sensible y fue con que obtuve mejores resultados. Recomendaría su uso en los laboratorios de Microbiología seguidamente la prueba de disco combinado con EDTA.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Movilizar la voluntad política para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Bull World Health Org.* 2011; 89:168–169. Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/89/3/11-030311/es/>
2. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: Consecuencia para la infectología. *Rev Panam Salud Pública.* 2011; 30(6):519-528.
3. Velásquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsquispe R, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Soc Perú Med Interna.* 2013; 26(4): 192-196.
4. Perozo AJ, Castellano MJ, Tutaya K, Ling E, Arraiz N. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera.* 2013; 41(2):115-126.
5. Laboratorio de infecciones Intrahospitalarias, CNSP – INS. Perú. Informe de la resistencia de origen antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario. Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias. Perú INS: Centro Nacional de Salud Pública; 2012.
6. Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(Supl 4):4-9.
7. Gonzales E. Detección y caracterización molecular de metalo- $\beta$ -lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados en el Instituto

Nacional de Salud del Niño Lima-Perú. [Investigación en línea]. 2013; Universidad Mayor de San Marcos; 2013.

<http://www.insn.gob.pe/investigaciones/sites/default/files/Informe%20Final%20OTO-02-2011.pdf>.

8. Bolaños C, Lannacone J. Patrones fenotípicos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* de muestras clínicas a nivel de Sudamérica. Cátedra Villarreal. 2016; 4(1): 73-100.
9. Valderrama SL, Gonzales PF, Caro MA, Ardila N, Ariza B, Gil F, Álvarez C. Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. Biomédica. 2016; 36(Supl.1):69-77.
10. Gonzales E, Taboada W, Champi R, Soto J, Flores W, Lovera M, et al. Metallo- $\beta$ -lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2013; 30(2): 241-245.
11. Gonzales E. Metallo- $\beta$ -lactamasas: ¿el fin de los  $\beta$ -lactámicos? Revista Peruana de Epidemiología. 2012; 16(3): 01-08.
12. Cornejo JR, Ramírez A. Resistencia antimicrobiana de bacterias cultivadas en la Unidad de cuidados intensivos de adultos. Enf Inf Microbiol 2012; 32(4):127-133.
13. Gómez CA, Leal AL, Pérez MJ, Navarrete ML. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. Rev Fac Med Univ Nac Colomb. 2005; 53(1):27-34.
14. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gram negativos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29(7): 524–534.

15. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(5):381-393.
16. Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, et al. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos Gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Rev Asoc Argent Microbiol.* 2011; 43: 136-153.
17. Bareja R, Grover PS, Singh V, Shinu P, Sharma M, Kumar A, et al. Rapid detection of metallo- $\beta$ -lactamase in carbapenm resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *JARBS in Biological Sciences.* 2011; 3(2): 90-93.
18. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *J Clin Microbiol.*2000; 38(1):40-43.
19. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7(2):88-91.
20. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol.*2003; 41(10):4623-4629.

21. Oh E-J, Lee S, Park Y-J, Park JJ, Park K, Kim S-I, et al. Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. *J Microbiol Methods*. 2003; 54(3):411-418.
22. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol*. 2002; 40(10):3798-3801.
23. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol*. 2008; 26(3):233-237.
24. Perozo AJ, Castellano MJ, Ling E, Arraiz N. Detección fenotípica de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera*. 2012; 40(2):113-121.
25. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 49(1):5-11.
26. Galloso PC, Lezcano MT, Quiroga M. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas. *Rev. Cienc. Tecnol*. 2010; 12(14): 8–13.
27. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and Specific Modified Hodge Test for KPC and Metallo-Beta- Lactamase

- Detection in *Pseudomonas aeruginosa* by Use of a Novel Indicator Strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. J Clin Microbiol. 2011; 49(12):4301-3.
28. Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Bakšytė G, Macas G, Sakalauskas R. Characteristics of Carbapenem-Resistant *P. aeruginosa* Strains in Patients with Ventilator-Associated Pneumonia in Intensive Care Units. Medicina (Kaunas). 2011; 47(12):652-656.
29. Díaz JA. Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008. [Tesis]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.

## ANEXO N° 1

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**Código:** 157E\_MDFJ280517

**Fecha:** 28/05/17

**Edad:** 95

**Procedencia del paciente:**

Hospitalizado ( )

Ambulatorio ( X )

**1. Procedencia según su especialidad:**

Medicina General ( )

Geriatría ( X )

Oncología ( )

Infectología ( )

Pediatría ( )

Nefrología ( )

Neumología ( )

Otros.....

**2. Tipo de muestra:**

Sangre ( )

Orina ( )

Secreción de herida ( )

Punta de catéter ( )

Líquido biológico ( )

Vías respiratorias ( X )

**3. Germen aislado:**

*Pseudomonas aeruginosa* ( X )

**4. Susceptibilidad antibiótica:**

Sensible = S

Intermedio = I

Resistente = R

Aztreonam ( )

Meropenem ( R )

Ceftazidima ( S )

Piperacilin tazobactam ( )

Gentamicina ( )

Amikacina ( )

Cefepime ( )

Colistin ( )

Imipenem ( R )

Ciprofloxacino ( )

---

**Resultado de la Prueba:**

Positivo: ( P )

Negativo: ( N )

Prueba de disco combinado con inhibidor EDTA ( P )

Prueba de sinergia doble disco ( P )

Metalobetalactamasas ( P )

## ANEXO N° 2

### PRUEBA DE SINERGIA DE DOBLE DISCO (DDS)

Prueba fenotípica para la detección de MBLs, en aislamientos de Enterobacterias y Bacilos Gram negativos no fermentadores.

#### FUNDAMENTO

Se basa en la sinergia que existe entre un agente quelante como el EDTA y los antimicrobianos B-lactámicos, Imipenem y Meropenem. (Se sabe que las MBLs requieren zinc para hidrolizar a los B-lactámicos, por ello se emplea la propiedad quelante del EDTA en la captura de este elemento, con lo que se inhibe la actividad enzimática).

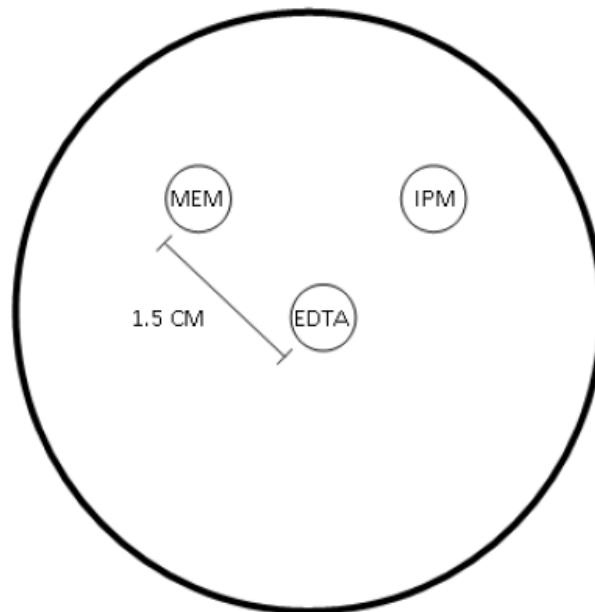
#### MATERIALES

1. Agar Mueller-Hinton
2. Hisopos estériles
3. Escala de McFarland 0.5
4. Cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922
5. Cepas de enterobacterias y Bacilos no fermentadores que cumplan los criterios de estudio.
6. Caldo TSB
7. Los discos de EDTA 750 µg
8. Imipenem (IPM) 10µg,
9. Meropenem (MEM) 10µg

#### PROCEDIMIENTO

- Realizar el antibiograma de acuerdo a los lineamientos del CLSI.
- Para la prueba de sinergia emplear discos de EDTA ( Imipenem Meropenem).
- En una placa de agar Mueller-Hinton, hisopar una suspensión de la cepa (0.5 escala de McFarland),

- Colocar un disco de EDTA en el centro de la placa, un disco de IPM y MEM a 1.0 a 1.5 cm del disco de EDTA (centro a centro). (Fig. N° 1).
- Para culminar, llevar a incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 16-20 horas.



**Figura N°1.** Representación esquemática de la distribución de los discos para la prueba de Sinergia de doble disco. IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

## **RESULTADO**

Evaluar la lectura visualmente, observar la apariencia de las zonas de inhibición. Interpretar los resultados como positivos, si se observa una ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre el carbapenémico y el inhibidor.





Figura N°2. Cepa de *P. aeruginosa*



Figura N°3. Discos que se emplea para la prueba de sinergia de doble disco con EDTA. Disco de MEM 10 ug, EDTA 750 mcg, IPM 10ug



**Figura N°4.** Representación esquemática de la distribución de los discos para la prueba de Sinergia de doble disco. IPM:Imipenem, MEM: Meropenem, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

## ANEXO N° 3

### PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDOR (EDTA)

Prueba fenotípica para la detección de MBLs, en aislamientos de Enterobacterias y Bacilos Gram negativos no fermentadores.

#### FUNDAMENTO

Se basa en el uso de un disco con una combinación de EDTA + carbapenem versus un disco de carbapenem sólo, ambos colocados sobre una cepa problema. La acción inhibitoria del EDTA sobre las MBLs se visualiza con la medición del halo de inhibición alrededor del disco que será mayor al menos en 5 mm que el halo del disco que sólo contiene carbapenem.

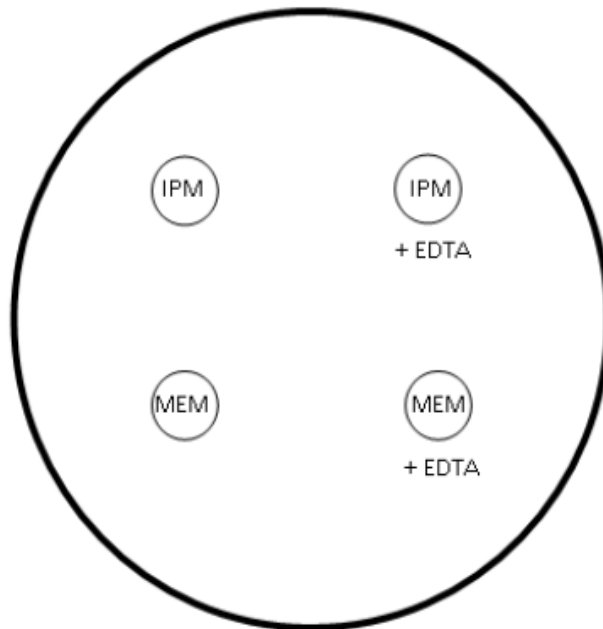
#### MATERIALES

1. Agar Mueller-Hinton
2. Hisopos estériles
3. Escala de McFarland 0.5
4. Cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922
5. Cepas de Enterobacterias y Bacilos No fermentadores que cumplan los criterios de estudio.
6. Caldo TSB
7. Los discos de EDTA 750µg
8. Imipenem (IPM) 10µg,
9. Meropenem (MEM) 10µg
10. Imipenem (IPM) 10µg, + EDTA 372µg
11. Meropenem (MEM) 10µg + EDTA 372µg

#### PROCEDIMIENTO

- Emplear discos de IPM y MEM con EDTA.
- Seguir el protocolo estándar de un antibiograma,
- En una placa de Agar Mueller-Hinton, inocular una suspensión de la cepa problema (0.5 escala de McFarland),

- Colocar un disco de IPM, MEM y los discos de IMP-EDTA y MEM-EDTA. (Fig. N° 2).
- Para concluir, llevar a incubar a  $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 16-20 horas.



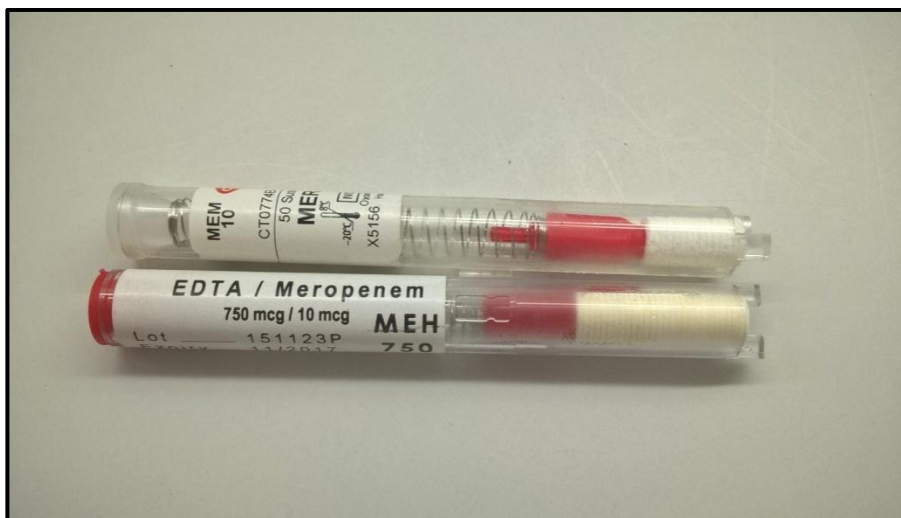
**Figura N°5.** Representación esquemática de la distribución de los discos para la prueba de Discos combinado con inhibidor (EDTA). EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem.

## RESULTADOS

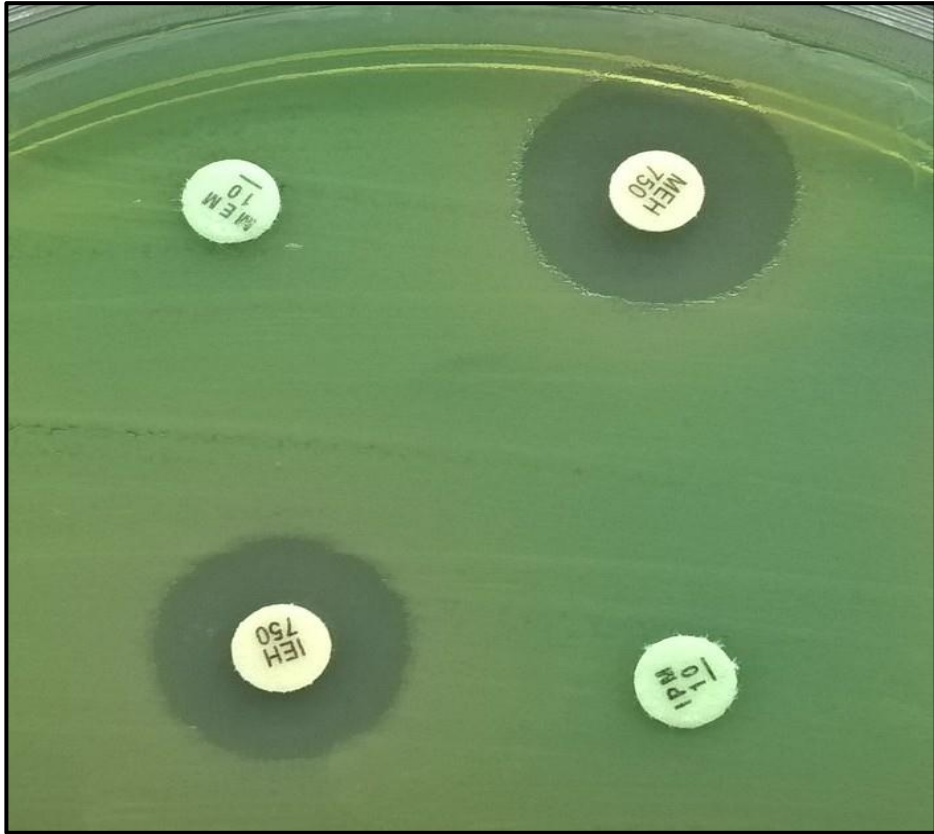
Interpretar los resultados midiendo en milímetros los diámetros de la zona de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco). El incremento mayor o igual a 5 mm de diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor comparado al del carbapenémico, se interpretará como positivo.



**Figura N°6.** Discos que se emplea para la prueba de sinergia de doble disco. Disco EDTA 750 mcg y IPM10 mcg



**Figura N°7.** Discos que se emplea para la prueba de sinergia de doble disco. Disco EDTA 750 mcg y MEM 10 mcg



**Figura N°8.** Representación esquemática de la distribución de los discos para la prueba de Discos combinado con inhibidor (EDTA). EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem.

## ANEXO N° 4

### TEST DE HODGE MODIFICADO (MHT)

Prueba fenotípica para la detección de carbapenemasa en aislamientos de Bacilos Gram negativos no fermentadores.

#### FUNDAMENTO

Se basa en el uso de una cepa indicadora: *K. pneumoniae* ATCC 700603. Para ello se resembró en agar Mac Conkey y se incubó a 35°C por 16-20 horas la cepa indicadora. La cepa indicadora se suspendió con una turbidez equivalente a un 0.5 de la escala de Mc Farland y se inoculó en una placa de Mueller-Hinton a partir de la suspensión 0.5 Mc Farland. En cada uno de ellas se colocó un disco de IPM o MEM en el centro de las placas y se realizó un estría de 2-3cm de la muestra (3-5 colonias). Finalmente, se llevó a incubar 35°C±2°C por 16-20 horas.

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: positivo, si había presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora de lo contrario, negativo.

#### MATERIALES

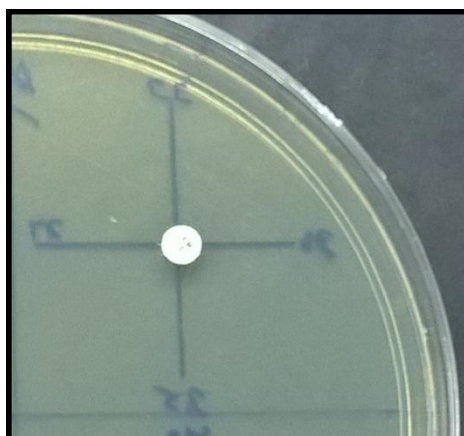
1. Agar Mueller-Hinton
2. Hisopos estériles
3. Escala de Mc Farland 0.5
4. cepa indicadora: *K. pneumoniae* ATCC 7006035.
5. Cepas de Bacilos No fermentadores que cumplan los criterios de

estudio.

6. Caldo TSB
7. Imipenem (IPM) 10 $\mu$ g,
8. Meropenem (MEM) 10 $\mu$ g

## PROCEDIMIENTO

- Emplear discos de IPM o MEM
- Seguir el protocolo estándar de un antibiograma,
- En una placa de Agar Mueller-Hinton, inocular una suspensión de la cepa indicadora: *K. pneumoniae* ATCC 700603. (0.5 escala de Mc Farland),
- Se colocó un disco de IPM o MEM en el centro de las placas,
- Se realizó un estría de 2-3cm de la muestra (3-5 colonias).
- Finalmente, se llevó a incubar 35°C $\pm$ 2°C por 16-20 horas.



**Figura N°9.** Representación esquemática de la distribución del disco carbapenem (imipenem, ertapenem o meropenem) para el test de Hodge modificado *K. pneumoniae* (ATCC 700603) y la estría de 2-3 cm de la muestra de la cepa problema.



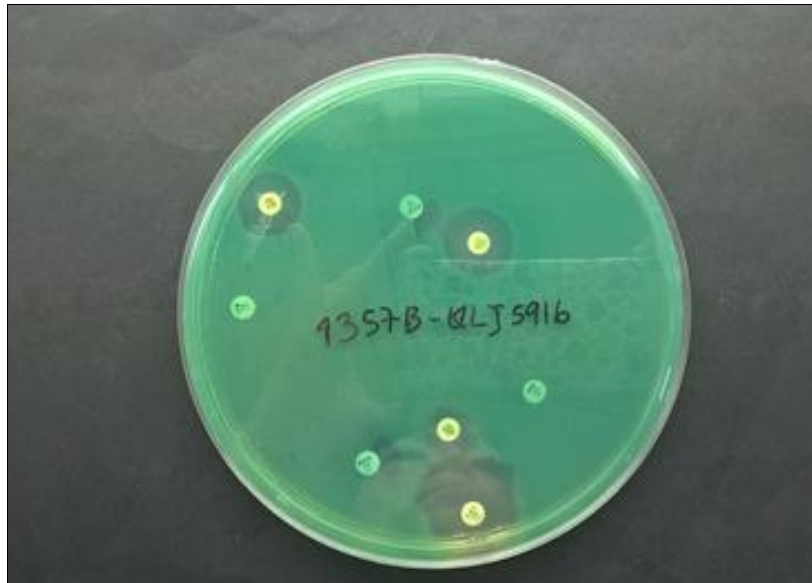
## RESULTADOS

Interpretar los resultados de la siguiente manera: positivo, si hay presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora de lo contrario, negativo (Figura N°4).

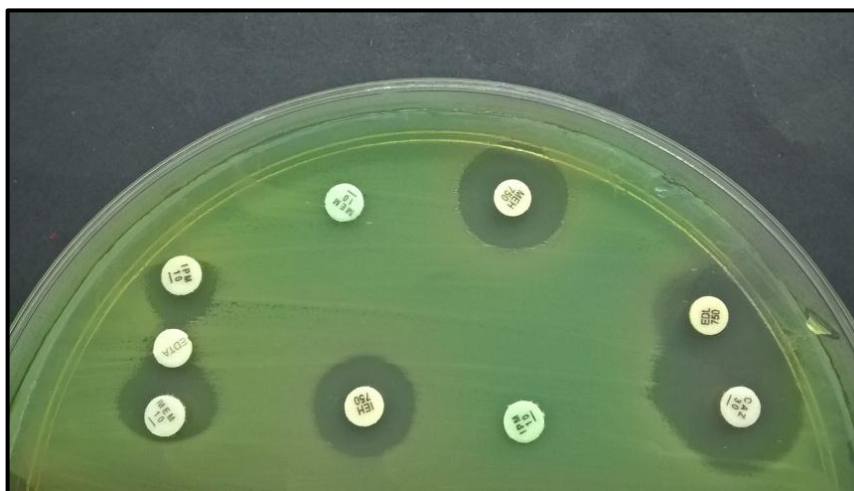


**Figura N°10.** Resultado positivo: se evidencia por el crecimiento de la cepa ATCC700603 *K. pneumoniae* en la parte de intersección entre el halo de inhibición, generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa problema formando una hendidura en la parte proximal al disco. Esto indica la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que son liberados al medio y permiten el crecimiento de *K. pneumoniae*.

**FOTOGRAFIAS DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* positivas a MBLs.**



**Figura N°11.** Muestra la prueba de sinergia de doble disco con EDTA, IPM frente a EDTA y MEM frente al EDTA. La prueba de disco combinado con EDTA. Se observa la diferencia de halos >5 mm de IPM frente a IPM+EDTA y MEM frente a MEM + EDTA.

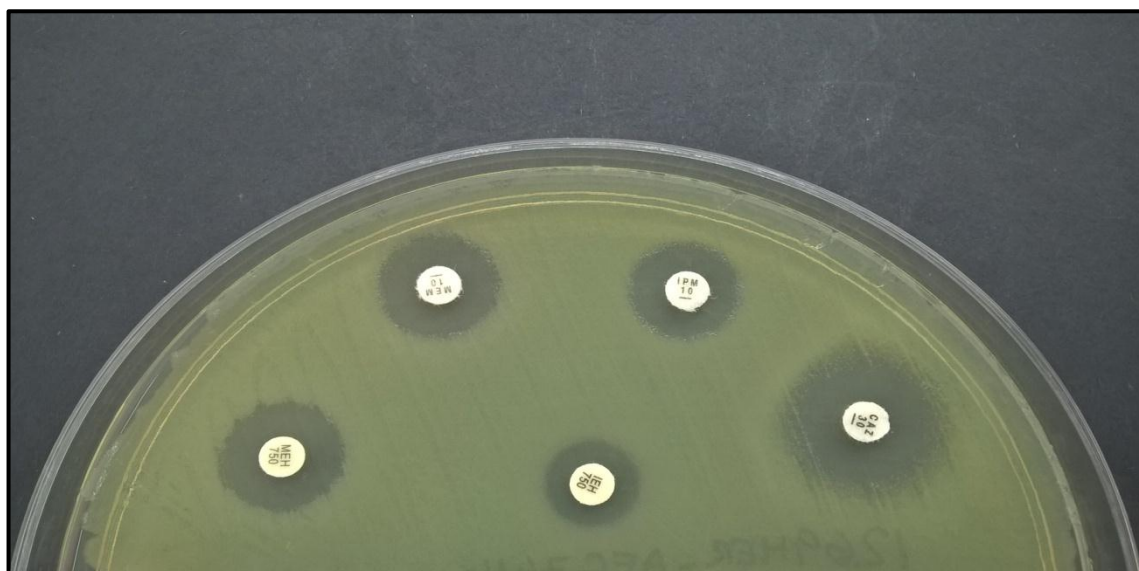


**Figura N°12.** Se observa la producción de MBLs. Prueba de Sinergia de doble disco con EDTA, se aprecia la sinergia de los Carbapenemes frente al EDTA. La prueba de disco combinado, se observa la diferencia de halos de los Carbapenem. IPM.

**FOTOGRAFIAS DE CEPAS DE *P. aeruginosa* negativas a MBLs.**

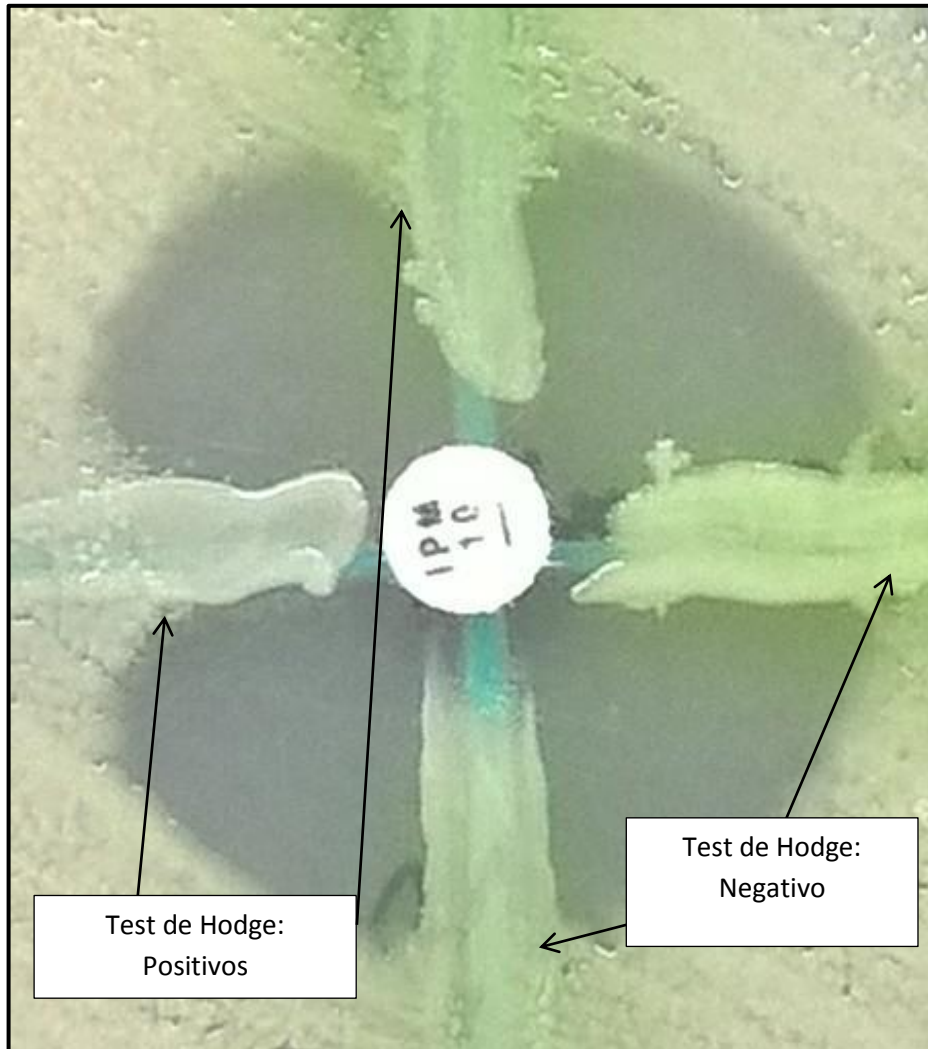


**Figura N°13.** Foto muestra la prueba de sinergia de doble disco, no se observa sinergia: IPM frente al disc EDTA y MEM y a la prueba de disco combinado con EDTA: Negativo.



**Figura N°14.** Foto muestra la prueba de disco combinado con EDTA: NEGATIVO. No se aprecia la diferencia de halos, IPM frente a IPM+ EDTA y MEM frente a MEM + EDTA.

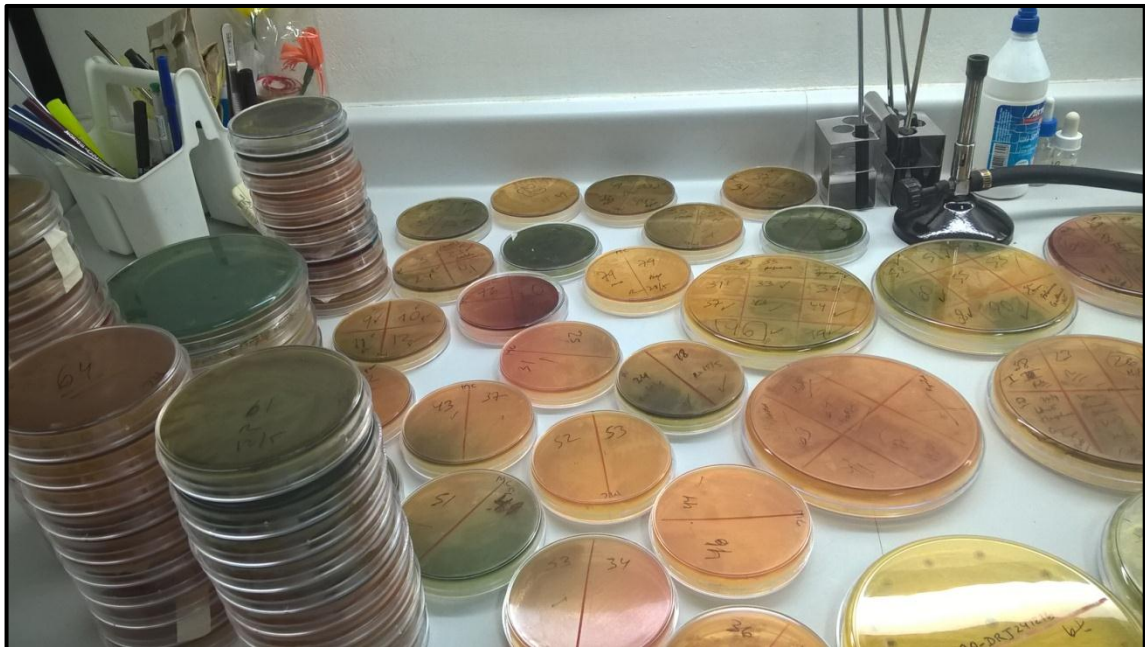
FOTOGRAFIAS DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* de TEST de HODGE



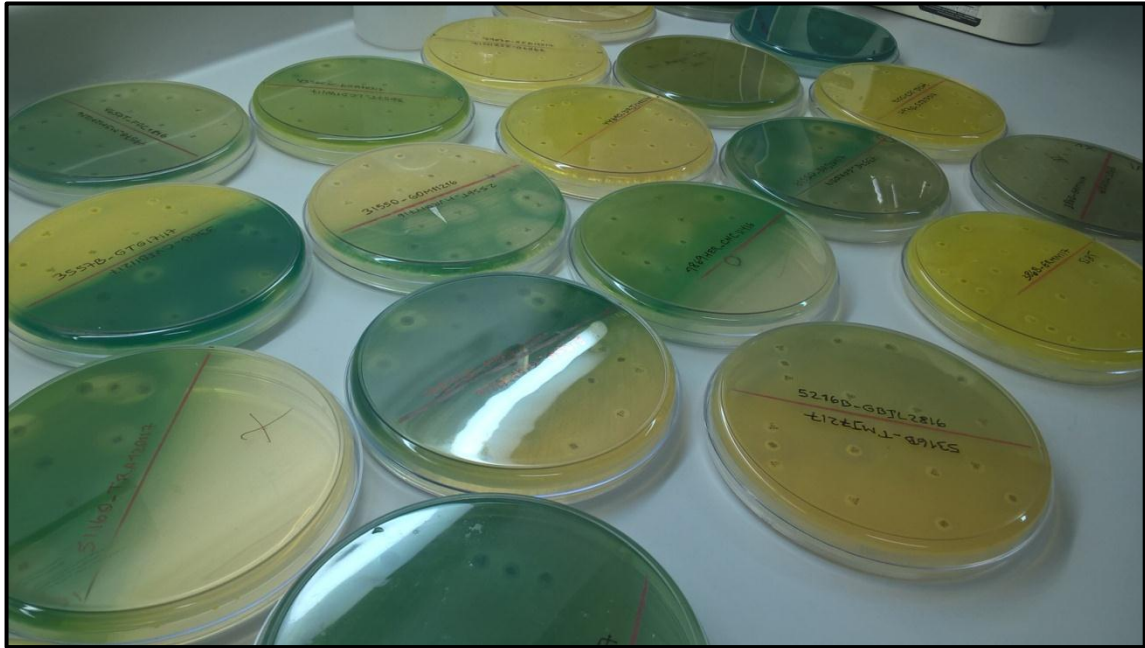
**Figura N°15.** Resultado positivo: se evidencia por el crecimiento de la cepa ATCC 700603 *K. pneumoniae* en la parte de intersección entre el halo de inhibición, generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa problema formando una hendidura en la parte proximal al disco. Esto indica la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que son liberados al medio y permiten el crecimiento de *K. pneumoniae* (como indica en la flecha).



**Figura N°16.** Mesa de ejecución de proyecto. Cepas de *P. aeruginosa*.



**Figura N°17.** Mesa de ejecución de proyecto. Mostrando las diferentes cepas de *P. aeruginosa*.



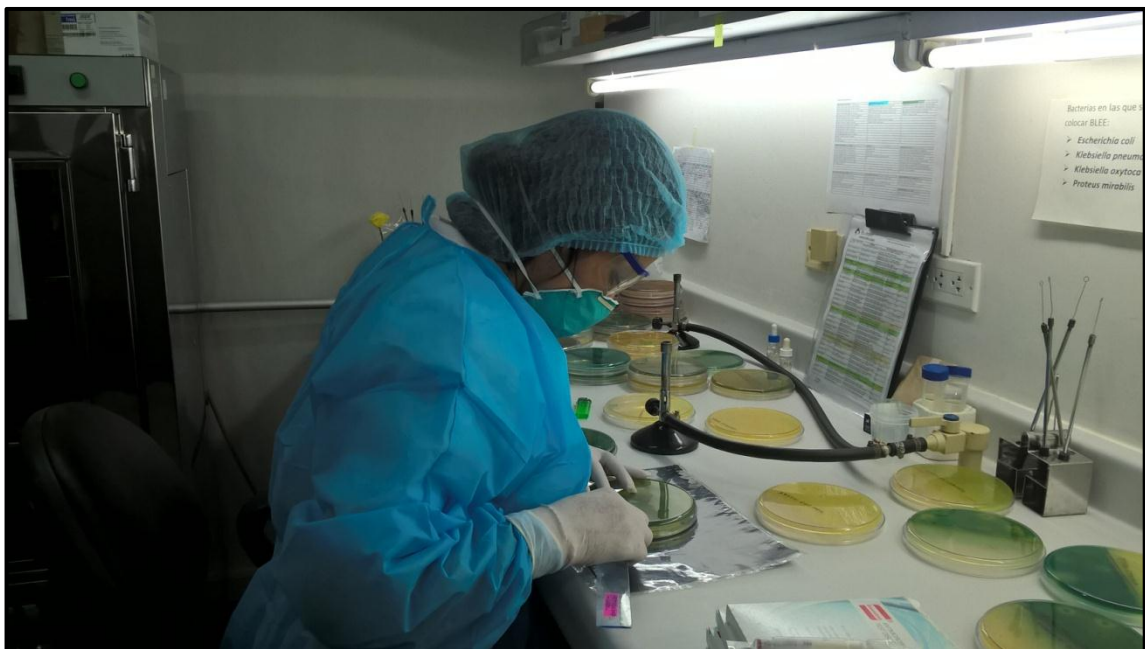
**Figura N°18.** Mesa de ejecución de proyecto. Cepas de *P. aeruginosa*.



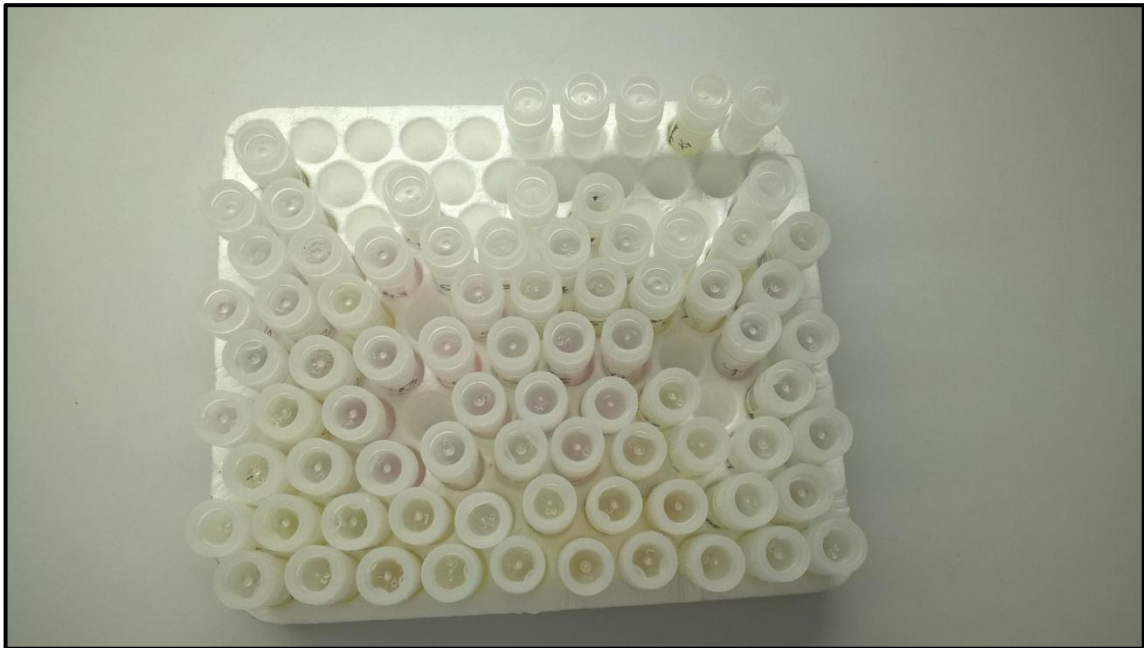
**Figura N°19.** Mesa de ejecución de proyecto. Pleno desarrollo del proyecto, realizando la lectura de antibiograma.



**Figura N°20.** Mesa de ejecución de proyecto. Pleno desarrollo del proyecto, realizando la lectura de antibiograma.



**Figura N°21.** Mesa de ejecución de proyecto. Pleno desarrollo del proyecto, realizando la lectura de antibiograma.



**Figura N°22.** Mostrando la cantidad de cepas de *P.aeruginosa*.



**Figura N°23.** Mostrando la cantidad de cepas de *P.aeruginosa*.



**MATRIZ DE CONSISTENCIA**  
**TÍTULO: “DETECCIÓN FENOTÍPICA DE METALOBETALACTAMASAS EN *Pseudomonas aeruginosa*, AISLADAS EN CLÍNICAS PRIVADAS DE LIMA, PERIODO 2016 - 2017”**

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES DE ESTUDIO	DIMENSIONES Y ESCALAS	INTRUMENTOS DE MEDICIÓN	METODOLOGÍA
<p><b>Problema Principal</b></p> <p>¿Cuanto es la frecuencia fenotípica de Metalobetactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017?</p>	<p><b>Objetivo General</b></p> <p>Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017.</p>	<p>Metalobetactamasas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disco de difusión</li> <li>- Halo de Inhibición: (+) y (-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Observación macroscópica.</li> </ul>	<p>Diseño de estudio: Descriptivo de corte Transversal</p>
<p><b>Problema Específico 1:</b></p> <p>¿Cuanto es la frecuencia fenotípica de Metalobetactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según tipo de muestra?</p>	<p><b>Objetivo Específico 1:</b></p> <p>Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según tipo de muestra.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Según tipo de muestra</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Heridas</li> <li>- Líquidos biológicos</li> <li>- Orina</li> <li>- Punta de catéter</li> <li>- Sangre</li> <li>- Vías respiratorias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ficha de recolección de datos.</li> </ul>	<p>Población y muestra: 89 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES DE ESTUDIO	DIMENSIONES Y ESCALAS	INTRUMENTOS DE MEDICIÓN	METODOLOGÍA
<p><b>Problema Específico 2:</b></p> <p>¿Cuanto es la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según su procedencia?</p>	<p><b>Objetivo Específico 2:</b></p> <p>. Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según su procedencia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Según su procedencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pacientes ambulatorios</li> <li>- Pacientes hospitalizados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ficha de recolección de datos.</li> </ul>	<p><b>Diseño de estudio:</b> Descriptivo de corte Transversal</p> <p><b>Población y muestra:</b> 89 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
<p><b>Problema Específico 3:</b></p> <p>¿Cuanto es la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según los diferentes servicios asistenciales?</p>	<p><b>Objetivo Específico 3:</b></p> <p>Determinar la frecuencia fenotípica de Metalobetalactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas en clínicas privadas de Lima, periodo 2016 - 2017, según los diferentes servicios asistenciales.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Según los diferentes servicios asistenciales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gastroenterología</li> <li>- Geriatria</li> <li>- Medicina</li> <li>- Oncología</li> <li>- Pediatría</li> <li>- Urología</li> </ul>		