



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
Y CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA  
ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA  
PATOLOGICA**

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE  
ESPECIES DE *Pseudomonas aeruginosa* SENSIBLES Y  
RESISTENTES A LOS ANTIBIOTICOS AISLADAS EN  
MUESTRAS DE PACIENTES DEL CENTRO MÉDICO NAVAL  
“CMST” ENTRE AGOSTO DEL 2015 Y ENERO DEL 2016”**

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

**PAOLO ANDREE LÓPEZ ESPÍRITU**

**ASESOR:**

**Lic. JOSE CARLOS PAICO VARGAS**

Lima, Perú

2017



# HOJA DE APROBACIÓN

Paolo Andree López Espíritu

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ESPECIES DE *Pseudomonas aeruginosa* SENSIBLES Y RESISTENTES A LOS ANTIBIOTICOS AISLADAS EN MUESTRAS DE PACIENTES DEL CENTRO MÉDICO NAVAL “CMST” ENTRE AGOSTO DEL 2015 Y ENERO DEL 2016”**

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 mis padres, Jesús Manuel López Vasquez e Idinayla Aida Espíritu Alberco, por haber hecho los sacrificios necesarios por los cuales yo pude llegar tan lejos.

A mis hermanos, Juan Ignacio López Espíritu y Marlon Jesús López Espíritu, quienes confiaron en que yo lograría llegar lejos por mis propios esfuerzos.

A mi tía Very Espíritu Alberco, por haberme apoyado en los recursos que necesitaba.

A la licenciada Pilar Alva Betalleluz, quien vio un gran potencial en mis capacidades académicas, y me dio las herramientas que hoy en día me ayudaron a construir esta tesis.

Al licenciado José Carlos Paico Vargas, por haberme dado su apoyo en cada una de las investigaciones que lleve a cabo, y motivarme a llegar lejos.

A Gabriela Vilcayauri Llaullipoma, por su apoyo incondicional ante los retos y decisiones que debía tomar para seguir adelante.

A mis amistades, quienes me dieron los ánimos y la confianza que necesitaba de ellos para desarrollarme como profesional.

A todos los docentes, licenciados y doctores, tanto de la Universidad Alas Peruanas como del Centro Médico Naval, quienes me enseñaron los principios que debe tener un profesional en Tecnología Médica.

Se agradece su contribución para el desarrollo de esta tesis:

A la Lic. TM. TF. Nidia Yanina Soto Agreda, por su asesoría y ayuda constante en la realización del presente trabajo.

A mi Alma Mater “UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS” quien la llevo en mi corazón a todo lugar y en todo momento.

Al licenciado José Carlos Paico Vargas

Al licenciado José Lévano

A todo el personal del Departamento de Microbiología

A los doctores responsables del Área de Anatomía Patológica del Centro Médico Naval y el NAMRU-06

## EPÍGRAFE

“Si supiese lo que estoy haciendo, no le llamaría investigación”

(Einstein A.)

## RESUMEN

Con el propósito de determinar los mecanismos de resistencia presentes en aislamientos de *P. aeruginosa* mediante pruebas fenotípicas sencillas y pruebas moleculares, se estudiaron 40 aislamientos resistentes o sensibles a los antibióticos de rutina, recuperadas de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Centro Médico Naval entre Agosto del 2015 y Enero del 2016.

Los métodos ensayados fueron el Test de Hodge Modificado, el Test Sinérgico de Doble disco para detección de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (Amoxicilina-Acido Clavulánico + Ceftazidima + Cefepime), Metalo Beta Lactamasas (EDTA + Imipenem + Meropenem) y Carbapenemasas de Clase A (Ácido Borónico + Imipenem + Meropenem), Método de Aproximación de Discos (AmpC Inducibles) y Pruebas Moleculares (PCR Convencional) para la detección de los genotipos IMP, VIM y NDM.

El Test de Hodge Modificado tuvo cierta correlación con los resultados positivos del Test Sinérgico de Doble Disco para la detección de MBL, a pesar no haber una correlación completa con los resultados negativos entre ambas pruebas. El Test Sinérgico de Doble Disco para la detección de Carbapenemasas de Clase A dio resultados comparables a los obtenidos en el Método de Aproximación de Discos. Se observó un predominio en el genotipo IMP en comparación con el genotipo VIM y NDM.

Respecto a las muestras obtenidas y la fuente del aislamiento, se debe priorizar la mejora en los protocolos de asepsia de un centro de salud y una adecuada toma de muestras para estudios microbiológicos. Acerca de los ensayos fenotípicos y moleculares, tomando en cuenta los resultados obtenidos, se sugiere implementar el test de Hodge

Modificado en conjunto con el Método de Aproximación de Discos y el Test Sinérgico de Doble Disco para la detección de MBL. Acerca de las BLEE, se sugiere emplear métodos fenotípicos diferentes a los especificados en este estudio. También se debe considerar el empleo de técnicas moleculares para una mejor vigilancia epidemiológica en cuanto a los mecanismos de resistencia presentes en *Pseudomonas aeruginosa*.

**Palabras Clave:** Pseudomonas aeruginosa; Resistencia a los Antibióticos; Métodos de identificación Fenotípica; Métodos de identificación Genotípica; PCR Convencional.



## ABSTRACT

In order to determine the mechanisms of resistance present in *Pseudomonas aeruginosa* isolates by simple phenotypic tests and molecular tests, 40 isolates resistant to or sensitive to routine antibiotics recovered from outpatients and hospitalized patients from the Naval Medical Center between August 2015 And January 2016.

The methods tested were the Modified Hodge Test, the Double Disc Synergistic Test for the detection of Extended Spectrum Beta Lactamases (Amoxicillin-Clavulanic Acid + Ceftazidime + Cefepime), Metallo Beta Lactamases (EDTA + Imipenem + Meropenem) and Class A Carbapenemases (Induced AmpC) and Molecular Tests (Conventional PCR) for the detection of IMP, VIM and NDM genotypes.

The Modified Hodge Test had some correlation with the positive results of the Double Disc Synergistic Test for the detection of MBL, despite not having a complete correlation between the negative results between both tests. The Double-Disc Synergistic Test for the detection of Class A Carbapenemases gave results comparable to those obtained in the Disc Approach Method. We observed a predominance in the IMP genotype compared to the genotype VIM and NDM.

Regarding the samples obtained and the source of the isolation, the improvement in the asepsis protocols of a health center and an adequate sampling for microbiological studies should be prioritized. Regarding the phenotypic and molecular tests, taking into account the results obtained, it is suggested to implement the Modified Hodge test in conjunction with the Disc Approach Method and the Double Disc Synergistic Test for the detection of MBL. Regarding ESBLs, it is suggested to use phenotypic methods different from those

specified in this study. Consideration should also be given to the use of molecular techniques for better epidemiological surveillance of resistance mechanisms present in *Pseudomonas aeruginosa*.

**Key Words:** Palabras Clave: *Pseudomonas aeruginosa*; Resistance to Antibiotics; Methods of phenotypic identification; Genotypic identification methods; Conventional PCR.

## INDICE

CARATULA.....	1
FICHA CATALOGRÁFICA.....	2
HOJA DE APROBACIÓN.....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTO.....	5
EPÍGRAFE.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
ÍNDICE.....	11
LISTA DE TABLAS.....	16
LISTA DE GRÁFICOS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	18
CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	
1.1 Planteamiento del Problema.....	20
1.1.1 Problema General.....	22
1.1.2 Problemas Específicos.....	22
1.2 Objetivos.....	22
1.2.1 Objetivo General.....	22

1.2.2	Objetivos Específicos.....	23
1.3	Justificación.....	23

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1	Bases Teóricas.....	25
2.1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
2.1.2	Fenotipo.....	27
2.1.3	Genotipo.....	28
2.1.4	Resistencia Bacteriana.....	28
2.1.5	Mecanismos de Resistencia Bacteriana.....	29
2.1.5.1	Enzimas Hidrolíticas.....	30
2.1.5.2	Modificación del Sitio Activo.....	34
2.1.5.3	Disminución de la permeabilidad de la pared celular.....	35
2.1.5.4	Bombas de Eflujo.....	36
2.1.6	Elementos de Diseminación Genética.....	36
2.1.6.1	Plásmidos.....	37
2.1.6.2	Integrones.....	38
2.1.7	Genotipo de los Mecanismos de Resistencia.....	39
2.1.7.1	Genotipo IMP.....	39
2.1.7.2	Genotipo VIM.....	40

2.1.7.3	Genotipo NDM.....	41
2.1.8	Categorías de Resistencia Adquirida.....	43
2.1.8.1	Multidrogorresistente (MDR).....	43
2.1.8.2	Extensamente Drogorresistente (XDR).....	44
2.1.8.3	Pan Drogorresistente (PDR).....	45
2.2	Antecedentes.....	46
2.2.1	Antecedentes Internacionales.....	46
2.2.2	Antecedentes Nacionales.....	51

### CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1	Diseño del Estudio.....	56
3.2	Población.....	56
3.2.1	Criterios de Inclusión.....	56
3.2.2	Criterios de Exclusión.....	56
3.3	Muestra.....	57
3.4	Operacionalización de Variables.....	57
3.5	Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	58
3.5.1	Medios de Cultivo.....	59
3.5.2	Técnicas Empleadas para la Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	60

3.5.3	Equipos para la Identificación de la Susceptibilidad a los Antibióticos.....	61
3.5.4	Pruebas de Identificación de los Mecanismos de Resistencia.....	61
3.5.4.1	Test de Difusión de Doble Disco.....	61
3.5.4.2	Test de Hodge Modificado.....	62
3.5.4.3	Método de Aproximación de Discos.....	63
3.5.4.4	Técnicas Moleculares.....	64
3.6	Plan de Análisis de Datos.....	64

#### CAPITULO IV: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1	Evaluación de los Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos en especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	65
4.1.1	Características de los pacientes.....	65
4.1.1.1	Edad Promedio de los Pacientes.....	65
4.1.1.2	Distribución por Edad de los Pacientes.....	66
4.1.1.3	Distribución por Sexo de los Pacientes.....	67
4.1.2	Características de la Muestra.....	68
4.1.2.1	Servicios de Procedencia de la Muestra.....	68
4.1.2.2	Tipos de Muestra Obtenida.....	69
4.1.2.3	Cepas Cultivadas para Estudio Fenotípico.....	71
4.1.3	Pruebas de Identificación de los Mecanismos de Resistencia....	72

4.1.3.1.	Caracterización fenotípica de los Mecanismos de Resistencia en especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	72
4.1.3.1.1	Test Sinérgico de Doble disco: Metalobetalactamasas.....	72
4.1.3.1.2	Test Sinérgico de Doble disco: BLEE.....	73
4.1.3.1.3	Test Sinérgico de Doble disco: Carbapenemasa de Clase A.....	74
4.1.3.1.4	Test de Hodge Modificado.....	75
4.1.3.1.5	Test de Resistencia Inducida.....	76
4.1.3.1.6	Caracterización fenotípica de los Mecanismos de Resistencia en especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en general.....	77
4.1.3.2	Caracterización genotípica de los Mecanismos de Resistencia en especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	79
4.1.3.2.1	Pruebas Moleculares – PCR Convencional.....	79
4.1.3.3	Susceptibilidad a los antibióticos en especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	81
4.2	Discusión.....	83
4.3	Conclusiones.....	87
4.4	Recomendaciones.....	90
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
	ANEXOS.....	98
	MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	104

## LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1	Edad Promedio.....	65
Tabla N° 2	Grupos Etarios de los Pacientes.....	66
Tabla N° 3	Sexo de los Pacientes.....	67
Tabla N° 4	Servicio de Recolección de Las Muestras.....	68
Tabla N° 5	Tipos de Muestras Obtenidas.....	69
Tabla N° 6	Cepas Cultivadas de las Muestras.....	71
Tabla N° 7	Test Sinérgico de Doble Disco para actividad MBL.....	72
Tabla N° 8	Test Sinérgico de Doble Disco para actividad BLEE.....	73
Tabla N° 9	Test Sinérgico de Doble Disco para Carbapenemasas Clase A...	74
Tabla N° 10	Test de Hodge Modificado.....	75
Tabla N° 11	Método de Aproximación de Discos – AmpC Inducibles.....	76
Tabla N° 12	Caracterización Fenotípica de Mecanismos de Resistencia mediante Pruebas de Microbiología.....	77
Tabla N° 13	Caracterización Genotípica de Mecanismos de Resistencia mediante Pruebas Moleculares.....	79
Tabla N° 14	Susceptibilidad a los antibióticos en especies de <i>P. aeruginosa</i> ..	81



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1	Grupos Etarios.....	66
Gráfico N° 2	Distribución por Sexo de los Pacientes.....	67
Gráfico N° 3	Tipos de Muestras Obtenidas.....	69
Gráfico N° 4	Cepas Cultivadas de las Muestras.....	71
Gráfico N° 5	Test Sinérgico de Doble Disco para actividad MBL.....	72
Gráfico N° 6	Test Sinérgico de Doble Disco para actividad BLEE.....	73
Gráfico N° 7	Test Sinérgico de Doble Disco para Carbapenemasas de Clase A.....	74
Gráfico N° 8	Test de Hodge Modificado.....	75
Gráfico N° 9	Método de Aproximación de Discos – AmpC inducibles.....	76
Gráfico N° 10	Caracterización Fenotípica de Mecanismos de Resistencia mediante Pruebas de Microbiología.....	77
Gráfico N° 11	Caracterización Genotípica de Mecanismos de Resistencia mediante Pruebas Moleculares.....	79
Gráfico N° 12	Susceptibilidad a los antibióticos en especies de <i>P. aeruginosa</i>	81

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales son un problema de salud que ha ido en aumento desde las últimas décadas, con la aparición de mecanismos de resistencia en especies patógenas que hoy en día se han vuelto de importancia clínica.

*P. aeruginosa* tiene una gran capacidad de adaptación a diversos entornos adversos, además de desarrollar o adquirir mecanismos de resistencia que representan un serio problema tanto para la salud de los pacientes ambulatorios como para los internados en los servicios hospitalizados.

Además de observar la creciente aparición de esta bacteria en diversos servicios del Centro Médico Naval, así como detectar la variedad de mecanismos que poseen para neutralizar a los antibióticos, se observó también que su procedencia no solo está restringida a los servicios de hospitalizados como la Unidad de Cuidados Intensivos, como se suele creer tradicionalmente, sino también de otros servicios donde los procedimientos de asepsia podrían no llevarse a cabo de manera correcta.

Por otra parte, también se toma en consideración que los métodos fenotípicos para la identificación de los mecanismos de resistencia no están bien estandarizados a pesar de encontrar una elevada resistencia a los antibióticos en muchos de los casos que se presentan a diario. Considerando además la creciente aparición de Metalo Beta Lactamasas y Carbapenemasas de Clase A, entre otras enzimas hidrolíticas que actualmente significan un problema de salud pública.

Por ello, se decidió llevar a cabo un estudio para determinar los mecanismos de resistencia presentes en las especies de *P. aeruginosa*, cuales son los ensayos

fenotípicos que se pueden llevar a cabo para identificarlos adecuadamente, además de procurar que dichos procedimientos estén al alcance de cualquier laboratorio, y la importancia de las pruebas moleculares para una adecuada vigilancia epidemiológica.

# CAPÍTULO I

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Planteamiento del Problema.

La bacteria identificada como *Pseudomonas aeruginosa* ha sido una de las principales responsables de las infecciones nosocomiales, aumentando la morbilidad y mortalidad en pacientes, debido a su alta capacidad de supervivencia en entornos que normalmente no ofrecerían sustento o preservación a bacterias con requerimientos nutricionales más elevados.

Entre sus características más representativas, está presente su capacidad para adquirir diversos mecanismos de resistencia, los cuales pueden ser originadas por el organismo en sí, siendo heredada por una o varias generaciones, o por adquisición de un material genético que produzca genes de resistencia y además se difunda en diferentes especies de bacterias patógenas. (1)

El mecanismo de resistencia más frecuente a los antibióticos de la familia de las oximino-cefalosporinas en *P. aeruginosa* está mediado por la ausencia de represión de las enzimas cromosómicas AmpC y a las bombas de salida. La resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima y cefepime) también puede resultar de la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). (2)

*P. aeruginosa* ha sido la mayor fuente de BLEE inusuales en el aspecto genético, como PER-1 y muchas  $\beta$ -lactamasas mutantes clase D de espectro extendido, que incluyen las enzimas OXA. (2)

El incremento del uso de los carbapenémicos para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram negativas resistentes a otros agentes  $\beta$ -lactámicos ha causado la emergencia de la resistencia a estos antibióticos por producción de Metalobetalactamasas, que pueden ser codificadas en los cromosomas o mediadas por plásmidos. (2)

El proceso de tipificar epidemiológicamente es importante para el reconocimiento de brotes infecciosos, la detección de transmisión cruzada entre patógenos nosocomiales, la determinación de la fuente de infección y el reconocimiento de cepas virulentas. (3)

Por lo tanto, además de la tipificación fenotípica, la tipificación molecular de patógenos microbianos también es de fundamental importancia para la elucidación de rutas de transmisión de clones en enfermedades infecciosas, para realizar hipótesis acerca de las fuentes y modos de transmisión de esas cepas y para monitorear reservorios de organismos epidémicos. La tipificación contribuye a la vigilancia epidemiológica y a la evaluación de medidas de control. (3)

Actualmente, los conocimientos que se encuentran al alcance de la medicina para identificar los mecanismos de resistencia de las bacterias, como su fenotipo, bioquímica y genotipo, permiten a los médicos definir nuevas bases para su tratamiento, además del desarrollo de nuevos antibióticos, y así evitar fracasos terapéuticos con los pacientes. (1)

Y el empleo de técnicas de biología molecular, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación automática, facilita la detección de material genético. Permitiendo además, el conocimiento de la secuencia específica de genes de

relevancia clínica de manera rápida y sensible, por lo cual es una alternativa efectiva para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a antibióticos comúnmente empleados en infecciones causadas por *P. aeruginosa*. (4)

### **1.1.1 Problema General**

¿Cuáles son los mecanismos de resistencia presentes en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en muestras de pacientes del Centro Médico Naval?

### **1.1.2 Problemas Específicos**

¿Cuál es la caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en pacientes del Centro Médico naval?

¿Cuál es la caracterización genotípica de los mecanismos de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en pacientes del Centro Médico naval?

¿Cuál es la caracterización de los aislamientos según la edad, sexo, tipo de muestra y procedencia?

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Determinar los mecanismos de resistencia presentes en cepas de *P. aeruginosa* mediante caracterización fenotípica y genotípica, aisladas en el periodo comprendido entre Agosto del 2015 y Enero del 2016.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

Determinar los mecanismos de resistencia de los especímenes de *P. aeruginosa* mediante caracterización fenotípica.

Determinar los mecanismos de resistencia de los especímenes de *P. aeruginosa* mediante caracterización genotípica empleando pruebas moleculares.

Determinar la caracterización de los aislamientos según la edad, sexo, tipo de muestra y procedencia.

### **1.3 Justificación**

Los índices de mortalidad por este tipo de infección a nivel mundial alcanzan valores alarmantes, 45% para neumonías adquiridas durante hospitalización, 60% para casos de bacteriemia y hasta 69,7% para casos de neumonía adquirida por el uso de ventilador mecánico (4).

En el Centro Médico Naval se han estado manifestando casos de pacientes infectados con cepas de *P. aeruginosa* multidrogo resistentes (MDR), y pese a que el tratamiento para las infecciones bacterianas esta predominada por los antibióticos, si el médico tratante no prescribe el tratamiento adecuado o los pacientes atendidos no siguen las indicaciones, con el tiempo las bacterias no solo sobreviven a los antibióticos, también desarrollan mecanismos de resistencia contra los mismos. Por ello es necesario detectar los mecanismos de resistencia de estas bacterias MDR empleando métodos de caracterización fenotípica y genotípica.

Esta investigación, aparte de determinar la frecuencia de los mecanismos de resistencia presentes en especies de *P. aeruginosa*, busca establecer un protocolo adecuado para identificar dichos mecanismos, los cuales si bien necesitan de una confirmación de los resultados mediante técnicas moleculares, ayudaría a orientar el diagnóstico, proporcionando información confiable y al alcance de los médicos tratantes.

Además, dicha información ayudaría a los laboratorios especializados en identificación genotípica de los mecanismos de resistencia a llevar un reporte estadístico de los casos que se presentan tanto en una determinada población como en diferentes regiones del país, tomando en cuenta que dichos laboratorios tienen sus propios criterios para decidir si un aislamiento califica para ser incluido o no en los estudios epidemiológicos.

Al determinar epidemiológicamente el origen de los casos de resistencia a los tratamientos intrahospitalarios a causa de la *Pseudomonas aeruginosa*, disminuirían los costos nosocomiales por hospitalización y compra de antimicrobianos de presupuesto elevado tanto para los pacientes como para el centro médico.

Y por último, dar prioridad e importancia a los estudios moleculares cada vez que se manifieste un nuevo brote de bacterias patógenas multidrogo resistentes.



## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 – Bases Teóricas

##### 2.1.1 – *Pseudomonas aeruginosa*:

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, no fermentador, que se comporta básicamente como un patógeno nosocomial oportunista. Sus mínimos requerimientos nutricionales, su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas y su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos, explican su papel ecológico como un importante y eficaz patógeno intrahospitalario. Aunque se ha detectado como parte de la flora normal corporal, rara vez causa enfermedad en individuos sanos. (5)

*P. aeruginosa* fue aislada en cultivo puro de heridas cutáneas por primera vez en 1882 por Gessard. Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de los pigmentos piocianina, de color azul, y pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración. Esta bacteria es un bacilo muy versátil, es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42 °C. (6)

Es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. (6)

Es un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales. Particularmente los pacientes con inmunosupresión, así

como aquellos que han sufrido quemaduras severas, neutropenia inducida por quimioterapia o presentan enfermedades pulmonares subyacentes están propensos a desarrollar la infección. (6)

Por ejemplo, esta bacteria coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio de los pacientes con fibrosis quística y a medida que progresa la infección se seleccionan derivados mucoides de esta bacteria. (7)

Una vez que se establece la infección por cepas mucoides de *P. aeruginosa* en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, estos están en la etapa final de la enfermedad, debido a que estas cepas no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y hasta el momento no existe un tratamiento efectivo contra cepas mucoides. (7)

*P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí, debido a la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos. Además, posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones (6).

Presenta una alta tasa de resistencia a ciprofloxacina y a gentamicina. El pronóstico es variable, peor en las infecciones sistémicas con bacteriemia. (8).

En la mayoría de los casos, la infección comienza con alguna alteración de los mecanismos de defensa del huésped; esto puede involucrar la disrupción en la integridad de barreras físicas como catéteres urinarios, catéteres intravenosos, quemaduras extensas de piel o tubos endotraqueales que facilitan la colonización bacteriana. (5)

Por otro lado, hay otras situaciones específicas del huésped que comprometen los mecanismos de defensa específicos, tales como la neutropenia, la inmunosupresión iatrogénica o adquirida y las patologías que cursan con deterioro del sistema inmunológico como cáncer, desnutrición y diabetes, que también son factores de riesgo para la infección. (5)

Definitivamente, la estancia hospitalaria prolongada, especialmente en unidades de cuidado intensivo (UCI) y la presión de selección de los antibióticos (AB) son los factores que favorecen la aparición de cepas multidrogo resistentes. Este hecho, convierte a la infección por *P. aeruginosa* en un verdadero problema de salud pública que afecta no sólo el curso de la evolución del paciente sino que aumenta la estancia hospitalaria, el uso de antibióticos y los costos de los servicios de salud. (5)

Hay un limitado número de antibióticos activos contra *P. aeruginosa*. Por tanto, en los patrones de resistencia en cada hospital, la vigilancia estricta se hace necesaria; además de familiarizarse con los mecanismos por los cuales este microorganismo se hace resistente. De esta manera a partir del antibiograma se puede inferir cuales son los mecanismos que median la resistencia en cualquier aislamiento (5).

### **2.1.2 – Fenotipo**

Manifestación aparente del patrimonio hereditario del individuo más o menos modificado por el medio ambiente.

El fenotipo es la suma de rasgos observables en un organismo, rasgos que nos hacen identificarlo como perteneciente a una determinada especie. Es también definida

como la expresión visible del genotipo invisible para nuestros ojos. También será expresión en buena medida del ambiente al que el organismo se ve expuesto.

### **2.1.3 – Genotipo**

Se denomina genotipo a toda la información de características genéticas que tiene todo organismo viviente, como el ser humano, los animales, vegetales, y demás. Esta información genética se encuentra en forma de ADN, que es el ácido desoxirribonucleico, que es precisamente el ácido que contiene los datos e instrucciones genéticas que intervienen en el desarrollo de un ser y en su funcionamiento.

A toda esa totalidad o conjunto de informaciones genéticas se lo denomina con el término genoma, el cual puede sufrir variaciones en sus genes entre individuos de su misma especie.

### **2.1.4 –Resistencia Bacteriana:**

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico, generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico (9).

La emergencia de la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural que resulta de procesos evolutivos dados por la interacción de factores biológicos y epidemiológicos. Entre los factores biológicos se encuentran: Resistencia innata, mutaciones espontaneas, reservorio de genes de resistencia a través de información genética. (10)

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico; Inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y cambios en su barreras de permeabilidad. Hay que considerar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente. (10)

Algunos factores ocasionan la aparición de la resistencia antimicrobiana:

- La presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos o animales.
- La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad.
- En el ámbito hospitalario ocurre principalmente por transmisión persona a persona, cuando el personal en contacto con los pacientes no aplica las normas básicas de bioseguridad y control de infecciones intrahospitalarias.

### **2.1.5 – Mecanismos de Resistencia Bacteriana**

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes gramnegativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. (11)

Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la meticilina. Esta resistencia adquirida es la que estudiamos en el laboratorio e informamos al clínico. La resistencia adquirida es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección. (11)

Los mecanismos que desarrollan las bacterias para resistir o inhibir el efecto de un antibiótico son variados, de entre los cuales se pueden determinar 4 principales. No solo por ser los más problemáticos para los médicos que tratan a los pacientes en UCI, sino también por ser los más comunes y observados entre las principales bacterias patógenas.

#### **2.1.5.1 Enzimas Hidrolíticas:**

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que pierda su funcionalidad. (12)

Sabemos que los antibióticos B-lactámicos como penicilina, oxacilina, cefalosporinas, actúan inhibiendo la enzima D-alanil D-alanincarboxipeptidasa (PBPS) encargada de la síntesis de la pared. (12)

En este caso, la producción de enzimas tipo  $\beta$ -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia empleado. Estas enzimas periplásmicas hidrolizan los antibióticos betalactámicos y evitan que la droga se pueda unir a su PBP blanco. (12)

**A.- Betalactamasas.-** Son proteínas fijadoras de penicilina que catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico, separando el enlace amida, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular.

En las bacterias Gram Negativas se encuentran en el espacio periplásmico entre la pared celular y la membrana externa, y en las Gram Positivas que carecen de pared son excretadas, aunque todas las Betalactamasas catalizan la misma reacción, se han aislado y caracterizado numerosos tipos de enzimas que se clasifican de forma diversa de acuerdo, por ejemplo, a su secuencia de aminoácidos, peso molecular o especificidad del sustrato. (10)

Las Betalactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo. Se trata de un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia frecuentemente producidas por bacterias Gram negativas, para las cuales se han elaborado múltiples clasificaciones, siendo la más aceptada la de Bush. Pueden clasificarse de acuerdo con su forma de producción en cuatro grupos: (13)

- Por localización genética (cromosomas o plásmidos).
- Por exposición genética (constitutiva o inducida).
- Por producción primaria (dependiente de microorganismo).
- Por sustrato mayor (depende de la clase de antibiótico).

En el año 2010 se postula una clasificación funcional actualizada, basada en características específicas de cada enzima. En el caso de los carbapenémicos las dos

$\beta$ -lactamasas que con mayor frecuencia se asocian a resistencia son las AmpC y las carbapenemasas. (12)

**Betalactamasas tipo AmpC.-** Las Betalactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby Medeiros) se caracterizan por su espectro de hidrólisis (actividad cefalosporinasa) y por su perfil de inhibición. (14)

También conocidas como cefalosporinasas, están involucradas en la resistencia a las cefalosporinas más que a las bencilpenicilinas y cefemicidas. (12)

Las AmpC hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefoxitina y cefotetán) y, en menor medida, las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y los carbapenémicos (imipenem y meropenem). (14)

No se inhiben ante la presencia del ácido clavulánico, tazobactam ni EDTA. Se encuentran codificadas en el gen AmpC que puede estar presente tanto en el cromosoma como en plásmidos. (12)

Con respecto a los carbapenémicos, AmpC presenta baja afinidad, sin embargo, cuando hay sobreproducción de la enzima asociada con alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa, como puede ser pérdida de porinas o expresión aumentada de bombas de eflujo, es suficiente como para producir fenotipos de resistencia. (10)

**Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)** Se derivan de las Betalactamasas clásicas por sustitución de uno o más aminoácidos. Los organismos productores de BLEE tienen resistencia a antibióticos que incluyen cefalosporinas de



tercera generación, penicilinas de espectro extendido y monobactámicos. Son inhibidas por el Ácido Clavulánico (10)

**B.- Carbapenemasas.-** Representan la familia más versátil de las  $\beta$ -lactamasas. Tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros  $\beta$ -lactámicos. Además presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas disponibles. (12)

Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles. Se ha propuesto una clasificación en dos grupos: serin carbapenemasas que pertenecen a la clase molecular A o D de Ambler y metalobetalactamasas (MBLs) que corresponden a la clase B de Ambler, denominadas así por la dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento. (12)

Estos grupos difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores. (12)

**Carbapenemasas Clase A.-** Betalactamasas que poseen serina en su sitio activo y son inhibidas por el ácido clavulánico, en este grupo destacan las BLEE SME-1 a -2, NMC-A, IMI-1 a -2, KPC-1 a -3 y GES-2 a -4. (10)

Existen al menos tres variantes (SME-1, -2 y -3) que confieren un fenotipo con pérdida marcada de sensibilidad a los carbapenémicos y un perfil hidrolítico que incluye el aztreonam y en menor medida o inexistente a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. (14)

No son inhibidas por el EDTA pero como peculiaridad destaca la inhibición parcial por ácido clavulánico (mejor con tazobactam). Otras enzimas relacionadas son las de los

grupos IMI (IMI-1 y -2) y NMC-A encontradas inicialmente en diferentes especies del género *Enterobacter*. (14)

No obstante, dentro de las carbapenemasas de clase A, las que mayor importancia epidemiológica tienen son las denominadas KPC que reciben este nombre por haberse encontrado inicialmente en *K. pneumoniae* (KPC = *K. pneumoniae* carbapenemasas). (14)

Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas KPC hidrolizan de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Como excepción tendrían una menor tasa de hidrólisis de las cefamicinas (cefotina) aunque los valores de CMI que se obtienen suelen estar por encima del punto de corte de sensibilidad. No se inhiben por el ácido clavulánico pero sí por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para el reconocimiento fenotípico. (14)

No obstante, la inhibición por el ácido borónico no es exclusiva de las enzimas KPC ya que también es un inhibidor eficiente de las betalactamasas de tipo AmpC (Clase C de Ambler y grupo 1 de Bush y Jacoby) y que con la excepción del enzima CMY-10 no hidrolizan carbapenémicos. (14)

**Carbapenemasas Clase B (Metallo Betalactamasas).**- Incluyen Betalactamasas dependientes de Zinc, se denominan Metallo- $\beta$ -Lactamasas (MBLs), son resistentes a los inhibidores clásicos de Betalactamasas, pero son sensibles al EDTA. (10)

#### **2.1.5.2 Modificación del Sitio Activo**

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por

las bacterias Gram Positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos Beta Lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de Penicilinas. (11)

### **2.1.5.3 Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano**

Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico. (15)

Una de sus principales funciones es facilitar el transporte de pequeñas moléculas hidrofílicas tales como mono y disacáridos, nucleósidos y aminoácidos desde el medio externo al espacio periplásmico. (12)

Los carbapenémicos utilizan esta estructura para llegar a su sitio blanco. Sin embargo, ante la presión de selección que ejercen, emergen cepas de bacterias mutantes deficientes en porinas, ya sea porque transportan mutaciones que generan porinas alteradas no funcionales o una expresión disminuida de éstas. (12)

De esta manera, la cantidad de carbapenémicos que llega al espacio periplásmico disminuye considerablemente y por lo tanto se generan cepas con fenotipos de resistencia. (12)

#### **2.1.5.4 Bombas de Eflujo.**

Se denomina bombas de eflujo a una serie de transportadores que son capaces de expulsar, de manera relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados estructuralmente. Las bombas de eflujo corresponden a una clase de transportadores involucrados en la captación de nutrientes esenciales e iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente. (16)

También son capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, tales como metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos. (12)

Para su funcionamiento utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato de energía. Su expresión puede ser permanente o inducida. (12)

Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram Negativas. (15)

Este mecanismo de resistencia asociado a carbapenémicos se ha descrito en *P. aeruginosa*. (12)

#### **2.1.6 Elementos de Diseminación Genética**

Las bacterias tienen la capacidad de adquirir material genético externo mediante los mecanismos de transducción, conjugación y transformación. Dentro de este material

genético se incluyen los determinantes de resistencia a los antibióticos, entre los cuales destacan los plásmidos e integrones, debido a su importancia en la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos. (17)

### **2.1.6.1 Plásmidos**

Los plásmidos son moléculas de DNA extra cromosómico, normalmente circulares con la capacidad de autor replicarse y distribuirse entre las células hijas durante la división celular. Algunos plásmidos portan genes que les permiten movilizarse de una bacteria a otra mediante mecanismos de conjugación, llamados auto-transmisibles o conjugativos. Otros plásmidos suelen perder estos genes, por lo que necesitan la presencia y los mecanismos de plásmidos conjugativos para poder movilizarse y diseminarse. (17)

Los genes que portan los plásmidos abarcan numerosas funciones, que aunque no son esenciales para la supervivencia de la bacteria que los porta, les confiere ventajas selectivas. Estos genes abarcan desde los mecanismos de su propia diseminación, como es el caso de los plásmidos conjugativos, hasta los genes de resistencia a los antibióticos, pasando por genes que codifican factores de virulencia o que les permitan una mejor adaptación a un medio en concreto. (17)

Prácticamente, todos los plásmidos portan una región conservada, denominada “plasmid backbone” que les permite su replicación, su estabilidad, su mantenimiento, su movilidad y su adaptación. El módulo de adaptación contiene los genes adicionales de resistencia a antibióticos o virulencia, pero además se pueden integrar elementos

genéticos móviles como secuencias de inserción o transposones que movilizan genes de resistencia a los antibióticos. (17)

Dentro de estos elementos móviles portados por los plásmidos podemos encontrar genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim, macrólidos o quinolonas, por lo que la diseminación de plásmidos portadores de estos genes entre las bacterias, ya sean del ámbito clínico como de la microbiota humana, es de gran relevancia en el problema de la resistencia a los antibióticos. (17)

Los plásmidos que confieren fenotipos de multirresistencia a las bacterias que los portan son normalmente de gran tamaño (50 kb), conjugativos y poseen sofisticados mecanismos para controlar el número de copias plasmídicas, regulando así el ratio de replicación. (17)

#### **2.1.6.2 Integrones**

Otro de los elementos altamente involucrados en la resistencia bacteriana a los antibióticos son los integrones. (17)

Se caracterizan por ser capaces de captar, ordenar y expresar genes, denominados “casetes genéticos”, que codifican determinantes de resistencia a antibióticos u otras funciones. El mecanismo de captación de los mismos consiste en un sistema de recombinación sitio – específico. (17)

Los integrones son elementos genéticos movilizables que están físicamente relacionados con elementos genéticos móviles como secuencias de inserción, transposones o plásmidos conjugativos, los cuales sirven como vehículo de transmisión

horizontal de los integrones inter- e intra-especie. Los que participan en la diseminación de genes de resistencia se clasifican en base a la homóloga de sus integrasas. Las tres clases más importantes de integrones implicadas en mecanismos de multirresistencia son las clases 1, 2 y 3, siendo la 1 y 2 las más prevalentes. (17)

La diseminación de genes de resistencia a los antibióticos supone un problema actual que puede ocasionar grandes pérdidas, tanto económicas como personales, si no se toman las medidas adecuadas inmediatamente. (17)

## **2.1.7 Genotipo de los Mecanismos de Resistencia**

### **2.1.7.1 Genotipo IMP**

Las IMP (IMP- 1) se detectaron por vez primera en 1991 en Japón, en *S. marcescens*. Hasta hoy se han descrito variantes aminoacídicas hasta la IMP-26 (recogidas en la web de nomenclatura de Betalactamasas [www.lahey.org/Studies](http://www.lahey.org/Studies), actualizada en octubre de 2009), en distintos microorganismos, y prácticamente en todo el mundo, aunque con una mayor predominancia por la región del sudeste asiático - Pacífico. (18)

A excepción de IMP-3, -5, -17, -23 y -24, el resto se han detectado en *Pseudomonas*. Destaca, por su rareza, el hallazgo de IMP-8 sólo en *P. mendocina*, así como la presencia de IMP-1 en *P. putida* y *P. fluorescens* (además de en *P. aeruginosa*), IMP-12 sólo en *P. putida*, IMP-19 en *P. putida* (además de en *P. aeruginosa*) e IMP-22 en *P. fluorescens* (además de en *P. aeruginosa*). El resto se han detectado sólo en la especie *P. aeruginosa*. (18)

Las IMP más próximas entre sí se engloban en el cluster de IMP-1, que incluye a las IMP-3, -4, -6 y -10. A partir de aquí, sin la formación de clusters claros, las IMP se van distanciando de este primer grupo, hasta llegar a IMP-12, la variante más distante de IMP-1. Los genes de las IMP se hallan en forma de casetes en integrones plasmídicos, principalmente de clase 1, aunque también se han detectado en clase 3. (18)

Se ha demostrado que la enzima IMP-1 está codificada tanto por plásmidos como por integrones, y se cree que estos elementos genéticos altamente móviles son responsables de la rápida propagación de IMP-1 en aislados clínicos de Japón. Datos recientes sobre la epidemiología de la IMP-1 en Japón sugieren que esta Metallo-Betalactamasa probablemente será la más significativa desde el punto de vista clínico de todas las Metallo-Betalactamasas actualmente conocidas. (19)

La estructura muestra que tres interacciones críticas proporcionan inhibición selectiva contra Metallo-Betalactamasas: uniéndose a una bolsa hidrofóbica, interacciones con una lisina conservada, y las interacciones de iones metálicos. (19)

#### **2.1.7.2 Genotipo VIM**

Se detectaron por vez primera en *P. aeruginosa* en Verona, en 1997, de ahí sus siglas: Veronese IMipenemase. (18) Las enzimas tipo VIM son las detectadas de forma más habitual en Europa, en donde la VIM-2 se ha convertido en predominante. De hecho, puede decirse que VIM-2 es, probablemente, la carbapenemasa más común en todo el mundo. De todas las variantes (Hasta 23) recogidas en [www.lahey.org/Studies](http://www.lahey.org/Studies), las VIM-1, -2, -4 y -6 se han detectado en *P. aeruginosa* y *P. putida*. (18)



VIM-2 fue detectada, además, en otra especie ambiental: *P. pseudoalcaligenes*. Del resto de VIM, todas han sido detectadas en *P. aeruginosa*, además de ciertas variantes en otras especies no pseudomonadales, con las excepciones de: VIM-12, un híbrido entre VIM-1 y VIM-2, y que sólo se ha detectado en enterobacterias; VIM-19, sólo hallada en *K. pneumoniae*, y VIM-23, sólo en *E. cloacae*. (18)

En cuanto a la organización dentro del grupo de las VIM, el árbol filogenético parece tener tres clusters bien diferenciados. El de VIM-7 (única representante) está claramente separado de los dos otros: VIM-1 (que contiene a VIM-4, y VIM-13, entre otras) y VIM-2 (que contiene a la mayoría de variantes del grupo). Si bien se han hallado casos de codificación cromosómica de los genes de VIM, lo más habitual es la presencia de estos genes en forma de casetes en integrones de clase 1. (18)

Respecto al espectro de hidrólisis, VIM-1 parece hidrolizar mejor a prácticamente todos los betalactámicos (sobre todo, a ciertas cefalosporinas) que VIM-2, lo cual parece explicarse por cambios de aminoácidos cercanos o en el propio centro activo de la enzima. Las IMP, en general, parecen tener una menor eficiencia en la hidrólisis que las VIM. (18)

### **2.1.7.3 Genotipo NDM**

NDM significa; Nueva Delhi Metalo Betalactamasa, y en realidad se refiere no a una sola especie bacteriana sino a un elemento genético transmisible que codifica múltiples genes de resistencia que inicialmente se aisló de una cepa de *Klebsiella* obtenida de un paciente que adquirió el organismo en Nueva Delhi, India. (20)

El examen molecular del aislamiento reveló que contenía una nueva metalobetalactamasa que hidrolizaba fácilmente penicilinas, cefalosporinas y carbapenemasas (con excepción de aztreonam). El gen que codifica esta nueva betalactamasa (que no se conocía previamente) se encontró en un gran elemento genético que confiere resistencia de 180 kb que se transfirió fácilmente a otras *Enterobacteriaceae* y que contenía una variedad de otros determinantes de resistencia, incluyendo un gen que codifica otra betalactamasa de amplio espectro (CMY-4) y genes que inactivan eritromicina, ciprofloxacina, rifampicina y cloranfenicol. Además, el anticuerpo genético codificaba una bomba de eflujo capaz de causar resistencia antimicrobiana adicional y promotores del crecimiento que aseguraban la transcripción de los genes contenidos en el elemento genético. (20)

Posteriormente, este elemento genético se ha encontrado ampliamente en la India, Paquistán y Bangladesh, organismos de la familia *Enterobacteriaceae* que contienen este elemento genético (o variantes de los mismos), y ahora están apareciendo en Gran Bretaña y en orden rápido en muchos otros países alrededor del mundo. (20)

La propagación de estos organismos ha generado preocupación generalizada porque algunos de ellos son resistentes a todos los agentes antimicrobianos excepto las polimixinas. (20)

## 2.1.8 Categorías de Resistencia Adquirida

### 2.1.8.1 Multi Drogorresistente (MDR)

En términos literales, MRD significa “Resistente a más de un agente antimicrobiano”, pero ninguna definición para MDR se había definido aún por la comunidad médica. Muchas definiciones han sido usadas con el fin de caracterizar patrones de multidrogorresistencia en organismos Gram Positivos y Gram Negativos. La ausencia de definiciones específicas para MDR en protocolos de estudio clínico da lugar a datos que son difíciles de comparar. (21)

Uno de los métodos utilizados por varios autores y autoridades para caracterizar organismos como MDR está basado en resultados de pruebas in-vitro de susceptibilidad antimicrobiana, cuando ellos prueban “resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, clases o subclases de agentes antimicrobianos”. (21)

La definición más frecuentemente usada para bacterias Gram Positivas y Gram Negativas es “resistente a tres o más clases de antibióticos”. Una revisión de la variabilidad de esas definiciones está provista por una comprensiva revisión de MDR en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* por Flagas y colaboradores, donde los autores observaron que un considerable número de estudios no proponen ninguna definición específica para MDR, pero la mayoría define MDR como “Resistente a tres o más clases de antibióticos”. (21)

Otro método usado para caracterizar bacterias como MDR, es cuando ellas son “Resistentes a un agente antimicrobiano clave”. Estos aislados bacterianos podrían tener importancia de salud pública debido a la resistencia a solo un agente antimicrobiano

clave, pero ellos generalmente demuestran resistencia cruzada o co-resistencia a múltiples clases de antimicrobianos, lo cual los hace MDR. (21)

Creando un acrónimo para una bacteria basados en su resistencia a un agente antimicrobiano clave (e.g. resistencia a la meticilina en *S. aureus*, i.e. MRSA) destaca su importancia epidemiológica; La ventaja de utilizar este enfoque para fines de vigilancia es que puede aplicarse fácilmente. (21)

### **2.1.8.2 Extensamente Drogorresistente (XDR)**

Bacterias que son clasificadas como XDR son epidemiológicamente significativa debido a no solo su resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, sino también a su ominosa probabilidad de ser resistente a todos o casi todos los agentes antimicrobianos aprobados. (21)

En la literatura médica, XDR se ha utilizado como acrónimo para varios términos diferentes tales como “Resistencia Extrema de la Droga”, “Resistencia Farmacológica Extensa”, “Extremadamente Resistentes a Fármacos” y “Extensamente Resistente a Fármacos”. (21)

Inicialmente, el término XDR se creó para describir extensamente a *Mycobacterium tuberculosis* resistente a los fármacos (XDR MTB) y se definió como "resistencia a los agentes de primera línea (isoniazida y rifampicina), a una fluoroquinolona y a al menos uno de medicamentos parenterales de tercera línea (es decir, amikacina, kanamicina o capreomicina). (21)

Posteriormente, se construyeron definiciones para cepas de bacterias no mico bacterianas que eran XDR de acuerdo con el principio subyacente a esta definición para

XDR MTB (es decir, describiendo un perfil de resistencia que comprometió la mayoría de los regímenes antimicrobianos estándar). (21)

Dos grupos de criterios se han utilizado principalmente para caracterizar las bacterias como XDR. La primera se basa en el número de antimicrobianos o clases o subclases a las que una bacteria es resistente, y la segunda en si son "resistentes a uno o más agentes antimicrobianos clave". (21)

### **2.1.8.3 Pan Drogorresistente (PDR)**

Del prefijo griego 'pan', que significa 'todo', resistente a los pandrugos (PDR) significa 'resistente a todos los agentes antimicrobianos'. Las definiciones en la literatura para PDR varían aunque este término es etimológicamente exacto y significa que, para que una especie particular y un aislado bacteriano de esta especie se caractericen como PDR, debe ser probado y encontrado ser resistente a todas las especies aprobadas y agentes útiles. (21)

Los ejemplos de definiciones actuales son: "resistentes a casi todos los antimicrobianos disponibles en el comercio", "resistentes a todos los antimicrobianos sometidos a pruebas rutinarias" y "resistentes a todas las clases de antibióticos disponibles para el tratamiento empírico", por lo que la definición de PDR esté sujeta a un uso incoherente y susceptible de una posible interpretación errónea de los datos. (21)

## 2.2 – Antecedentes

### 2.2.1 Antecedentes Internacionales

**Perozo Mena, Armindo**, en su publicación; **Detección fenotípica de Metalo Betalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***, explica que en su estudio intentó determinar la producción de Metalo Betalactamasas (MBL) en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando para ello dos métodos fenotípicos. Se utilizó el método del doble disco (MDD) y el test de Hodge modificado (MHT). (22)

Se analizaron 726 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, el 20,11% (146) de estos fueron resistentes a imipenem (IPM) y meropenem (MEM), por lo que se les realizaron los dos métodos fenotípicos, de los 146 aislados resistentes a carbapenémicos, 139 fueron positivas para el MDD, mientras que 144 lo fueron para el MHT, estos dos métodos permitieron confirmar la presencia de una carbapenemasa tipo MBL en el 98,63% de los aislados de *P. aeruginosa*, por otra parte, cinco aislados no fueron positivos para el MDD pero si para el MHT, lo que indicaría la presencia de carbapenemasas no MBL en estos aislado, también se obtienen 2 aislados que a pesar de ser IPM y MEM resistentes fueron negativos por los dos métodos fenotípicos utilizados, indicando la presencia de un mecanismo de resistencia no enzimático que confiere resistencia a carbapenémicos. (22)

Llegó a la conclusión de que la utilización de métodos fenotípicos para la detección de MBL en aislados de *P. aeruginosa* es una opción bastante aceptable para utilizar en laboratorios de rutina donde pruebas especializadas de biología molecular no están disponibles. (22)

**Dianny Del Valle Martínez Rojas**, en el artículo de revisión; **Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica**, describe que las AmpC son serin-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, presentes de forma natural en diversas enterobacterias y en bacilos gramnegativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Estas enzimas son capaces de resistir la inhibición por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. (23)

También explica que aunque para la detección de AmpC no existen métodos estandarizados por el CLSI, se han diseñado diversas técnicas con elevada sensibilidad y especificidad. Las betalactamasas AmpC están asociadas a elevada mortalidad y, a nivel de laboratorio, con falsos reportes de susceptibilidad antimicrobiana. Por lo tanto, es de vital importancia su investigación de rutina en los laboratorios de microbiología. (23)

**Gisela Santella**, en su artículo “**Resistencia a Carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos**” explica que su objetivo fue identificar la proteína de membrana externa ausente en los aislamientos resistentes y determinar tanto las causas de su ausencia en la membrana, como la presencia de otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. (24)

Para ello, se estudió un brote de 20 aislamientos de *P. aeruginosa* previamente caracterizados como productores de la metalobetalactamasa IMP-13. Estos aislamientos presentaron igual expresión de la enzima IMP-13, pero solo cinco de ellos fueron resistentes a carbapenémicos. En esos cinco aislamientos resistentes se confirmó la

ausencia de una proteína de membrana externa. Se secuenciaron OprD y AmpC; se identificaron las proteínas de membrana externa por desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masa tiempo de vuelo (MALDI-TOF); se determinó el nivel de expresión de OprD, de AmpC y de los sistemas de eflujo tipo Mex, por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real, y por último, se determinó la contribución del déficit de OprD a la resistencia a carbapenémicos. (24)

Encontraron que la proteína de la membrana externa ausente en el grupo R (resistentes a ambos carbapenémicos) fue identificada como OprD-TS, pero no se observaron variaciones en su expresión. El gen oprD presentó mutaciones en los cinco aislamientos resistentes. Observaron la misma producción de la enzima tipo AmpC PDC-5 y del sistema de eflujo Mex AB-OprM entre los aislamientos sensibles y resistentes a carbapenémicos. Analizaron cómo la presencia conjunta de IMP-13 y el déficit de OprD contribuyen al aumento de la resistencia. (24)

Llegaron a la conclusión de que distintos mecanismos contribuyen a la resistencia de aislamientos productores de IMP-13 a carbapenémicos, y la posibilidad de no detectar estos aislamientos productores de IMP-13 representa un riesgo latente de selección de mutantes con mecanismos de resistencia que se suman para aumentar la resistencia a carbapenémicos. (24)

**Virginia de la Lastra**, en su artículo “**Detección de serinocarbapenemasas de clase A y otros mecanismos de resistencia enzimática a  $\beta$ -lactámicos en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, aisladas de pacientes de un hospital universitario de Santiago, Chile**”, Describe que la emergencia por la resistencia mediada por Carbapenemasas en las *Enterobacteriaceae*



tienen un fuerte impacto clínico y que por lo tanto realizaron un estudio dirigido a a caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a los Beta lactámicos en aislados clínicos de entero bacterias con susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos en la Universidad Médica de Santiago. (25)

Entre Abril y Setiembre del año 2010 en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, 23 aislamientos de entero bacterias no susceptibles a carbapenémicos fueron recolectadas. Se usó PCR para la detección de Carbapenemasas de clase A (SME, IMI, NMC, GES y KPC) y el test de Hodge Modificado con la prueba de ácido borónico para evaluar fenotípicamente la presencia de serin-carbapenemasas. Para evaluar las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE's) las pruebas del CLSI fueron realizadas. Las Metallo-Beta-Lactamasas (MBL) y las AmpC fueron evaluadas con discos comerciales. (25)

Determinaron que 18 de 23 cepas eran de *Klebsiella pneumoniae* y 5 de 23 especies eran de *E. cloacae*. Todas las PCR para Carbapenemasas de clase A fueron negativos. 3 de 23 especies (todas *E. cloacae*), fueron positivos para el test de Hodge Modificado, y 1 de 23, una *K. pneumoneae*, fue positiva para la prueba de Ácido Borónico. Las BLEE's fueron detectadas en 14 de 23 de las especies y de AmpC en 5 de 23. No se detectaron MBL. (25)

Llegaron a la conclusión de que ninguna serin-carbapenemasas de clase A fueron detectadas. La susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos esta probablemente explicada por la actividad de las Beta-Lactamasas debido a la pérdida de porinas. (25)

**Clotilde Ophelie Marie Molin Queste**, en su artículo “**Detección Fenotípica de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013**”, dice que la especie *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más importantes, causante de infecciones, con alto índice de morbi-mortalidad. (26)

Los carbapenémicos son antibióticos que poseen un amplio espectro de actividad y son altamente potentes, que los vuelven imprescindibles en el tratamiento empírico. *P. aeruginosa* presenta diversos mecanismos de resistencia, entre ellos las carbapenemasas tipo Metallo- $\beta$ -lactamasas (MBLs). (26)

Debido al aumento de las bacterias productoras de MBLs, es importante la aplicación de test simples, prácticos y de bajo costo, como pruebas de rutina, para la identificación de las bacterias productoras de MBLs de forma rápida. El objetivo de este trabajo fue determinar fenotípicamente la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *P. aeruginosa*. Estudio descriptivo de corte transversal que incluyó aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas – San Lorenzo entre febrero a julio de 2013. Se estudiaron 232 aislamientos de *P. aeruginosa*, a aquellos con sospecha de carbapenemasas se les aplicó dos métodos de detección fenotípica, discos de EDTA y discos con ácido dipicolínico – Meropenem (DPA-ME). De estos aislamientos, 30 dieron sinergia con la técnica de EDTA y 18 aislamientos positivos con los discos de DPA. (26)

A través de los métodos fenotípicos aplicados se pudo comprobar la presencia de cepas productoras de carbapenemasas tipo MBL en una frecuencia de 7,8%. Los tests de combinación de disco podrían ser útiles en la práctica diaria para proporcionar una

detección rápida y fiable de MBL carbapenemasas en los aislados de *P. aeruginosa* cuando las pruebas moleculares no están disponibles. (26)

**Machado Martínez María Fernanda**, en su tesis “**Efectividad del Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) y del Mercaptoacético de sodio (SMA) en la detección de Metalo  $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa***”, explica que su investigación tuvo como objetivo determinar la efectividad del EDTA y del SMA (750  $\mu$ g y 2  $\mu$ g) o la mezcla de ambos, en la detección de MBLs en 25 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes hospitales y centros de investigación, empleando métodos fenotípicos como la sinergia de doble disco y el método de discos combinados. (27)

En el primero, utilizaron discos en blanco con la mezcla de EDTA/SMA y discos de Imipenem (IMP) y Meropenem (MEM), y en el segundo, evaluó el efecto de los antibióticos solos y combinados con las soluciones de EDTA SMA o ambas. (27)

El primer método permitió diferenciar cepas productoras de las no productoras de MBLs, y el segundo evidenció la efectividad del EDTA, estableciendo como punto de corte una diferencia de halo de  $\geq 5$  mm entre los antibióticos solos y combinados con el agente quelante, lo que no se logró con el SMA, donde el punto de corte encontrado fue  $\geq 2$  mm, lo que lo hace difícil de poner en práctica, demostrando que, en el caso de *P. aeruginosa*, el EDTA es el agente quelante más efectivo al realizar esta prueba. (27)

### **2.2.2 Antecedentes Nacionales**

**José Enrique Oliva Menacho**, en su artículo; “**Contaminación con bacterias patógenas de estetoscopios del personal médico en un hospital de nivel III en Lima, Perú**” realizaron un estudio para determinar el grado de contaminación bacteriana con

bacterias patógenas de los estetoscopios del personal médico en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza, entre los meses de enero y junio del 2013. (28)

Se estudiaron 124 muestras de estetoscopios del personal médico en las siguientes áreas: UCI 20; neonatología 13; quemados 3; medicina 52; emergencia 36. Se recolectaron las muestras con hisopos humedecidos, en condiciones estériles (En presencia de un mechero de vidrio para alcohol) y luego fueron introducidos en tubos con preparado de caldo BHI (Infusión cerebro corazón) para ser incubados por 24 horas a 37°C; se cultivó en Agar sangre, Agar MacConkey, Agar manitol y Agar cetrímide para su posterior determinación de bacterias patógenas por procedimientos bioquímicos, luego se identificó la susceptibilidad bacteriana con la técnica de Kirby- Bauer. (28)

De los 124 estetoscopios estudiados; 114 (91,9%) estuvieron contaminados; se aislaron 123 cepas bacterianas: *Staphylococcus spp* coagulasa negativa 106(86,1%), *Staphylococcus aureus* 5 (4,0%), *Enterobacter aerogenes* 4 (3,2%), *Acinetobacter spp* 2 (1,6%), *Pseudomonas aeruginosa* 4 (3,2%), *Klebsiella pneumoniae* 1 (0,8%) y *Escherichia coli* 1 (0,8%). Llegaron a la conclusión de que el aislamiento de bacterias patógenas sugiere que el estetoscopio debe ser considerado como un vector de la infección nosocomial. (28)

**Claudio Rocha**, en su artículo de revisión; “**Resistencia Emergente a los Antibióticos: una Amenaza Global y un Problema Crítico en el Cuidado de la Salud**” explica que después del desarrollo y la comercialización en masa de los antibióticos, las bacterias patógenas y ambientales han desarrollado resistencia a los antibióticos desde el siglo pasado, de modo que la infección causada por organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) podría ser considerada como una infección emergente. Debido a ello,

su control debe ser priorizado ya que constituye una amenaza para todas las naciones, sin reparar en su territorio y situación económica. (29)

El incremento de la vigilancia en Estados Unidos de América, Europa y Asia Oriental ha ilustrado lo rápido que pueden diseminarse, trayendo como consecuencia un incremento en la carga de infecciones causadas por los ORAs, sin embargo, la información disponible en los países de continuo desarrollo en América Latina es limitada. (29)

**Paul J. Tejada Llacsá**, en su artículo; **“Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional”**, describe las características de las infecciones por bacterias productoras de BLEE en el Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, Callao, Perú. (30)

Para ello, empleó los registros de los cultivos de secreciones realizados en el Laboratorio de Microbiología del HNDAC en el año 2012, analizando los datos del paciente (edad, sexo y servicio del cual se recibió la muestra) y datos de la muestra (fecha de obtención, el tipo de muestra, el microorganismo encontrado, el antibiograma detallado y su calificación como bacteria productora de BLEE), usando como medida de los resultados las características de las infecciones por bacterias productoras de BLEE. (30)

Recolectó 3 149 muestras, 70,9% (2 235) fueron de mujeres; 29,4% fueron cultivos positivos para bacterias productoras de BLEE. Los servicios críticos obtuvieron la mayor prevalencia, y los meses donde se encontró mayor presencia fueron abril (34,7%) y julio (34,7%). Tanto *E. coli* (72,4%) como *Klebsiella sp.* (20%) fueron las

prevalentes. No encontraron resistencia para imipenem, tanto para *E. coli* como para *Klebsiella spp.* Llegaron a la conclusión de que la prevalencia fue similar a la de América Latina (34,6%), presentando más evidencias de una alta presencia en consulta externa y en mayores de 46 años; siendo así un problema de salud pública. (30)

**Edgar Gonzales Escalante**, según su artículo; “**Metalo-β-Lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú**” realizó un estudio transversal en seis hospitales de referencia de Lima (Perú) en agosto de 2011, con el objetivo de detectar y caracterizar molecularmente las Metalo-β-lactamasas (MβL) en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a ceftazidima y con sensibilidad reducida a carbapenémicos. (31)

Realizaron el ensayo fenotípico con el método de aproximación de discos con sustratos (ceftazidima, imipenem y meropenem) y con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Realizaron la detección de genes MβL mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa multiplex. A través del método fenotípico detectaron MβL en el 15,7% de los aislamientos, en todos ellos la detección de genes mostró la presencia del gen *bla<sub>IMP</sub>*. (31)

**Aguilar Gamboa Franklin Rómulo**, en su artículo; “**Frecuencia y Comparación de Tres Métodos de Detección Fenotípica de *Pseudomonas aeruginosa* productora de Metalo Beta Lactamasas aisladas en el Hospital Regional Lambayeque durante el 2014**” estudiaron 92 aislamientos de *P. aeruginosa*, empleando los métodos de Kirby Bauer y semi-automatizado vitek2XL. (32)

Determinaron la producción de MBL por el método de epsilometría (E-test IP/IPI) “método estándar de oro para esta investigación”, comparándolos en términos de sensibilidad y especificidad con los métodos de sinergismo EDTA con doble disco de difusión (DDST) y la prueba de discos combinados (DC). (32)

Obtuvieron 10 (10,9%) aislamientos de *P. aeruginosa* productora de MBL, las cuales fueron determinadas por epsilometría, por ser la prueba fenotípica con mayor sensibilidad y especificidad; las otras DDST y DC detectaron 6(6,52%) y 23(25%) aislamientos positivos respectivamente. No existió buena concordancia entre E-test IP/IPI y DC pero si entre E-test IP/IPI y DDST. El 100% de *P. aeruginosa* productoras de MBL presentaron una marcada multi resistencia y la Unidad de Cuidados Intensivos fue el servicio donde se obtuvo la mayor cantidad de estos aislamientos. (32)

El esquema de tratamiento antibiótico no tuvo relación con la aparición del microorganismo en estudio. Describieron el primer reporte de MBL en *P. aeruginosa* en el Hospital Regional Lambayeque con 10 (10,9%) aislamientos positivos, llegando a la conclusión de que el desarrollo de este mecanismo de resistencia podría tener un grave impacto en el ámbito clínico y epidemiológico. (32)

## CAPITULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Diseño del Estudio

Estudio observacional descriptivo retrospectivo de corte transversal.

#### 3.2 Población

La población de estudio se conformó por todos los aislamientos de *P. aeruginosa* de las muestras clínicas que fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del CEMENA entre los meses de Agosto del 2015 y Enero del 2016, de los pacientes hospitalizados y consulta externa: pacientes ambulatorio y de emergencia.

##### 3.2.1 Criterios de Inclusión

Se incluyó en el estudio aislamientos de especímenes de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes atendidos en el Centro Médico Naval, a los servicios de emergencia, hospitalizados y ambulatorios.

##### 3.2.2 Criterios de Exclusión

Se excluyeron cepas de *P. aeruginosa* cuyos aislamientos fueron reportados como contaminantes o se aislaron junto a especímenes bacterianos contaminantes.

#### 3.3 Muestra

Se recolectaron un total de 45 muestras de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes de los servicios de emergencia, hospitalizados y ambulatorios cuyos antibiogramas demostraron resistencia a la mayoría de los antibióticos.



Se recopilaron resultados de antibiogramas correspondientes a las cepas de *P. aeruginosa* que fueron aisladas.

Se clasificaron los casos de pacientes por edad, género, tipo de muestra y servicio.

### **3.4 Operación de Variables**

**Variable Primaria.-** Mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *P. aeruginosa*.

**Variable Secundaria.-** Caracterización fenotípica y genotípica de los mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Variable	Tipo de Variable	Dimensión	Valores Finales	Fuente de información
Mecanismo de Resistencia	Cualitativo	Halos de Inhibición	Positivo / Negativo	Registros
Caracterización fenotípica de la Resistencia a los antibióticos en especies de <i>P. aeruginosa</i>	Cualitativo	- Beta Lactamasas de Espectro Extendido - Carbapenemasas de Clase A - Metalobetalactamasas	Positivo / Negativo	Resultados de las Técnicas de difusión de Doble Disco
Caracterización genotípica de la Resistencia a los antibióticos en especies de <i>P. aeruginosa</i>	Cualitativo	PCR Genotipo VIM PCR Genotipo IMP PCR Genotipo NDM	Positivo / Negativo	Resultados de Técnicas de PCR
Edad	Numérica continua	Edad	Años	Registros
Sexo	Cualitativa Nominal	Sexo	Masculino / Femenino	Registros
Procedencia	Cualitativa	Procedencia	Servicio Ambulatorio Servicio Hospitalizado Servicio de Emergencia	Registros
Tipo de Muestra	Cualitativa	Tipo de Muestra	Orina Esputo Hemocultivo Secreciones	Registros

### 3.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

Todos los microorganismos de estudio se obtuvieron de las muestras aisladas de pacientes atendidos en el Centro Médico Naval.

Los microorganismos se aislaron en el área de Microbiología del departamento de Anatomía Patológica.

Para la identificación de las especies de interés, se emplearon los métodos bioquímicos manuales y automatizados de identificación bacteriana, así como también se emplearon los métodos de identificación de la sensibilidad a los antibióticos.

Para su conservación hasta llegado el momento del estudio, cada cepa se re cultivó en agar Sangre y conservó en agar TSA a una temperatura de 2°C.

### **3.5.1 Medios de Cultivo:**

**Agar Sangre:** Medio para propósitos generales, para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos. Con la adición de sangre, el medio es útil tanto para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis. También empleado para reanimar cepas conservadas por congelación.

**Agar Trypticase Soya (TSA):** El TSA Agar es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias. Empleado para conservación de cepas por congelación.

**Agar Mueller Hinton:** recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

### 3.5.2 Técnicas Empleadas para la Identificación de *P. aeruginosa*:

**Agar Cetrimida:** se utiliza para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras clínicas.

**Tinción de Gram:** Prueba bioquímica basada en las características de la pared celular de las bacterias. En dicha prueba se pueden diferenciar las bacterias Gram positivas, que retienen el cristal violeta y se observan al microscopio de un color violeta oscuro, de las Gram negativas, que pierden el cristal violeta y por contraste de la safranina presentan un color rosa. Además podemos distinguir las diferentes morfologías (cocos, bacilos, etc.) En este estudio, se buscó identificar a los bacilos Gram Negativos.

**Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI):** Prueba de identificación, con la que se pueden diferenciar géneros bacterianos, basada en la capacidad del microorganismo de fermentar fructosa, lactosa y/o glucosa, y de producir gas y/o sulfuro de hierro. Se realiza en tubos en Slant, sembrando en superficie (zona aerobia) y en profundidad (Zona relativamente anaerobia) y se incuban a 37°C durante 24 horas. Los microorganismos incapaces de fermentar la glucosa o la lactosa no presentan cambio de color en el medio, como es el caso de la *Pseudomonas aeruginosa*.

**Prueba de la Oxidasa:** Prueba de identificación donde se deposita una colonia bacteriana sobre la superficie de la tira comercial impregnada con el reactivo. La reacción se considera positiva cuando transcurridos 10 o 20 segundos vira a un color morado, según las indicaciones del inserto del producto. Las bacterias del género *Pseudomonas* son positivas para esta prueba.

**Prueba de la Catalasa:** Prueba de identificación consistente en añadir una gota de disolución acuosa de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% sobre un frotis bacteriano. La presencia de la enzima catalasa provoca la formación de burbujas en el portaobjetos. Todas las especies de *Pseudomonas* son positivas para esta prueba.

### **3.5.3 Equipos para la identificación de la susceptibilidad a los antibióticos**

Para la identificación de la susceptibilidad a los antibióticos de las especies en estudio, se empleó el equipo automatizado MicroScan Walkaway 96 Plus.

Sus sistemas avanzados de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) detectan la resistencia emergente a medida que ocurre, proporcionando resultados precisos sin depender de datos históricos o MIC virtual.

### **3.5.4 Pruebas de identificación de los Mecanismos de Resistencia:**

#### **3.5.4.1 Test de Difusión de Doble Disco**

La actividad MBL, la producción de BLEE y Carbapenemasas de Clase A se determinó mediante la técnica del Test Sinérgico de Doble Disco.

Para **la detección de MBL** se realizó un antibiograma con una distribución concreta de los discos IMP (10 ug) + un disco de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + MEM (10 ug), y alternativamente un disco de CAZ (30 ug). Se observa el fenotipo MBL cuando se produce una deformación del halo de inhibición de los carbapenémicos y la cefalosporina en las proximidades del disco de EDTA. Este estudio nos da una idea previa de la presencia de algún tipo de MBL en la cepa sobre la cual se realice el procedimiento, y los resultados positivos se deben confirmar por técnicas moleculares.

Para la **detección de BLEE** también se empleó la técnica de doble disco, pero utilizando los siguientes antibióticos: cefepime (30 ug) + Amoxicilina – Ácido clavulánico + ceftazidima (30 ug). El disco central contiene al inhibidor de Betalactamasas (ácido clavulánico) y la deformación del halo de dichos betalactámicos en las proximidades de este disco nos da la idea de la presencia de una posible cepa productora de una BLEE. Como en la prueba anterior, es necesaria una confirmación y determinación del gen por la técnica de PCR y secuenciación.

Por último, para la **detección de carbapenemasas de Clase A** se llevó a cabo del mismo modo que las dos pruebas anteriores, pero con la siguiente distribución de discos: IMP (10 ug) + disco de ácido 3-aminofenilborónico (APB) + MEM (10 ug). El aumento y deformación del halo en las proximidades del disco central nos permitió intuir la presencia de una carbapenemasa de clase A, pero de la misma manera que en los casos anteriores, se necesita la confirmación por técnicas moleculares.

#### **3.5.4.2 Test de Hodge Modificado**

Se llevó a cabo para confirmar que el mecanismo de resistencia de la bacteria a los antimicrobianos del grupo carbapenémicos es debido a la presencia de la enzima carbapenemasa.

Se tomó en consideración que en esta prueba comúnmente se utiliza la cepa control *E. coli* ATCC 25922, sin embargo, para el estudio de especies de *Pseudomonas*, esta cepa control no es viable debido a que tiende a dar resultados falsos negativos al reaccionar con cepas de *P. aeruginosa*. Por lo tanto, la versión modificada del Test de Hodge implicó el uso de una cepa control de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Se realizó una suspensión 0.5 Mac Farland de la cepa control, y se hizo una dilución 1/10 de dicha suspensión en agua destilada o solución salina. Se inoculó con ella una placa de Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones para técnica de difusión en disco.

Se colocó en el centro de la placa un disco de Imipenem (10 ug), y/o alternativamente un disco de Meropenem (10 ug)

Con un asa estéril se tomó de 3 ó 4 colonias de la muestra en estudio y se realizó una estría desde el borde a la placa hacia el centro de los discos de Imipenem y Meropenem sin llegar a tocarlos.

Un resultado positivo se manifiesta por el crecimiento de la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 en la parte de intersección entre el halo de inhibición que genera la difusión del antibiótico y la estría de las cepa que fue objeto de nuestro estudio, formándose así una hendidura en la parte próxima al disco.

Dicha reacción evidencia la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que han sido liberadas al medio permitiendo así el crecimiento de *K. pneumoniae*.

#### **3.5.4.3 Método de Aproximación de Discos**

Es aplicable a betalactamasas AmpC inducibles. La técnica consiste en realizar un antibiograma convencional, para luego colocar un disco de Imipenem o cualquier otro antimicrobiano inductor a una distancia de 27mm centro-centro de un disco de ceftazidima, (antimicrobiano sustrato, revelador o testigo). El microorganismo produce una betalactamasa inducible si se observa un halo de inhibición truncado del antimicrobiano sustrato, testigo o revelador. Se considerara un resultado como positivo

si se manifiesta un achatamiento del halo de inhibición (forma de D) de los betalactámicos inductores débiles (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam) en la zona a próxima al disco con el betalactámico inductor fuerte (cefoxitina, imipenem). (14)

El resultado positivo se informa como cepa portadora de AmpC Inducible. En caso de obtener un resultado positivo nos indica sin duda que se trata de una AmpC y no de una hiper producción de su betalactamasa cromosómica, dado que esta última no es inducible.

#### **3.5.4.4 Técnicas moleculares.**

Los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron enviados al Centro de investigación de enfermedades infecciosas de la embajada de USA (NAMRU-6) para hacer pruebas moleculares que consistieron en detectar los genes IMP, VIM y NDM mediante PCR convencional.

Los resultados, reportados como positivos y negativos, fueron entregados al CEMENA como parte de un acuerdo de colaboración entre ambas instituciones. (Ver Anexo 10).

### **3.6 Plan de Análisis de Datos**

Se determinaron medidas de tendencia central. Se emplearon tablas de frecuencia y de contingencia.



## CAPITULO IV

### PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

#### 4.1 Evaluación de los Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos en Especies de *P. aeruginosa*

Los resultados estadísticos que a continuación se detallan, corresponden a la evaluación del Fenotipo y Genotipo de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras clínicas obtenidas de los pacientes hospitalizados de consulta externa, ambulatorios y de emergencia del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” entre Agosto del 2015 y Enero del 2016.

##### 4.1.1 Características de los Pacientes

##### 4.1.1.1 Edad promedio de los pacientes

Tabla Nº 1: Edad promedio

Características de la edad	
Muestra	45
Edad promedio	58,42
Desviación Estándar	±21,94
Edad Mínima	10
Edad Máxima	91

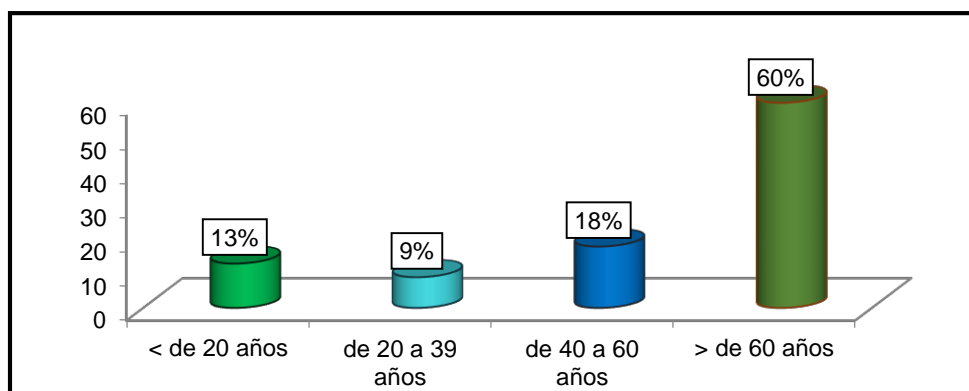
Los 45 pacientes hospitalizados, de consulta externa, ambulatorios y de emergencia del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, de los cuales se obtuvo muestras clínicas para la evaluación del Fenotipo y Genotipo de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *P. aeruginosa*, presentaron

una edad promedio de 58,42 años, una desviación estándar o típica de  $\pm 21,94$  años y un rango de edad que iba desde los 10 hasta los 91 años.

#### 4.1.1.2 Distribución por edades de los pacientes

**Tabla Nº 2:** Grupos etarios de los pacientes

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
> de 20 años	6	13.3	13.3
De 20 a 39 años	4	8.9	22.2
De 40 a 60 años	8	17.8	40.0
> de 60 años	27	60.0	100.0
Total	45	100.0	



**Gráfico N° 1:** Grupos etarios de los pacientes

En la tabla Nº 2 se observa la distribución por edades de los 45 pacientes.

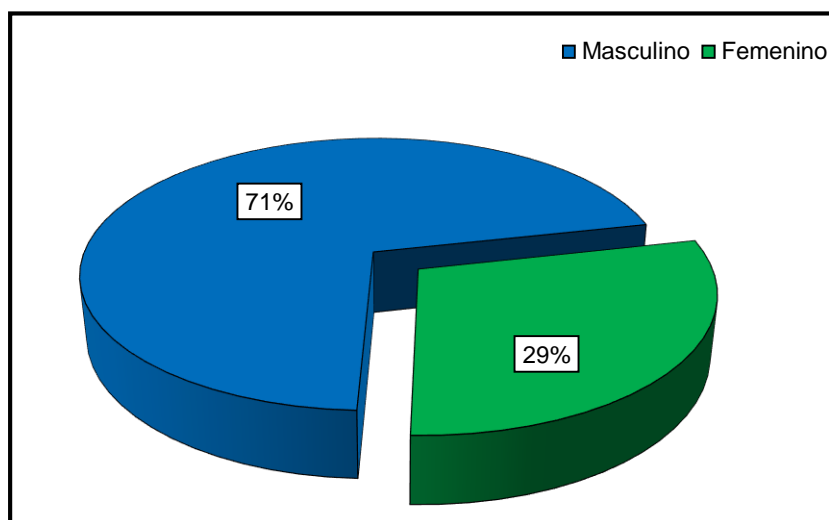
Se encontró que 6 pacientes tenían menos de 20 años de edad; 4 pacientes tenían entre 20 y 39 años de edad; 8 pacientes tenían entre 40 y 60 años de edad y 27 pacientes tenían más de 60 años de edad.

Se observa que la mayor parte de la muestra tenía edades entre 20 y 29 años. Los porcentajes correspondientes se muestran en la figura Nº 1.

### 4.1.1.3 Distribución por sexo de los pacientes

**Tabla N° 3:** Sexo de los pacientes

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Masculino	32	71.1	71.1
Femenino	13	28.9	100.0
Total	45	100.0	



**Gráfico N° 2:** Distribución por sexo de los pacientes

La tabla N° 3 presenta la distribución por sexo de los 45 pacientes de los cuales se obtuvo muestras clínicas para la evaluación del Fenotipo y Genotipo de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *Pseudomonas aeruginosa*, 32 pacientes eran del sexo masculino mientras que 13 pacientes eran del sexo femenino.

Se observa un predominio de pacientes masculinos en el total de casos de los cuales se aisló la *P. aeruginosa*. La figura N° 2 muestra los porcentajes correspondientes.

## 4.1.2. Características de la Muestra

### 4.1.2.1 Servicios de procedencia de la muestra

Tabla Nº 4: Servicios de recolección de las muestras

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Medicina de mujeres	8	17,8	17,8
Medicina de	1	2,2	20,0
UCI-Quirúrgica	3	6,7	26,7
Endocrinología	1	2,2	28,9
Emergencia	4	8,9	37,8
Cirugía de Varones	3	6,7	44,4
Ambulatorio	2	4,4	48,9
Hospitalizado	1	2,2	51,1
Geriatría	4	8,9	60,0
Infectología	2	4,4	64,4
Clínica de Oficiales	1	2,2	66,7
UCI-Médica	2	4,4	71,1
UCI-Pediátrica	1	2,2	73,3
Urología	6	13,3	86,7
Consulta General	1	2,2	88,9
Programa de TBC	1	2,2	91,1
Traumatología	4	8,9	100,0
Total	45	100,0	

La tabla Nº 4 presenta los servicios, del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, de donde fueron recolectadas las muestras clínicas para la evaluación del Fenotipo y Genotipo de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *P. aeruginosa*. La mayor cantidad de muestras procedían de los servicios de medicina de mujeres con el 18%; del servicio de Urología con el 13%; del servicio de Emergencia, Geriatría y del Traumatología con el 9%.

#### 4.1.2.2 Tipo de muestras obtenidas

Tabla Nº 5: Tipo de muestras obtenidas

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Tejido óseo	3	6,7	6,7
Urocultivo	16	35,6	42,3
Hemocultivo	3	6,7	49,0
Catéter	4	8,9	57,9
Herida de pie	1	2,2	60,1
Dedo de pie	1	2,2	62,3
Espujo	3	6,7	69,0
Secreción bronquial	8	17,7	86,7
Secreción nefrótica	2	4,4	91,2
Secreción biliar	1	2,2	93,4
Médula ósea	2	4,4	97,8
Partes blandas de piel	1	2,2	100,0
Total	45	100,0	

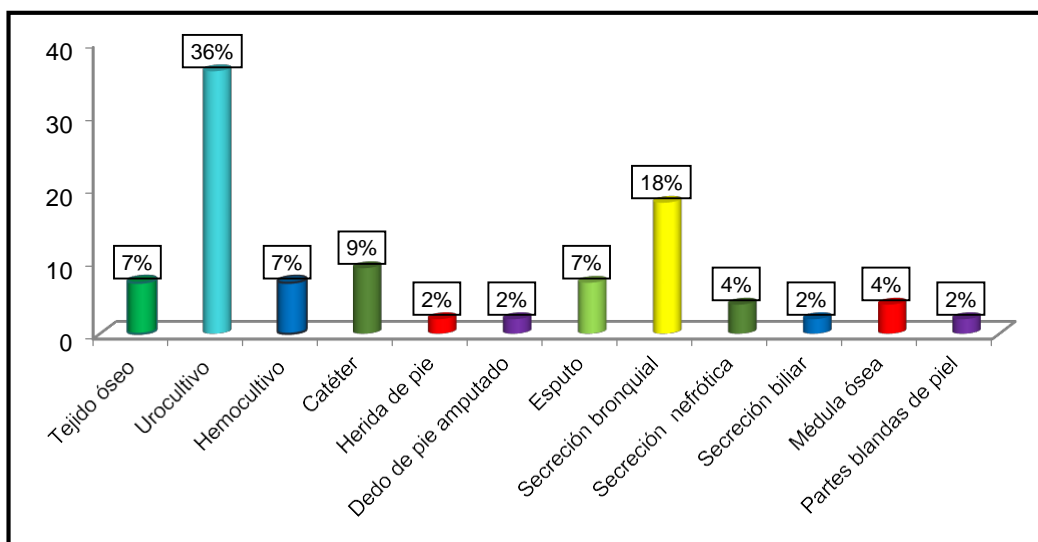


Gráfico Nº 3: Tipo de muestras obtenidas

La tabla Nº 5 presenta el tipo de muestra, del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”, de donde fueron recolectadas las muestras clínicas para la

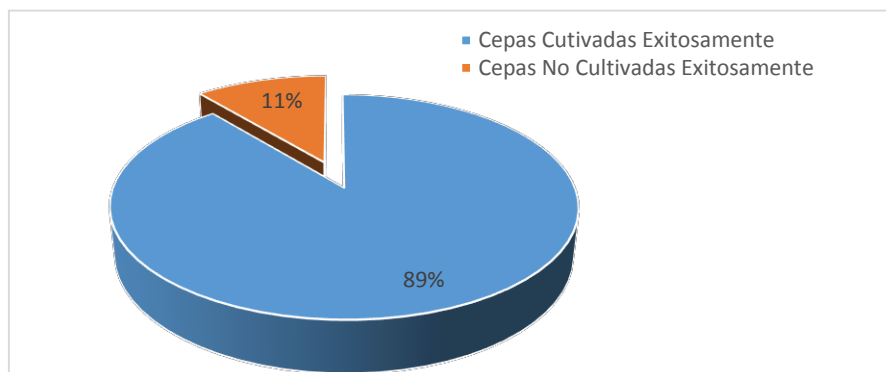
evaluación del Fenotipo y Genotipo de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *Pseudomonas aeruginosa*.

La mayor parte de las muestras eran de Urocultivo (18); de secreción bronquial (9) y de muestras provenientes de catéter (9). Los porcentajes se muestran en la figura N° 3.

### 4.1.2.3 Cepas cultivadas para el estudio fenotípico

**Tabla N° 6:** Cepas cultivadas de las muestras

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Cepas cultivadas exitosamente	40	88.9 %	88.9 %
Cepas no cultivadas exitosamente	5	11.1 %	100.0 %
Total	45	100.0 %	



**Gráfico N° 4:** Cepas cultivadas de las muestras

La tabla N° 6 presenta las cepas que fueron cultivadas a partir de las muestra clínicas obtenidas a los pacientes del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” entre Agosto del 2015 y Enero del 2016.

40 cepas fueron cultivadas exitosamente para el estudio fenotípico mientras que solo 5 cepas no pudieron ser cultivadas en forma exitosa. Los porcentajes correspondientes se muestran en la figura N° 4.

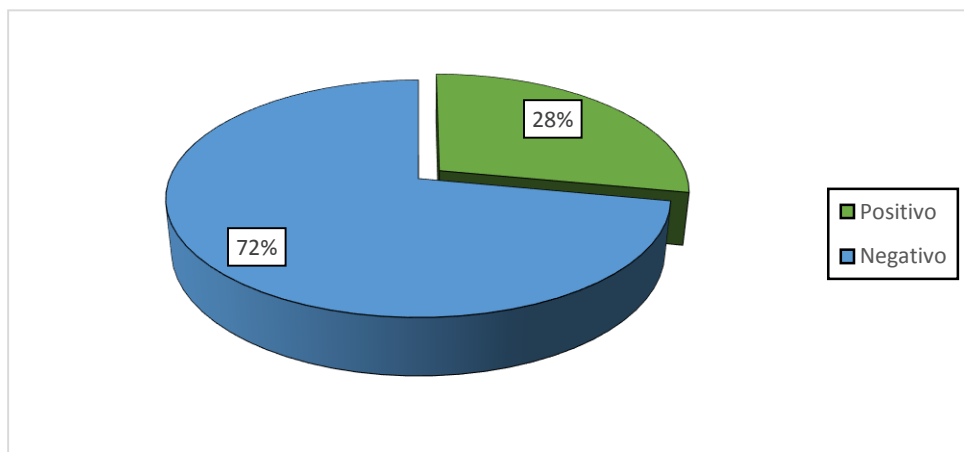
### 4.1.3 Pruebas de Identificación de los Mecanismos de Resistencia

#### 4.1.3.1 Caracterización Fenotípica de los Mecanismos de Resistencia

##### 4.1.3.1.1 Test Sinérgico de Doble Disco para actividad Metalobetalactamasa

**Tabla N° 7:** Test sinérgico de doble disco para actividad Metalobetalactamasa (MBL)

	Metalobetalactamasas (MBL)	
	Frecuencia	Porcentajes
Positivo	11	28.0
Negativo	29	72.0
Total	40	100.0



**Gráfico N° 5:** Mecanismo de resistencia mediante actividad Metalobetalactamasa (MBL)

La tabla N° 7 presenta los resultados de la detección, mediante la técnica del Test Sinérgico de Doble Disco, de la actividad Metalobetalactamasa (MBL).

Se encontró en 11 cepas presencia de MBL (+), mientras que en 29 cepas no se encontró presencia de MBL (-). La figura N° 5 muestra los porcentajes correspondientes.

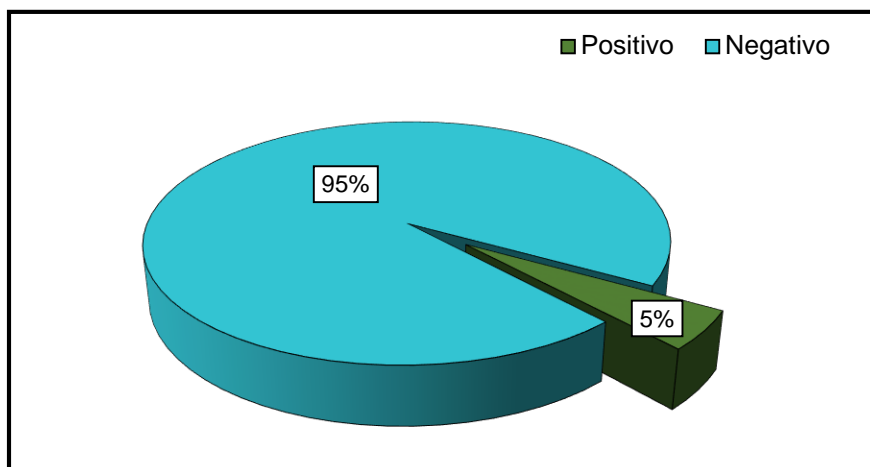


#### 4.1.3.1.2 Test Sinérgico de Doble Disco para actividad Betalactamasa de Espectro

##### Extendido

**Tabla Nº 8:** Mecanismo de resistencia mediante actividad BLEE

	Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	
	Frecuencias	Porcentajes
Positivo	2	5.0 %
Negativo	38	95.0 %
Total	40	100.0 %



**Gráfico Nº 6:** Mecanismo de resistencia mediante actividad BLEE

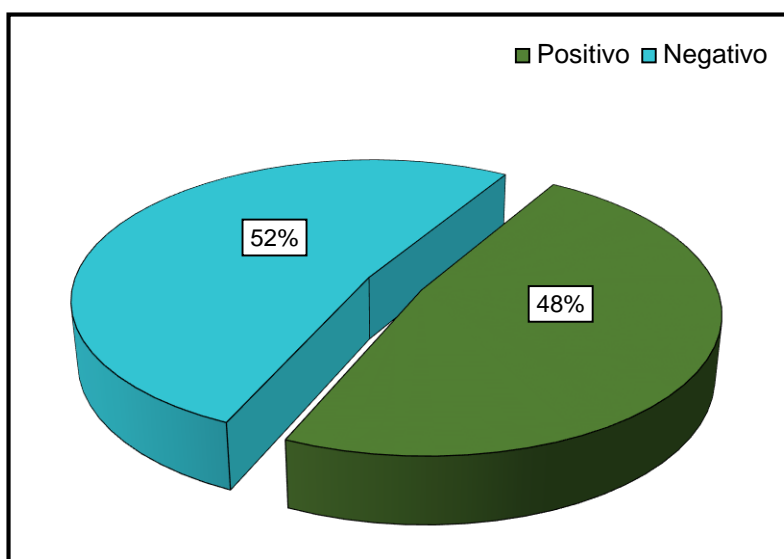
La tabla Nº 8 presenta los resultados de la detección, mediante la técnica del Test Sinérgico de Doble Disco, de la actividad Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE).

Se encontró solo en 2 cepas presencia de BLEE (+), mientras que en 38 cepas no se encontró presencia de BLEE (-). La figura Nº 6 muestra los porcentajes correspondientes.

#### 4.1.3.1.3 Test Sinérgico de Doble Disco para actividad Carbapenemasas Clase A

**Tabla N° 9:** Mecanismos de resistencia mediante actividad Carbapenemasas Clase A

	Carbapenemasas de Clase A	
	Frecuencias	Porcentajes
Positivo	19	47.5 %
Negativo	21	52.5 %
Total	40	100.0 %



**Gráfico N° 7:** Mecanismo de resistencia mediante actividad Carbapenemasas Clase A

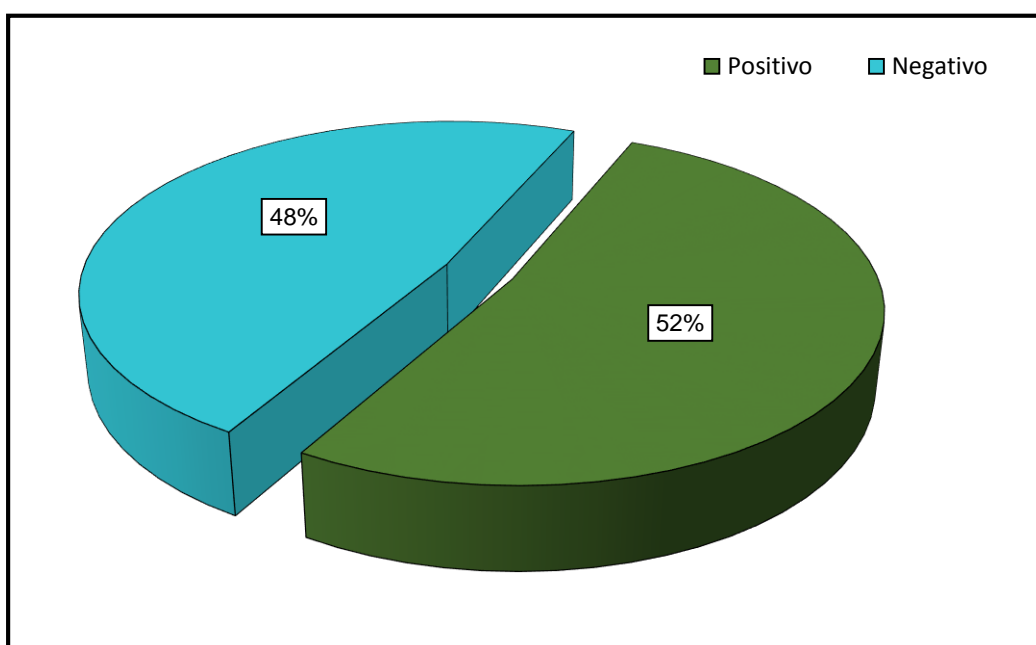
La tabla N° 9 presenta los resultados de la detección, mediante la técnica del Test Sinérgico de Doble Disco, de Carbapenemasas de Clase A.

Se encontró en 19 cepas presencia de Carbapenemasas de Clase A (+), mientras que en 21 cepas no se encontró presencia de Carbapenemasas de Clase A (-). La figura N° 7 muestra los porcentajes correspondientes.

#### 4.1.3.1.4 Test de Hodge Modificado

**Tabla Nº 10:** Test de Hodge Modificado

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Positivo	21	52.5 %	52.5 %
Negativo	19	47.5 %	100.0 %
Total	40	100.0 %	



**Gráfico Nº 8:** Test de Hodge modificado

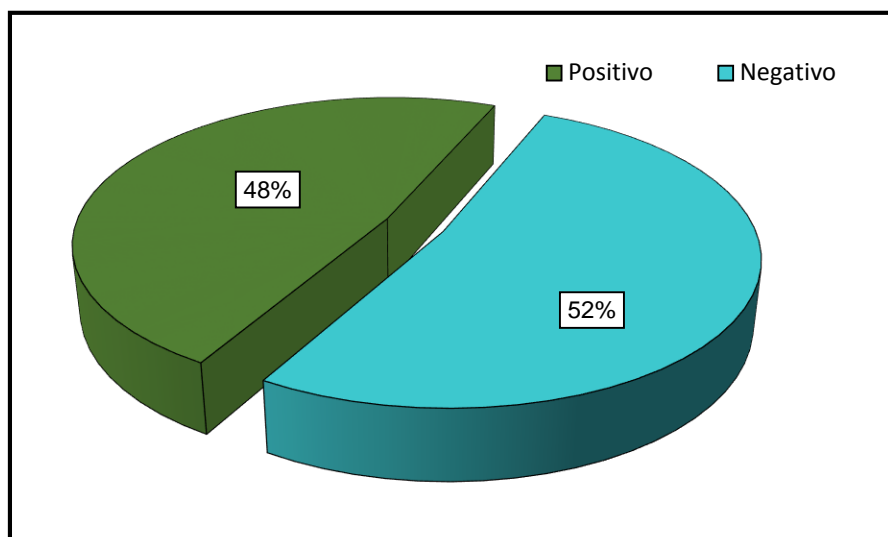
La tabla Nº 10 presenta los resultados del Test de Hodge Modificado, realizado para confirmar que el mecanismo de resistencia de la bacteria a los antimicrobianos del grupo carbapenémicos es debido a la presencia de la enzima carbapenemasa.

El Test de Hodge confirmó en 21 cepas la presencia de la enzima Carbapenemasa, mientras que en 19 cepas confirmó la ausencia de la enzima Carbapenemasa. La figura Nº 8 muestra los porcentajes correspondientes.

#### 4.1.3.1.5 Método de Aproximación de Discos – AmpC Inducibles

**Tabla N° 11:** Método de Aproximación de Discos – AmpC Inducibles

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Positivo	19	47.5 %	47.5 %
Negativo	21	52.5 %	100.0 %
Total	40	100.0 %	



**Gráfico N° 9:** Método de Aproximación de Discos – AmpC inducibles

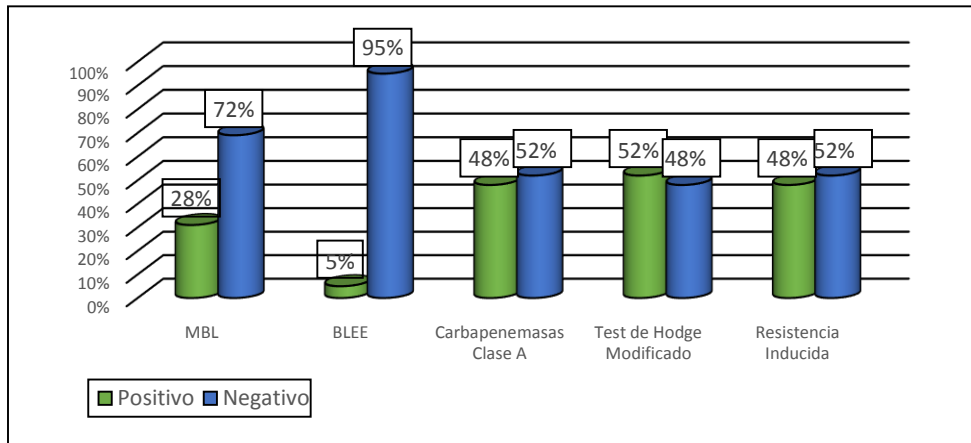
La tabla N° 11 presenta los resultados del Método de aproximación de discos (resistencia inducida) realizado para establecer la producción de AmpC.

El método de aproximación de discos, confirmó en 19 cepas la producción de AmpC, mientras que en 21 cepas no se encontró la producción de AmpC. La figura N° 9 muestra los porcentajes correspondientes.

#### 4.1.3.1.6 Caracterización fenotípica de los Mecanismos de Resistencia en General

**Tabla Nº 12:** Caracterización Fenotípica de mecanismos de resistencia mediante pruebas de microbiología

	Test Sinérgico de Doble Disco			Test de Hodge Modificado	Método de Aproximación de Discos (AmpC)
	MBL	BLEE	Carbapenemasas Clase A		
	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia		
+	11	2	19	21	19
-	29	38	21	19	21
Total	40	40	40	40	40



**Gráfico Nº 10:** Caracterización fenotípica de mecanismos de resistencia mediante pruebas de microbiología

La tabla N° 12 presenta los resultados fenotípicos de los Mecanismos de Resistencia de la *P. Aeruginosa*. 11 cepas dieron Positivo para Metalobetalactamasas (MBL), mientras que 29 cepas dieron Negativo para actividad Metalobetalactamasa (MBL).

Con relación a presencia de actividad Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE), se encontró dicha actividad en solo 2 cepas (+) mientras que en 38 no se encontró actividad Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE). Asimismo se encontró en 19 cepas la presencia de Carbapenemasas de Clase A (+), mientras que en 21 cepas hubo ausencia de Carbapenemasas de Clase A (+). Respecto a la evaluación de mediante el Test de Hodge se confirmó la presencia de la enzima Carbapenemasa en 21 cepas, mientras que en 19 cepas hubo ausencia de la enzima Carbapenemasa.

Finalmente, mediante el método de aproximación de discos (resistencia inducida), en 19 cepas se confirmó la producción de AmpC inducible, mientras que en 21 cepas no se encontró la producción de AmpC inducible. La figura N° 10 muestra los porcentajes correspondientes.

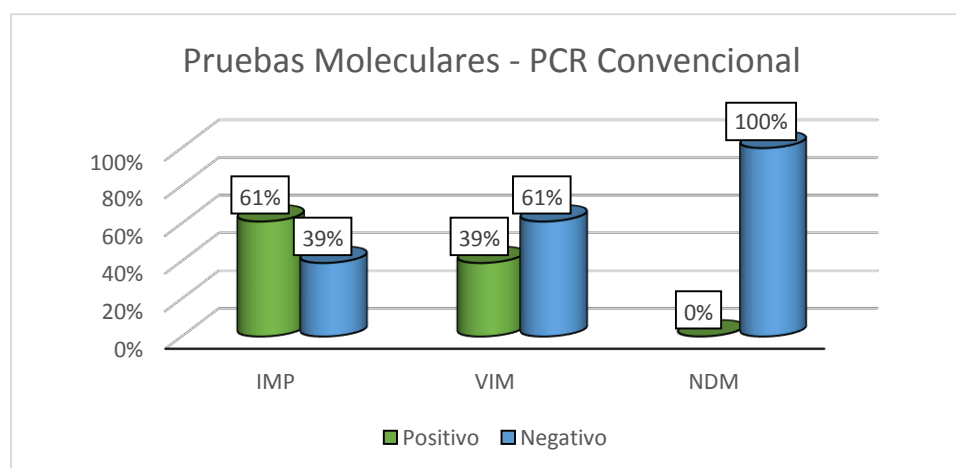
Entre los resultados del Test de Hodge Modificado y el Test Sinérgico de Doble Disco para la detección de MBL, según el Anexo 8, se pudo apreciar una correlación positiva entre sus resultados. Concretamente en 11 casos (28%). No obstante, también se observaron casos en los cuales solo se mostraban resultados positivos en el Test de Hodge Modificado, y negativo para el resto de estudios fenotípicos.

### 4.1.3.2 Caracterización genotípica de los Mecanismos de Resistencia

#### 4.1.3.2.1 Pruebas Moleculares – PCR Convencional

**Tabla Nº 13:** Caracterización genotípica mediante pruebas moleculares

	Pruebas Moleculares					
	PCR genotipo (IMP)		PCR genotipo (VIM)		PCR genotipo (NDM)	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
+	11	61,1	7	38,9	0	0,0
-	7	38,9	11	61,1	18	100,0
Total	18	100,0	18	100,0	18	100,0



**Gráfico Nº 11:** Caracterización de mecanismos de resistencia mediante pruebas moleculares.

La tabla Nº 13 presenta los resultados genotípicos de los Mecanismos de Resistencia en especies de *P. aeruginosa* aisladas. Estos resultados fueron obtenidos mediante pruebas moleculares en el Centro de investigación de enfermedades infecciosas de la embajada de USA (NAMRU-6) y reportados al CEMENA.

En las prueba de PCR convencional se encontró, en 11 cepas aisladas, presencia de genes IMP mientras que en 7 cepas aisladas no se encontró genes IMP.

Asimismo, en 7 cepas aisladas se encontró presencia de genes VIM mientras que en 11 cepas aisladas no se encontró genes VIM.

Finalmente, en todas las cepas aisladas no se encontró presencia de genes NDM.

Los genotipos antes mencionados se detectaron solo en algunos de los aislamientos de *P. aeruginosa*, cuyos ensayos preliminares evidenciaron la presencia de carbapenemasas no específicas, según los procedimientos del NAMRU-06.

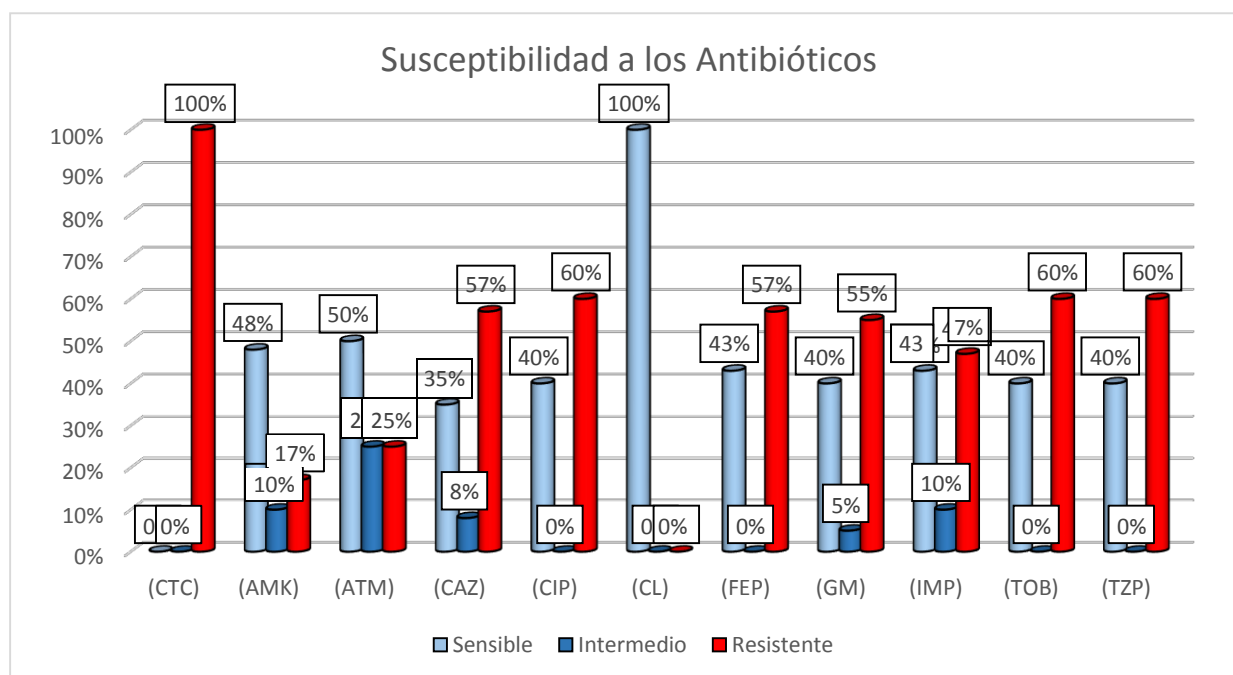
La figura N° 11 muestra los porcentajes correspondientes.



### 4.1.3.3 Susceptibilidad a los antibióticos en especies de *Pseudomonas aeruginosa*

**Tabla N° 14:** Susceptibilidad a los antibióticos en especies de *Pseudomonas aeruginosa*

	Sensible		Intermedio		Resistente	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Cefotaxima / A. Clavulánico (CTC)	0	0,0	0	0,0	40	100,0
Amikacina (AMK)	19	47,5	4	10,0	7	17,5
Aztreonam (ATM)	20	50,0	10	25,0	10	25,0
Ceftazidima (CAZ)	14	35,0	3	7,5	23	57,5
Ciprofloxacino (CIP)	16	40,0	0	0,0	24	60,0
Clindamicina (CL)	32	100,0	0	0,0	0	0,0
Cefepime (FEP)	17	42,5	0	0,0	23	57,5
Gentamicina (GM)	16	40,0	2	5,0	22	55,0
Imipenem (IMP)	17	42,5	4	10,0	19	47,5
Tobramicina (TOB)	16	40,0	0	0,0	24	60,0
Piperacilina / Tazobactam (TZP)	16	40,0	0	0,0	24	60,0



**Gráfico N° 12:** Susceptibilidad a los antibióticos en especies de *P. aeruginosa*

La tabla N° 14 presenta la susceptibilidad a los antibióticos de la *P. aeruginosa*.

Los aislamientos de *P. aeruginosa* presentaron 100% de resistencia a la Cefotaxima / Ácido Clavulánico, mientras que fue sensible a Amikacina (47,5%), al Aztreonam (50%), a la Ceftazidima (35%), a Ciprofloxacino (40%), a Clindamicina (100%), a Cefepime (42,5%), a la Gentamicinas (40%), al Imipenem (42,5%), a Tobramicinas (40%) y a la Piperacilina / Tazobactam (40%).

La susceptibilidad a la Clindamicina fue obtenida del informe provisto por el NAMRU-06, cuyos resultados fueron incluidos en la tabla y el gráfico. La figura N° 12 muestra los porcentajes correspondientes.

## 4.2 Discusión

Perozo Mena Armindo mencionó que en sus resultados se expresó una correlación positiva entre los resultados del Test de Hodge Modificado y el Test de Difusión de Doble Disco para detectar la presencia de Metalo Beta Lactamasas (98.63%), además de observar que en otros especímenes, se observaban resultados positivos para el Test de Hodge Modificado, pero eran negativos en el Test de Difusión de Doble Disco para detección de MBL, llegando a la conclusión que ello se debía a la presencia de otras carbapenemasas no MBL. (22)

En este estudio se pudo apreciar la misma correlación de positividad entre el test de Hodge Modificado y el Test de Difusión de Doble Disco para detección de Metalo Beta Lactamasas empleando discos de EDTA. No obstante, en los casos que dieron positivo para el Test de Hodge Modificado y negativo en el Test Sinérgico de Doble Disco para detección de MBL (25%), respaldando la teoría de que este fenómeno se debe a la presencia de enzimas no MBL.

Dianny del Valle Martinez Rojas describe en su artículo de revisión usar el Método de Aproximación de Discos para la detección de AmpC inducibles, entre otros métodos prácticos y accesibles para su detección, como el uso del ácido borónico. (23)

En este estudio se llevó a cabo el Método de Aproximación de Discos empleando los discos de ceftazidima e Imipenem. Los resultados fueron satisfactorios con relación al comportamiento que se esperaba evidenciar, debido a que se observó la inducción de la Betalactamasa tipo AmpC al exponerla a los discos de Ceftazidima e Imipenem,

además de destacar resultados positivos en el Test Sinérgico de doble disco utilizando el ácido borónico.

Guisela Santella realizó estudios a diversos aspectos genotípicos de cepas resistentes en *Pseudomonas aeruginosa*, determinando que la detección del genotipo IMP es fundamental, pues representa un riesgo latente de selección de mutantes con mecanismos de resistencia que se suman para aumentar la resistencia a Carbapenémicos. (24)

En este estudio solo se pudo llevar a cabo una secuenciación general para detectar el Genotipo IMP, VIM y NDM. Por otra parte, el genotipo IMP es el más frecuente de los tres (61%), además de tomar en cuenta que en el CEMENA, concretamente el NAMRU-6 solo priorizan la detección de esos 3 genotipos, pues según sus estándares, se consideran de mayor importancia al detectar cepas multidrogo resistentes.

Virginia de la Lastra menciona que se utilizó la prueba de Ácido Borónico y el test de Hodge Modificado para evidenciar fenotípicamente las serin-carbapenemasas, no obstante, en su estudio no se evidenciaron resultados positivos con el Ácido Borónico en proporción a la cantidad de muestras obtenidas para su estudio. (25)

En este estudio, para determinar las Carbapenemasas de Clase A, se empleó el Test sinérgico de Doble Disco con ácido borónico y el Test de Hodge Modificado. Para el caso de los especímenes de *Pseudomonas aeruginosa*, ambas pruebas fueron muy efectivas. Además, se advierte que en el estudio descrito por Virginia de la Lastra, no se investigó ninguna *P. aeruginosa*, sino otras enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, lo que me lleva a pensar que los ensayos

fenotípicos para detección de carbapenemasas de Clase A empleando el ácido borónico, también pueden emplearse en especies de *P. aeruginosa*.

Clothilde Ophelie Marie Molin Queste dio prioridad a la detección de MBL empleando Discos de EDTA, resaltando que la aplicación de estos métodos es fácil y podría proporcionar resultados confiables cuando las pruebas moleculares no están disponibles. (26) y Machado Martinez María Fernanda describió en su estudio el uso de discos de EDTA para la determinación fenotípica de metalobetalactamasas. (27)

En este estudio, utilicé discos de EDTA para la detección de Metalo Beta Lactamasas, empleando el Test Sinérgico de Doble Disco, demostrando su efectividad y eficiencia para detectar a estas carbapenemasas de clase B.

José Enrique Olivia Menacho llevó a cabo su estudio tomando como datos principales el servicio de procedencia para el estudio de contaminación bacteriana teniendo como vector a los estetoscopios. (28) y Paul Tejeda Llacsá utilizó registros asociados a los datos del paciente (edad, sexo y servicio del cual se recibió la muestra) así como los datos de la Muestra (tipo de muestra y microorganismo encontrado, y tipo de resistencia, entre otros), revelando una alta presencia de BLEE en consulta externa y en mayores de 46 años. (30)

En este estudio se consideró tanto el servicio de procedencia como las características de los pacientes en el estudio de *P. aeruginosa* con el fin de revelar en qué salas existe una mayor deficiencia en la asepsia, tal y como lo hizo el estudio, de Jose Enrique Menacho al tener como base de su estudio a los estetoscopios. Por otra

parte, la edad y el sexo revelarían que pacientes de la población son más propensos a infectarse con patógenos nosocomiales.

Claudio Rocha considera que la información disponible en los países de continuo desarrollo en América Latina es Limitada. (29)

Edgar Gonzales Escalante utilizó discos de EDTA para evidenciar fenotípicamente la presencia de MBL, y utilizó PCR convencional para evidenciar la presencia del gen  $bla_{IMP}$ . (31)

En este estudio, las pruebas moleculares para la detección del genotipo IMP se hizo de forma general a todas las cepas que eran detectadas como carbapenemasas, sin limitarse exclusivamente a los especímenes que MBL positivos empleando discos de EDTA empleando el Test Sinérgico de Doble Disco.

Aguilar Gamboa Franklin Rómulo estableció el E-test como el estándar de oro en su investigación para comparar los resultados del Test de Difusión de Doble Disco (empleando EDTA) y las prueba de Discos Combinados, ambos en la detección de MBL. (32)

En este estudio no se estableció como estándar al E-test debido a recursos insuficientes para emplearlo en cada uno de los especímenes aislados, no obstante, el estudio de Aguilar Gamboa favorece la confiabilidad de los resultados del Test Sinérgico de Doble Disco para la detección de MBL empleando discos de EDTA, considerando a este método el más adecuado para evidenciar dicho mecanismo de resistencia.

### 4.3 Conclusiones

- Los pacientes masculinos mayores de 60 años tienen una tasa del 60%, siendo la población más propensa en infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, se observa que el servicio de Medicina de Mujeres es el más contaminado, con una tasa del 18% de los especímenes aislados.
- En el tipo de muestra, los urocultivos tienen una tasa del 35% en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, en contraste con las puntas de catéter, representando el 9% del total de aislamientos, atribuyéndose al especial cuidado en los protocolos de asepsia que se tiene en los pacientes internados, especialmente en los provenientes de UCI.
- La concordancia de resultados entre el Test Sinérgico de Doble Disco y el Método de Aproximación de Discos para detección de AmpC (48% de resultados positivos en ambos casos) se debe a que las AmpC, si bien no son muy eficaces hidrolizando carbapenémicos, al manifestar sobreproducción de sus enzimas pueden provocar falsos positivos en el Test de Difusión de Doble Disco para la detección de Carbapenemasas de Clase A.
- Basado en la bibliografía que precede a este estudio, se determinó que un resultado positivo en el Test de Hodge Modificado, y negativo en el Test de Doble Disco para MBL (28% de los casos positivos en el Test de Hodge Modificado) se debe a la presencia de una carbapenemasas no MBL.
- En el Test Sinérgico de Doble disco para la identificación de BLEE, solo se encontraron 2 resultados positivos (5%), teniendo una menor frecuencia en esta población.

- Según la descripción, el genotipo IMP (explicado también en la información sobre el genotipo VIM), teniendo relación con las MBL, tienen una menor eficiencia en la hidrólisis que las VIM. Esto posiblemente llegaría a explicar por qué no había una coincidencia completa de resultados positivos entre el Test de Hodge Modificado (52%) y el Test Sinérgico de Doble Disco para la detección de MBL (28%), a pesar de que otros estudios describen a ambos métodos fenotípicos como los más adecuados para detección de MBL. Esa característica explicaría por qué que no se ha podido apreciar una mayor frecuencia de resultados positivos en la detección fenotípica de MBL; al ser menos eficiente en la hidrólisis en comparación de las VIM (relacionadas con las carbapenemasas) cabe la posibilidad de que sus mecanismos de resistencia no se manifiesten fenotípicamente, demostrando una vez más la importancia de la confirmación del genotipo mediante pruebas moleculares.
- El genotipo IMP, a pesar de no tener una buena capacidad hidrolítica en comparación con el genotipo VIM, tiene una tasa predominante del 61%, debido a que, es el genotipo más común encontrado en especies de *Pseudomonas aeruginosa*.
- El genotipo NDM aún no se ha detectado entre los pacientes del CEMENA, atribuido a la vigilancia epidemiológica que debe estar siguiéndose en otras regiones en el mundo.
- La Clindamicina (CL) se considera un antibiótico de elección en esta población para el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas*, siendo sensible en el 100% de los aislamientos, a diferencia de la Cefotaxima/Acido Clavulánico,



el cual muestra una alta tasa de resistencia, considerando que no es el antibiótico adecuado para tratar infecciones causadas por dicha bacteria, con una tasa del 100% de especímenes resistentes.

#### 4.4 Recomendaciones

- Incluir en futuras investigaciones registros sobre la procedencia de los especímenes aislados, así como las características del paciente de donde proceden.
- Tomando en consideración que la falta de un cepario condicionado adecuadamente provocó perder la viabilidad de algunos especímenes en este estudio, se recomienda darle mucha importancia al equipamiento necesario para la conservación de cepas, pues su preservación ayudaría a la investigación de estudios posteriores que impliquen tanto la vigilancia epidemiológica como, en este caso, llegar a establecer nuevos procedimientos para la detección de mecanismos de resistencia, tanto en especies de *Pseudomonas aeruginosa* como en otras especies de importancia clínica.
- Aplicar métodos fenotípicos combinados entre la detección de carbapenemasas de Clase A con el Test Sinérgico de Doble Disco y el método de aproximación de discos para detección de AmpC inducibles.
- Respalda los resultados positivos del Método de Aproximación de Discos para AmpC inducibles con pruebas moleculares.
- Investigar las características genéticas de las cepas cuyos ensayos son positivos en el Test de Hodge Modificado y Negativos en el Test Sinérgico de Doble Disco para detección de MBL.
- Incluir la investigación de ensayos fenotípicos sencillos y eficientes para la detección de KPC.

- Investigar otros ensayos fenotípicos para detectar las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).
- Adoptar el uso de los términos que establecen las categorías de resistencia adquirida, como Multi Drogo Resistente (MDR), Extensamente Resistente (XDR) y Pan Drogo Resistente (PDR).
- Adoptar nuevas técnicas de identificación molecular para determinar el fenotipo y genotipo de los especímenes multidrogo resistentes. Esa información sería de utilidad para futuros estudios epidemiológicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- F. Navarro Risueño, M. Cuenca Estrella, T. Pumarola Suñe. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica - Mecanismos de Resistencia a los Antimicrobianos*. Editorial Médica de Panamericana. 153 – 165.
- 2.- Pedro Martinez, Salim Máttar, Paula Espinal. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Infectio*. 2007; 11(1): 6 – 15.
- 3.- N. G. Iglesias, J. M. Marengo, F. Rentería, B. GAtti, E. Segal y L. Semorile. *Tipificación molecular de aislamientos de Pseudomonas aeruginosa obtenidos de pacientes con fibrosis quística*. *Revista Argentina de Microbiología* 2008; 40: 3 – 8.
- 4.- María Gabriela Granja Bastidas. *Detección de los genes ampC, ampR, ampD, ampE y ampG mediante reacción en cadena de la polimerasa (PRC) e identificación por secuenciación automática de mutaciones asociadas a la resistencia frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en Pseudomonas aeruginosa*. Sangolquí, Enero de 2011.
- 5.- Carlos Andrés Gómez Álvarez, Aura Lucía Leal Castro, María de Jesús Pérez de Gonzalez, Myriam Lucía Navarrete Jiménez. *Mecanismos de Resistencia en Pseudomonas aeruginosa: Entendiendo a un Peligroso Enemigo*. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colomb*. 2005; 53(1): 27 – 34.
- 6.- Daniel Ángel Luján Roca. *Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso*. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam*. 2014; 48(4): 465 - 74.

- 7.- Adriana Callicó, Bárbara Cedré, Sergio Sifontes, Vismar Torres, Yadira Pino, Ana H. Callís, Sara C. Esnard. *Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa*. Vaccimonitor. Julio – Setiembre 2004; 13(3): 1 – 9.
- 8.- N. Navarrete Navarrete, A. Tapia Gómez, M. López-Gómez, M. A. López-Ruz, J. Jiménez Alonso. *Endocarditis por Pseudomonas aeruginosa. Presentación de un caso atípico y revisión de la literatura*. An. Med. Interna (Madrid). 2007; 24(2): 99 – 100.
- 9.- Zulema Katia Berrios Fuentes. *Resistencia Antimicrobiana en Enterobacterias y uso antimicrobiano en pacientes de la unidad de cuidados intensivos del Hospital Dos de Mayo*. UNMS. 2005.
- 10.- Angela Muñoz Delgado, Carolina Duarte Valderrama. *Manual de Procedimientos para la Determinación de Susceptibilidad Antibiótica en Patógenos de Importancia Hospitalaria*. Instituto Nacional de Salud. Agosto del 2012 Versión 00.
- 11.- R. Vignoli, V. Seija. *Principales Mecanismos de Resistencia Antibiótica*. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2006. 649 – 662.
- 12.- Karla Marcela Moreno Mongue. *Carbapenemicos: Tipos y Mecanismos de Resistencia Bacterianos*. Rev. Med. Costa Rica y Centro América. 2013; 70(608): 599 – 605.
- 13.- Otto Alberto Sussmann P., Lorenzo Mattos, Andrés Restrepo. *Resistencia Bacteriana*. [Place unknown: Publisher unknown: date unknown].

- 14.- Ferran Navarro, Jorge Calvo, Rafael Cantón, Felipe Fernández Cuenca, Beatriz Mirelis, Ferran Navarro. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Detección Fenotípica de Mecanismos de Resistencia en Gramnegativos*. SEIMC. 2011; 38.
- 15.- José David Tafur, Julián Andres Torres, María Virginia Villegas. *Mecanismos de resistencia a los Antibióticos en bacilos Gram Negativos*. CIDEIM. Septiembre del 2008; 12(3): 217 – 226.
- 16.- Andrés Opazo C., Sergio Mella M., Mariana Domínguez Y., Helia Bello T. y Gerardo González R. *Bombas de Expulsión Multidrogas en Acinetobacter baumannii y Resistencia a Antimicrobianos*. Rev. Chil. Infect. 2009; 26(6): 499 – 503.
- 17.- Nerea Porres Osante. *Detección y Bases Genéticas de beta-Lactamasas AmpC y carbapenemasas en aislados clínicos y comenzales de enterobacterias*. [Tesis Doctoral] Logroño. Universidad La Rioja. 2015.
- 18.- Carlos Juan Nicolau y Antonio Oliver. *Carbapenemasas en especies del género Pseudomonas*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2010; 28(1): 19 – 28.
- 19.- Néstor O. Concha, Cheryl A. Janson, Pam Rowling, Stewart Pearson, Christy A. Cheever, Brian P. Clarke, Ceri Lewis, Moreno Galleni, Jean-Marie Frère, David J. Payne, John H. Bateson, Sherin S. Abdel-Meguid. *Crystal Structure of the IMP-1 Metallo B-Lactamase from Pseudomonas aeruginosa and Its Complex with a Mercaptocarboxylate Inhibitor: Binding Determinants of a Potent, Broad-Spectrum Inhibitor*. Biochemistry. 2000; 39(15): 4288 – 4298.
- 20.- Robert C. Moellering, Jr., M.D. *NDM-1 — A Cause for Worldwide Concern*. N. Engl. J Med. 2010; 363(25): 2377 – 2379.

- 21.- A.-P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, D. L. Monnet. *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 2012; 18: 268–281
- 22.- Perozo Mena, Armindo José, Castellano González, Maribel Josefina, Ling Toledo, Eliana y Arraiz, Naillet. *Detección fenotípica de MetaloBetaLactamasas en aislados clínicos de Pseudomonas aeruginosa*. KASMER. 2012; 40(2): 113 – 121.
- 23.- Dianny Del Valle Martínez Rojas. *Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2009; 29: 78 – 83.
- 24.- Santella G, Pollini S, Docquier J, Almuzara M, Gutkind G, Rossolini GM, et al. *Resistencia a carbapenemes en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos*. Rev. Panam. Salud Pública. 2011; 30(6): 545–548.
- 25.- Virginia de la Lastra, Lina M. Rivas, Francisco Silva, M. Teresa Ulloa, M. Eugenia Pinto y Mario Vidal. *Detección de serinocarbapenemasas de clase A y otros mecanismos de resistencia enzimática a  $\beta$ -lactámicos en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, aisladas de pacientes de un hospital universitario de Santiago, Chile*. Rev. Chilena Infectol. 2014; 31(6): 682 – 688.

- 26.- Clotilde Ophelie Marie Molin Queste. *Detección Fenotípica de Carbapenemasas en Pseudomonas aeruginosa en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2016; 14(1): 25 – 31.
- 27.- Machado M. Maria F., Vera O. Mariangel J. *Efectividad Del Ácido Etilenaminotetraacético (EDTA) y del Mercaptoacético De Sodio (Sma), en la Detección De Metalo B-Lactamasas En Cepas De Pseudomonas Aeruginosa*. [Trabajo de Grado] Bolívar. Venezuela. Universidad De Oriente Núcleo Bolívar. Escuela De Ciencias De La Salud “Dr. Francisco Battistini Casalta”. Dpto. Parasitología Y Microbiología. Ciudad Bolívar, Febrero del 2010.
- 28.- José Enrique Oliva Menacho, Marco Antonio García Hjarles, José Arturo Oliva Candela, Hugo Saturnino De la Cruz Roca. *Contaminación con bacterias patógenas de estetoscopios del personal médico en un hospital de nivel III en Lima, Perú*. Rev Med Hered. 2016; 27: 83 - 88.
- 29.- Claudio Rocha, Nathanael D. Reynolds, Mark P. Simons. *Resistencia Emergente a los Antibióticos: una Amenaza Global y un Problema Crítico en el Cuidado de la Salud*. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. 2015; 32(1): 139 - 145.
- 30.- Paul J Tejada-Llacsca, Jury M Huarcaya, Giannina C Melgarejo, Lida F Gonzales, Judith Cahuana, Rosa M Pari, Hector L Bohorquez, Jesús Chacaltana. *Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional*. An. Fac. med. 2015; 76(2): 161 – 166.
- 31.- Edgar Gonzales Escalante, William Vicente-Taboada, Roky Champi Merino, Javier Soto Pastrana, Wilfredo Flores Paredes, Margarita Lovera García, Nancy Chuquiray

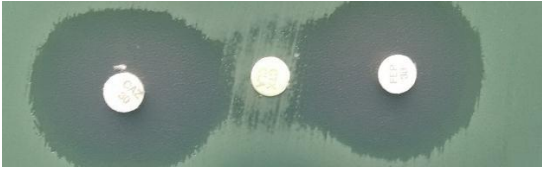


Valverde, Carlos Bejarano Cristobal, Maritza Puray Chávez, Segundo León-Sandoval. *Metallo- $\beta$ -lactamasas en Aislamientos Clínicos de Pseudomonas aeruginosa en Lima, Perú*. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública. 2013; 30(2): 241 - 245.

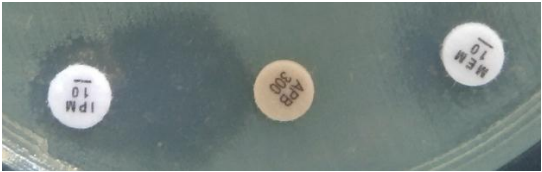
32.- Aguilar Gamboa Franklin Rómulo, Labrín Yampufe Henry Wilfredo, Moreno Mantilla Mario Cecilio. *Frecuencia y Comparación de Tres Métodos de Detección Fenotípica de Pseudomonas aeruginosa Productora de Metalobetalactamasas Aisladas en el Hospital Regional Lambayeque. Durante el 2014*. Rev. Exp. Med. 2016; 2(1): 05 – 11.

## ANEXOS

**Anexo 1.-** Resultado positivo para BLEE en el Test de Difusión de Doble Disco.



**Anexo 2.-** Resultado positivo para Carbapenemasas de Clase A en el Test de Difusión de Doble Disco.



**Anexo 3.-** Resultado positivo para Metalo Beta Lactamasas en el Test Sinérgico de Doble Disco.



**Anexo 4.-** Resultado positivo en el Test de Hodge Modificado.



**Anexo 5.-** Resultado positivo en el Método de Aproximación de Discos – Resistencia Inducida (AmpC Inducibles).



**Anexo 6.- PLANTILLA DE LISTA DE CEPAS AISLADAS DESDE AGOSTO DEL 2015 HASTA DICIEMBRE DE 2015**

<b>N°</b>	<b>Servicio</b>	<b>Edad</b>	<b>Fecha:</b>	<b>Tipo de Muestra:</b>	<b>Cepa Aislada:</b>	<b>Oxidasa:</b>	<b>Biotipo:</b>
1							
2							
3							
4							
5							

**Anexo 7.- PLANTILLA DE REGISTRO DE PRUEBAS REALIZADAS EN CEPAS AISLADAS DESDE AGOSTO DEL 2015 HASTA DICIEMBRE DE 2015**

<b>N°</b>	<b>TEST DE HODGE MODIFICADO</b>	<b>TEST SINERGICO DE DOBLE DISCO</b>			<b>Método de Aproximación de Discos</b>
		<b>MBL</b>	<b>BLEE</b>	<b>Carbapenemasas Clase A</b>	
1					
2					
3					
4					
5					

**Anexo 8.- Resultados de los Estudios de Caracterización Fenotípica para identificación de los Mecanismos de Resistencia en especies de *Pseudomonas aeruginosa*.**

N°	TEST DE HODGE MODIFICADO	Test Sinérgico de Doble Disco			Resistencia Inducida
		MBL (EDTA)	BLEE (AMC)	Carbapenemasas A	
1	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
3					
4	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
11	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
14	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
15					
16	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
17	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
18	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
21	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
24	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
25	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
28	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29		Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
30	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
32					
33	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
34	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
38	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
39	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
40	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
41					
42	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
43	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
44					
45	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Anexo 9: Informe de Resultados del NAMRU-06



DEPARTAMENTO DE LA MARINA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES TROPICALES - NAMRU-6  
CENTRO MÉDICO NAVAL  
AVENIDA VENEZUELA CUADRA 36 S/N  
CALLAO 2, PERÚ

3900  
Ser 00F0/1219  
27 de septiembre 2016

Señor Contralmirante  
Alejandro David Portilla Linares  
Director de Salud de la  
Marina de Guerra del Perú

Estimado Contralmirante Portilla:

ASUNTO: REMISIÓN DE INFORME DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE  
*PSEUDOMONA AERUGINOSA*

Por medio de la presente es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y a la vez hacerle llegar el informe sobre la Resistencia Antimicrobiana de la *Pseudomona aeruginosa* realizadas en el año 2015 en el Centro Médico Naval.

Las tomas de muestras se realizaron en diferentes áreas hospitalarias del nosocomio, siendo realizada por el personal del Departamento de Bacteriología del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6), con finalidad de observar los diferentes tipos de bacterias que se pudieran encontrar en un área de hospitalización, a las cuales se realizaron análisis molecular por PCR, encontrando cepas de *P. aeruginosa* multidrogo resistente.

Sin otro particular, me despido no sin antes reiterarle los sentimientos de mayor consideración y estima.

Muy atentamente

ADAM W. ARMSTRONG  
Capitán de Navío, MC, USN  
Comandante del NAMRU-6

Adj: Informe de Resistencia Antimicrobiana de *P. aureginosa*

Copia a: Oficial Enlace DISAMAR/NAMRU-6

INFORME DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE LA PSEUDOMONA AUREGINOSA

Codlab	IDNumber	ESKAPE	Mol test	Result1	CARBABENEMASAS	IMP	VIM	NDM	Mol test	AMC	AMC_s	AMK_s	ATM_s	CAZ_s	CIP_s	CL_s	FEP_s	GM_s	IPM_s	PIP_s	TOB_s	TZP_s
NSC1466	P1065	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
NSC1467	P1066	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
NSC1468	P1067	1	1	P. aeruginosa	Neg	Pos	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1469	P1068	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
NSC1470	P1069	1	1	P. aeruginosa	Neg	Pos	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1471	P1070	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R
NSC1472	P1071	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1473	P1072	1	1	P. aeruginosa	Pos	Neg	Pos	Neg	1	6	R	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1474	P1073	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1475	P1074	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1476	P1075	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1478	P1077	1	1	P. aeruginosa	Pos	Neg	Pos	Neg	1	6	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1479	P1078	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1480	P1079	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1481	P1080	1	1	P. aeruginosa	Pos	Neg	Pos	Neg	1	6	R	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1482	P1081	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1483	P1082	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1484	P1083	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1485	P1084	1	1	P. aeruginosa	Pos	Neg	Pos	Neg	1	6	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1486	P1085	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1487	P1086	1	1	P. aeruginosa	Pos	Neg	Pos	Neg	1	6	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1488	P1087	1	1	P. aeruginosa	Pos	Neg	Pos	Neg	1	6	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1489	P1088	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1490	P1089	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1491	P1090	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1492	P1091	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1493	P1092	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1494	P1093	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NSC1495	P1094	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1496	P1095	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1497	P1096	1	1	P. aeruginosa	Neg	Neg	Neg	Neg	1	6	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
NSC1498	P1097	1	1	P. aeruginosa	Pos	Pos	Neg	Neg	1	6	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R

## Anexo 10: Informe de CC del equipo automatizado MicroScan WalkAway 96 Plus.

### Informe del panel de CC

CENTRO MEDICO NAVAL "CMST"

SERVICIO DE PATOLOGIA CLINICA

UNIDAD DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

Nº lote: 2017/01/14  
 Tipo panel: Neg Urine Combo 61  
 Fecha recepción: 20/10/2016

Aislamiento: 8  
 Cepa de CC: 27853 P. aeruginosa

Estado: Completo  
 Fecha Estado: 21/10/2016

Las pruebas bioquímicas y los antimicrobianos marcado con una flecha (») se consideran fuera de control. "Variable" indica que el valor esperado es negativo o positivo. N/A indica que el valor es no aplicable y el valor es no esperado o fuera de rango.

Bioquímico	Probado	Esperado	Antimicrobiano	Probado	Esperado
ACE	Positivo	Positivo	Amicacina	<=16	<=16
ADO	Negativo	Negativo	Amp/Sulbactam	>16/8	>16/8
ARA	Negativo	Negativo	Ampicilina	>16	>16
ARG	Positivo	Positivo	Aztreonam	<=4	<=4 -- 8
CET	Positivo	Positivo	Cefazolina	>16	>16
CF8	Positivo	Positivo	Cefepima	<=4	<=4
CIT	Positivo	Positivo	Cefotaxima	8	8 -- 32
CL4	Negativo	Negativo	Cefotaxima/A Clavulánico	>4	N/A
ESC	Negativo	Negativo	Cefoxitina	>16	>16
FD64	Positivo	Positivo	Ceftazidima	<=1	<=1 -- 4
GLU	Negativo	Negativo	Ceftazidima/A Clavulánico	2	N/A
H2S	Negativo	Negativo	Ceftriaxona	8	8 -- >32
IND	Negativo	Negativo	Cefuroxima	>16	>16
INO	Negativo	Negativo	Ciprofloxacina	<=1	<=1
K4	Positivo	Positivo	Ertapenem	4	2 -- >4
LYS	Negativo	Negativo	Gentamicina	<=4	<=4
MAL	Positivo	Positivo	Imipenem	2	<=1 -- 4
MEL	Negativo	Negativo	Levofloxacina	<=2	<=2 -- 4
NIT	Positivo	Variable	Meropenem	<=1	<=1
OF/G	Positivo	Variable	Nitrofurantoina	>64	>64
ONPG	Negativo	Negativo	Pip/Tazo	<=16	<=16
ORN	Negativo	Negativo	Tigeciclina	4	N/A
P4	Positivo	Positivo	Tobramicina	<=4	<=4
RAF	Negativo	Negativo	Trimet/Sulfa	>2/38	>2/38
RHA	Negativo	Negativo			
SOR	Negativo	Negativo			
SUC	Negativo	Negativo			
TAR	Negativo	Variable			
TDA	Negativo	Negativo			
TO4	Negativo	Negativo			
URE	Negativo	Variable			
VP	Negativo	Negativo			

Reactivo	Nº lote	Reactivo	Nº lote
Indol HNID		Cloruro férrico	
Reactivo de Kovac		Hidróxido potásico	
Alfa naftol		Ácido sulfanilico	
N, N-dimetilalfanaftilamina		Peptidasa	
Hidróxido sódico		Indol rápido	

Revisado por: \_\_\_\_\_  
 Impreso 21/10/2016 12:43:57 p.m.

Página 1 de 1

Fecha: \_\_\_\_\_

PROBLEMAS	OBJETIVOS	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES					
		VARIABLE PRINCIPAL					
Problema Principal	Objetivo Principal	MECANISMOS DE RESISTENCIA EN ESPECIES DE	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Valores Finales	Fuente de Información
¿Cuáles son los mecanismos de resistencia presentes en cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en muestras de pacientes del Centro Médico Naval?	Determinar los mecanismos de resistencia presentes en cepas de <i>P. aeruginosa</i> mediante el fenotipo y el genotipo aisladas en el periodo comprendido entre Agosto del 2015 y Enero del 2016.			Se obtendrán datos de las técnicas manuales y automatizadas del laboratorio de microbiología para la identificación de las especies de estudio y su nivel de sensibilidad o resistencia a los antibióticos. En base a los resultados obtenidos de cada espécimen aislado, se realizarán las pruebas de identificación fenotípica y genotípica de los mecanismos de resistencia a los antibióticos.	Mecanismos de Resistencia	Turbidimetría	Sensible Intermedio Resistente
		Diferencia de MIC				Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	Resultados
VARIABLES SECUNDARIAS							
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	FENOTIPO	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Valores Finales	Fuente de Información
¿Cuál es la caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia en cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en pacientes del Centro Médico naval?	Determinar los mecanismos de resistencia de los especímenes de <i>P. aeruginosa</i> mediante caracterización fenotípica.			Se obtendrán datos de los antibiogramas que se realizaran a cada una de las cepas en estudio, con la finalidad de evidenciar la caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia que puedan expresar.	Pruebas Manuales de Microbiología	Test Sinérgico de Doble Disco (MBL)	Positivo Negativo
		Test Sinérgico de Doble Disco (BLEE)				Positivo Negativo	Resultados
		Test Sinérgico de Doble Disco (Carbapenemasas Clase A)				Positivo Negativo	Resultados
		Test de Hodge Modificado				Positivo Negativo	Resultados
		Resistencia Inducida				Positivo Negativo	Resultados
¿Cuál es la caracterización genotípica de los mecanismos de resistencia en cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas en pacientes del Centro Médico naval?	Determinar los mecanismos de resistencia de los especímenes de <i>P. aeruginosa</i> mediante caracterización genotípica empleando pruebas moleculares.	GENOTIPO	Se obtendrán datos de las pruebas moleculares que se realizaran a cada una de las cepas en estudio, con la finalidad de confirmar la caracterización genotípica de los mecanismos de resistencia que hayan sido expresados en las pruebas fenotípicas.	Pruebas Moleculares	PCR Genotipo IMP	Positivo Negativo	Resultados
					PCR Genotipo VIM	Positivo Negativo	Resultados
					PCR Genotipo NDM	Positivo Negativo	Resultados
¿Cuál es la caracterización de los aislamientos según la edad, sexo, tipo de muestra y procedencia?	Determinar la caracterización de los aislamientos según la edad, sexo, tipo de muestra y procedencia.			Edad	-	Años	Registros
				Sexo	-	Masculino Femenino	Registros
				Procedencia de la Muestra	-	Ambulatorio Hospitalizado Emergencia	Registros
				Tipo de Muestra	-	Orina Esputo Otros	Registros



