



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA,  
MANAGUA  
UNAN - MANAGUA

**Instituto Politécnico de la Salud**

**Departamento de Bioanálisis clínico y Microbiología**

**Monografía para optar al título de Licenciatura en Microbiología**

**Título**

Detección de genes que codifican Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhl de la ciudad de Managua, en el período comprendido de enero a septiembre del año 2017

**Autores:**

Br. Mercado Latino Alexander Antonio.

Br. Rugama Rivera Kelvin Josué.

Br. Sirias Palacios Eduardo Francisco

**Tutor:**

Msc. Oscar Arbizu Medina

Lic. BAC, Msc Microbiología Médica

**Asesor metodológico:**

Arelys Dolores Mejía Álvarez

Licenciada en Microbiología

**Managua, Enero 2018**

## CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

VALORACIÓN DEL TUTOR

VALORACIÓN DEL ASESOR METODOLÓGICO

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.....	12
II.	ANTECEDENTES .....	13
III.	JUSTIFICACIÓN .....	15
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	16
V.	OBJETIVOS.....	17
VI.	MARCO TEÓRICO .....	18
6.1	Género y especie .....	18
6.1.1	Historia:.....	19
6.1.2	Variabilidad Genética .....	21
6.2	Patogenicidad.....	22
6.3	Factores de Virulencia .....	24
6.3.1	Factores estructurales .....	24
6.3.2	Factores celulares .....	25
6.4	Mecanismos de transmisión.....	26
6.5	Factores y población de riesgo .....	26
6.5.1	Ámbito Hospitalario.....	27
6.5.2	Utilización de tratamiento previo .....	27
6.5.3	Agente infeccioso.....	27
6.6	Inmunología .....	28
6.1	La barrera epitelial .....	28
6.2	Inmunidad humoral .....	28
6.3	Complemento .....	28
6.4	Inmunidad celular.....	29
6.5	Células fagocíticas.....	30
6.6	Sistema fagocíticas mononuclear .....	30
6.7	Manifestaciones clínicas de infecciones por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
6.8	Mecanismos y perfil de resistencias.....	32
6.8.1	$\beta$ – lactamasa .....	33

6.8.2	Bombas de Expulsión.....	34
6.8.3	Porinas de Membranas .....	35
6.8.4	Modificación del sitio de Acción. ....	36
6.8.5	Carbapenemasas.....	36
6.8.6	Serino – Carbapenemasa .....	36
6.8.7	Metal $\beta$ – lactamasa (MBLs).....	37
<b>6.9</b>	<b>Metaloenzimas transferibles (Genes de Resistencias) .....</b>	<b>38</b>
6.9.1	Metaloenzimas tipo IMP (Imipenemasa) .....	38
6.9.2	Metaloenzimas tipo VIM (Verona Imipenemasa).....	39
6.9.4	Metaloenzimas tipo GIM-1 .....	41
<b>7.</b>	<b>Métodos Diagnósticos para la identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>41</b>
7.1.1	Cultivo.....	41
7.1.2	Identificación microbiana mediante el sistema VITEK 2. (GSusuki, 2012) .....	42
7.1.3	PCR convencional, multiplex y punto final .....	43
<b>7.2</b>	<b>Tratamiento (Profilaxis) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>44</b>
7.2.1	Azlocilina .....	44
7.2.2	Gentamicina .....	44
7.2.3	Ceftazidima .....	44
7.2.4	Carbenicilina .....	45
7.2.5	Ticarcilina.....	45
7.2.6	Piperacilina.....	45
7.2.7	Cefsulodina.....	46
7.2.8	Cefepime .....	46
7.2.9	Imipenem.....	46
7.2.10	Meropenem: .....	47
7.2.11	Aztreonam: .....	47
<b>VII.</b>	<b>DISEÑO METODOLOGICO .....</b>	<b>48</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>X.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>XI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>.....</b>	<b>80</b>

## ABREVIATURAS

**AB:** Antibióticos

**BLEE:** Beta-lactamasa de Espectro Extendido

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**DNA:** Acido Desoxirribonucleico

**GIM:** Metaloenzimas German Imipenemasa

**IMP:** Metaloenzimas Imipenemasa

**LPS:** Lipopolisacárido

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo

**MBLs:** Enzima Metallo-beta-lactamasa

**OBLs:** Oxalo-beta-lactamasa

**PAE:** *Pseudomonas aeruginosa*

**PBP:** Proteínas Fijadoras de las Penicilinas

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

**POLISAL:** Instituto Politécnico de la Salud

**SIM:** Metaloenzimas tipo Seul Imipenemasa

**SPM:** Metaloenzimas Sao Pablo

**UFC:** Unidad Formadora de Colonias

**VIM:** Verona integron encoded metallo  $\beta$ -lactamase

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis va dirigida en primer lugar a Dios, porque nos ha sabido guiar por el buen camino, darnos las fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándonos a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.*

*A nuestras respectivas familias en especial nuestros padres, por hacer de nosotros lo que somos, inculcándonos siempre por el buen camino, dándonos su apoyo, consejo, comprensión, amor y ayudarnos con los recursos necesarios para estudiar de modo que nos permitiesen alcanzar los objetivos propuestos a ser futuros profesionales.*

*A nuestros maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarnos como personas de bien y preparados para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedicamos cada una de estas páginas de nuestra tesis.*

*Gracias también a todos los que nos apoyaron en la continuación de esta tesis, nuestro tutor y asesor, personal del laboratorio de biología molecular del Polisal y nuestras amistades.*

***Alexander Antonio Mercado Latino***

***Kelvin Josué Rugama Rivera***

***Eduardo Francisco Sirias Palacios***

## **AGRADECIMIENTO A:**

*Esta monografía fue un proceso de aprendizaje y experimentación personal, que necesitó de la paciencia de mucha gente para llegar a buen término. Por esto, agradezco de manera muy sincera, en primer lugar a Dios, Señor y dador de vida, que por su infinito amor y misericordia me ha permitido llegar hasta este punto de mi carrera.*

*De manera muy especial y significativa a mis padres Sergio Mercado y Jeannethe Latino, pilares fundamentales y razón que me motiva a seguir adelante, que a pesar de todos los momentos buenos, así como también los malos, estuvieron para mí brindándome su apoyo incondicional e inculcándome siempre por el buen camino, para llegar a ser un buen profesional. A mi novia Yokasta Montoya, por todo su amor, cariño, disponibilidad y estar siempre conmigo alentándome. A los tres, los amo mucho.*

*A mi tutor, Msc. Oscar Arbizu, por haberme brindado en conjunto con el departamento de Bioanálisis Clínico, ésta oportunidad tan valiosa de desarrollar el presente estudio como tesis para la finalización de mi carrera.*

*A los maestros Zeneyda Quiroz, Roberto Gutiérrez, Jesús Mendoza, la secretaria del departamento de Bioanálisis clínico Lic. Isabel Hernández y a todas aquellas personas que durante todo el transcurso de la carrera estuvieron para mí en situaciones de dificultad y animándome a seguir adelante, Dios les bendiga.*

*A Amistades y docentes Lic. Kenia García, Msc. Ligia Ortega, Msc. Roberto Flores, Msc. Martha Guerrero, correspondientes a la carrera de Microbiología que contribuyeron en gran manera al cumplimiento de todos los objetivos que permitieron mi desarrollo no solo personal, sino también profesional.*

**Alexander Antonio Mercado Latino**

## **AGRADECIMIENTO A:**

*Por este proyecto, y por un nuevo logro. Antes que todo quiero agradecerle a Dios, por darme las fuerzas necesarias y salud, además de toda su bondad y su infinito amor, para continuar mi recorrido, superando todos los obstáculos que se me presentaron a lo largo de esta trayectoria, hasta que al fin puedo ver la luz al final del túnel.*

*De manera muy especial a mi padre William Ernesto Rugama Ruiz, a mi madre Marlen Jessenia Rugama de Guillen y a mi abuelita Felipa Nery Rugama Galeano, por ser un pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación tanto académica y en la vida, todas las lecciones importantes que se necesitan para vivir una vida haciendo las cosas correctamente y por todo el apoyo mantenido a través del tiempo. A Heykel Junieth Castro Arauz, por todo su amor, cariño y apoyo incondicional que me ha dado en el transcurso de mi formación personal y profesional.*

*A mi tutor, Msc. Oscar Heriberto Arbizu Medina y asesora Lic. Arelys Mejía Alvares, por haberme brindado y confiado ésta oportunidad tan valiosa de desarrollar el presente estudio como tesis para la finalización de mi carrera y dándome ánimos a seguir adelante.*

*A los maestros de la carrera de Microbiología, que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarnos como personas de bien y preparados para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos se les agradece cada una de estas páginas de esta tesis.*

*A mis amistades, POLISAL y a Lic. Kennia García Rosales por habernos apoyado en el transcurso de esta tesis y brindarnos todo el tiempo necesario para lograr este objetivo y cumplir mis metas contribuyendo no solamente personal, sino también profesional.*

**Kelvin Josué Rugama Rivera**

## **AGRADECIMIENTO A:**

*Expreso mi más sincero agradecimiento en el presente trabajo primeramente a Dios, por permitirme haberme dado la vida, darme la oportunidad de poder haber llegado a esta etapa de mi vida.*

*A mis padres, Amelia Francisca de Fátima Palacios Mora y Segundo José Sirias Reyes, que en todo momento recibí su apoyo incondicional, que me motivaron a seguir adelante y que siempre me alientan a no desistir en las decisiones más importantes de mi vida.*

*Al tutor, Msc. Oscar Arbizu Medina, por haberme confiado y permitido realizar dicho trabajo monográfico, apoyándonos en la parte metodológica y dándonos ánimos de seguir adelante.*

*A la Msc. Lorena Ortega y el PhD. Juan Francisco Rocha, que siempre me alentaron, dándome consejos para que fuese un estudiante esforzado y así lograr culminar mis estudios.*

*A los diferentes docentes de la Universidad, que me encaminaron con cada uno de sus consejos, con cada uno de sus mensajes y palabras de motivación, sinceramente mis eternos agradecimientos.*

*A todos los docentes de las asignaturas contempladas para la Carrera de Microbiología, los cuales me dieron y permitieron recibir conocimientos fundamentales para poder ser un profesional de calidad, de igual forma a todos aquellos que me dieron su apoyo desinteresado en los centros de salud y hospitales, muy en especial, a los jefes y trabajadores del Centro de Salud Francisco Buitrago y el Hospital Solidaridad, Dios les bendiga.*

**Eduardo Francisco Sirias Palacios**

## VALORACIÓN DEL TUTOR

A pesar de que la resistencia bacteriana es un fenómeno evolutivo natural, la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos en los últimos 70 años ha acelerado su ritmo mucho más que lo ocurrido en millones de años anteriores. Múltiples mecanismos de resistencia han desarrollado las bacterias en su evolución; producción de enzimas inactivadoras, mutación de sitios de acción, bomba de expulsión, etc. La producción de carbapenemasas, enzimas inactivadoras de carbapenémicos, es uno de los más recientes, pero quizás de los más preocupantes, ya que inactivan prácticamente al último escalón terapéutico frente a microorganismos Gram negativos multirresistentes.

Considero que el trabajo monográfico, Detección de genes que codifican Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll de la ciudad de Managua, en el período comprendido de enero a septiembre del año 2017. Esta listo para ser dictaminado y defenderse, este tema es de gran importancia por la situación de nuestros hospitales, por tantas violaciones a las normativas de higiene y seguridad, el aumento de la resistencia es un problema de salud global.

Este trabajo monográfico está listo para ser dictaminada por los especialistas, este trabajo reúne todo los requerimientos científicos y metodológicos, solo esperando los aportes, para ser retomados.

**Tutor.**

Msc. Oscar Arbizu Medina.

## VALORACIÓN DEL ASESOR METODOLÓGICO

*Pseudomonas aeruginosa*, es un microorganismo no fermentador con mucho interés clínico, este germen mundialmente tiene una alta resistencia a los antimicrobianos y se convierte en un gran problema en el sector salud. Por esta razón, en el hospital Central Managua Cesar Amador Kuhll surgió la necesidad de realizar un estudio que demuestre la prevalencia de genes productores de carbapenemasa y de esta forma crear iniciativas para lograr incidir en la población hospitalaria.

Como asesora considero que el trabajo, Detección de genes que codifican Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll de la ciudad de Managua, en el período comprendido de enero a septiembre del año 2017, está apto para ser dictaminado por especialistas. Desde mi punto de vista es un gran aporte a la comunidad científica y cumple con los estándares metodológicos necesarios para su disertación.

Lic. Arellys Mejía Álvarez

Microbióloga

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno muy importante, por ser causa frecuente de muchas infecciones especialmente nosocomiales, así como por tener una elevada resistencia intrínseca a los antibióticos y una gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, ya sea por mutación o por adquisición de nuevos genes.

Por lo tanto, el tipo de estudio es descriptivo prospectivo de corte transversal, cuyo objetivo es caracterizar los genes productores de Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras del Hospital Central Cesar Amador Kuhll, la identificación se realizó con técnicas convencionales de microbiología; como es el Sistema Automatizado Vitek 2 Compact para el perfil de susceptibilidad de acuerdo con las recomendaciones del CLSI. El fenotipo de resistencia a MBLs se determinó por los Carbapenémicos con CMI  $\geq 8$ , y se confirmó mediante la identificación de los genes IMP, SPM, VIM y GIM por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

A la vista de nuestros resultados, se obtuvieron 67 cepas de *Pae* y 33 de ellas resultaron MBLs positivas con una prevalencia del 49.25%, 28 cepas tuvieron dos genes (VIM+GIM), 1 cepa más con dos genes (VIM+SPM), 4 cepas un solo tipo de gen (1-VIM, 1-IMP y 2-SPM) siendo las salas más afectadas Oncología (100%), Medicina Interna (75%), UCIP (60%), UCI (44%) y Pediatría cuyas muestras donde se presentaron mayor número de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBLs fueron en Puntas de Catéter (80%) y Urocultivos (67%).

La presencia de estas carbapenemasas transferibles es importante en *P. aeruginosa*, ya que la frecuencia creciente de cepas clínicas portadoras de carbapenemasas da un punto de vista en la cual se pueden implementar estrategias que faciliten su detección y reduzcan la expansión de estas cepas multirresistentes y de los mecanismos transferibles implicados.

## I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones asociadas a los servicios de salud por diversos microorganismos con amplio perfil de resistencia a los antibióticos constituyen un problema de extraordinaria importancia en el mundo, dado que afectan la calidad y la eficiencia de los servicios médicos. *Pseudomona aeruginosa*, un bacilo Gram negativo ampliamente obicuo ha sido uno de los causantes más importantes en el desarrollo de dichas infecciones, ya que posee la capacidad de adaptarse y desarrollar mecanismos de resistencia tan grandes que ya no queda muchas opciones terapéuticas.

Desde el punto de vista de la OMS/OPS, la resistencia es una característica de estos patógenos causantes de diferentes enfermedades. Por consiguiente, las estrategias de contención deben adaptarse a las necesidades de los programas de control y tratamiento de enfermedades específicas, ya que es un problema de salud pública condicionado por las prácticas asistenciales, y en particular por el uso excesivo de los antimicrobianos en trastornos en los que no aportan beneficios.

Definitivamente, este tipo de infecciones se presentan en pacientes severamente comprometidos, hospitalizados especialmente en unidades de cuidado intensivo, donde existe una alta presión de selección de resistencia por parte de los antibióticos. Estas infecciones nosocomiales tienen implicaciones en el pronóstico del paciente, los costos del tratamiento, la estancia hospitalaria, la morbilidad y la mortalidad. El cual, es importante que en cada institución hospitalaria se mantenga una estrecha vigilancia de los perfiles de resistencia de esta bacteria, con el fin de reconocer dichos mecanismos, su evolución y la forma de transferencia.

En este sentido, un concepto como "la lectura interpretativa del antibiograma y la detección de genes a través de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)" se impone y ayuda al clínico a inferir los posibles mecanismos de resistencia que exhibe la bacteria, de modo que permita orientar el uso de la terapia antibiótica y avanzar en el gran desafío que implica enfrentar las consecuencias de la infección por *Pseudomona aeruginosa*.

## II. ANTECEDENTES

La primera BLEE (SHV-2) fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania en 1983. Desde entonces se ha publicado una gran cantidad de brotes epidémicos de Enterobacterias con BLEE, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo *Klebsiella pneumoniae* la especie más frecuentemente involucrada, cabe señalar que *Pseudomona aeruginosa* se propaga debido a su presencia ampliamente distribuida en la naturaleza, por su alto grado de adaptabilidad fisiológica y los elevados niveles de resistencia que manifiesta frente a numerosos agentes antimicrobianos, siendo este último motivo por el cual se descubre por primera vez en Japón 1991, la primera bacteria productora de MBLs. (Cardoso, O, Figueiredo, A, 2000).

En un estudio realizado por Arthur Little y colaboradores en Estados Unidos en el año 2005 en el Laboratorio Clínico Microbiológico Centralizado destacan que, en las 241 muestras de *Pseudomona aeruginosa* aisladas; el 46% fue productora de MBL según métodos fenotípicos: 107 de las 110 muestras fueron positivas para los genes analizados de MBL blaVIM y blaIMP. (Little, 2005)

En Lima, Perú del año 2008 en un trabajo realizado por Jose Alberto Díaz Tello se colectó 186 cepas de *Pae* resistentes al Imipenem (IMP) y al Meropenem (MEM) o con resistencia Intermedia a los dos antibióticos o a uno de ellos. Utilizando el Método Fenotípico de Doble Difusión en Disco con Monodiscos de EDTA; se llegó a detectar 13 cepas de *P. aeruginosa* positivas para MBLs, correspondiente al 6.99 % de las cepas testadas. (Tello, 2008)

En cuanto a un estudio elaborado en México en el año 2008, Rojas Larios Fallo identificó cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras procedentes de Hospitales de Colima, Durango y Guadalajara donde obtuvo 239 muestras de las cuales el 37% fueron de Guadalajara, 33% de Durango y 30% de Colima. De estas 239 cepas 70 (29%) fueron resistentes a carbapenémicos, y en 40 de ellas se encontraron genes MBLs; 25 cepas que corresponden al 62.5% tuvieron un solo gen (IMP-1, VIM-1, VIM-2), 13 cepas con el 32.5% dos genes (VIM-1 + IMP-2, VIM-1 + VIM-2, IMP-1 + VIM-2, IMP-1 + VIM-1) y 2

cepas con el 5% tres genes (IMP-1 + VIM-1 + VIM-2) con una Sensibilidad y Especificidad del 100%. (Rojas Larios, 2008)

Por lo tanto, en el estudio realizado por Marie Molinen el Hospital de clínicas San Lorenzo de Perú en el año 2013; se lograron detectar de los 232 aislamientos de cepas de éste microorganismo, 30 de ellas dieron sinergia por la técnica de doble disco con EDTA, lo que sugiere la presencia de un método enzimático muy probablemente producción de MBL, por consiguiente, en éste estudio las muestras biológicas de las que se aislaron mayor porcentaje de éste patógeno con MBLs fueron orina (6/18) 33% y secreción traqueal (5/18) 28%, lo que sugiere enfatizar más la búsqueda en dichos materiales. (Molinen, 2013)

Para el año 2013 en un estudio realizado por Edgar Gonzales Escalante y colaboradores en Lima, Perú se pudo notar que la prevalencia de MBL en aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes ceftazidima y con sensibilidad reducida a carbapenémicos resultó ser similar a la de otros estudios realizados en América Latina. En Argentina, dos estudios han señalado frecuencias de 11 y 14%, en ambos casos se aisló la enzima VIM. (Escalante, 2013)

Actualmente *Pseudomona aeruginosa* ha cobrado importancia por su incidencia en infecciones hospitalarias en pacientes inmunosuprimidos, con neumonías, con enfermedades de base, sometidas a tratamiento, con intervenciones quirúrgicas, tratados con procedimientos de instrumentación invasivas. La mortalidad que causa *Pseudomonas aeruginosa* es del 28% al 44%. (OMS/OPS, 2013)

En Nicaragua en el año 2015-2016, en un estudio realizado por Helen Cerda, William Martínez y Gerardo Pérez en el Hospital Alemán Nicaragüense, se lograron detectar 249 cepas de Enterobacterias, 45 de ellas fueron capaces de producir enzimas carbapenemasas. Se utilizó el método la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para conocer los genes de resistencia que poseían las cepas en estudio dando como resultado que en el hospital Alemán Nicaragüense no se encontraron cepas que contengan el gen de tipo KPC, pero si se encontró, la presencia de genes de tipo : IMP con una prevalencia de 18.43%, SPM con 21.06%, VIM con 2.63%, SIM con un 13.15% y genes de tipo Oxacilinasas: OXA 23 con 5.26%, OXA 40 con 21.05%, OXA 51 con 13.16% y OXA 58 con un 5.26% para oxacilinasas. (Cerda Aragón, Martínez, & Pérez, 2016)

### III. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana es un problema alarmante, con repercusiones en la morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados en general y en particular de los que adquieren infecciones nosocomiales, condicionando altos costos para su tratamiento y su control. Debido a su patogenicidad y a la resistencia que presenta hacia los antibióticos, éste microorganismo es una de las bacterias que condiciona más problemas a nivel intrahospitalario.

No obstante, la multirresistencia ha adquirido tal importancia que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha identificado como la quinta posición en amenaza para la salud humana y sus consecuencias generan múltiples campañas para intentar controlar esta situación. La importancia de la multirresistencia radica en que provoca un claro aumento de la morbi-mortalidad de los pacientes tanto en el ámbito hospitalario como ambulatorio y la repercusión en los costos sanitarios es un problema añadido para la salud pública. Al existir tan alto grado de resistencia, se ven limitadas las posibilidades terapéuticas con un déficit claro de antibacterianos efectivos para este microorganismo.

Por lo tanto, éste trabajo representa una importante contribución, no solo para entregar datos muy esenciales en cuanto a fines epidemiológicos se refiere sobre la detección de los genes de resistencia presentes en este patógeno, sino que también permitirán demostrar el método que se utiliza en Nicaragua para la identificación de los genes transferibles, y recalcar el porqué de la importancia de la detección genotípica de las MBLs en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en pacientes atendidos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll y de ésta manera lograr establecer las medidas necesarias de prevención en cuanto a tratamiento de opción terapéutica se refiere.

En este estudio se caracterizaran los genes productores de Metallo- $\beta$ -lactamasa presente en éste microorganismo aislado en pacientes atendidos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll de la Ciudad de Managua. La información generada será de gran utilidad para demostrar los genes y así fundamentar y realizar propuestas para la implementación de medidas de control a mediano y largo plazo para el bienestar de la salud de nuestra comunidad Nicaragüense.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Cómo se detectan los genes que codifican Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhl de la ciudad de Managua, en el período comprendido de Enero a Septiembre del año 2017?

#### **PREGUNTAS DIRECTRICES**

1. ¿Cuál es la prevalencia genotípica de las enzimas Metallo-betalactamasas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Central Cesar Amador Kuhn?
2. ¿Cuáles la frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de Metallo- $\beta$ -lactamasa en los diferentes tipos de muestras?
3. ¿Cuál es la distribución de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de Metallo- $\beta$ -lactamasa por salas médicas en el Hospital Central Cesar Amador Kuhl?
4. ¿Cuál es el método utilizado para identificar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*?

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar los genes que codifican Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll de la ciudad de Managua, en el período comprendido de enero a septiembre del año 2017

### Objetivos específicos

1. Establecer la prevalencia genotípica de las enzimas Metallo- $\beta$ -lactamasas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll.
2. Analizar la frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de Metallo- $\beta$ -lactamasa en los diferentes tipos de muestras.
3. Describir la distribución de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de Metallo- $\beta$ -lactamasa por salas médicas en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll.
4. Identificar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano mediante el sistema Vitek 2 Compact en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

## VI. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Género y especie

Es un bacilo Gram negativo, se encuentra en pares o formando cadenas cortas, aeróbico obligado, mide aproximadamente 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho por 3 a 4  $\mu\text{m}$  de largo, posee un solo flagelo, algunas especies pueden tener hasta 2 a 3. Producen dos pigmentos de importancia clínica: piocianina (azul) y pioverdina (verde fluorescente), algunas cepas pueden producir además los pigmentos piorrubina (rojo oscuro), piomelanina (negro), crece bien a temperaturas entre 37 a 42 ° C y en diferentes medios de cultivo formando colonias lisas o mucosas de color verde o azul, rojo o negro, con olor a uva.

En el año 2000 se logró secuenciar el genoma de una cepa de éste microorganismo aislada de un paciente con Otitis Media fue la Cepa PAO1, teniendo un solo cromosoma circular compuesto por 6.3 millones de pares de bases, dicho secuenciamiento fue hecho por la Fundación para la Fibrosis Quística de la Universidad de Washington y la compañía Patho Génesis, el interés de estas compañías es fundamentalmente clínico ya que el objetivo principal es encontrar nuevos fármacos y otras herramientas para combatir las infecciones humanas, especialmente por *Pseudomonas*.(Alfonso Perez I & Eliana Romero O, 2008)

Presenta dos tipos de plásmidos, Catabólicos y de Resistencia a los antibióticos y metales pesados; los primeros son escasos en *P. aeruginosa*, pero los plásmidos de resistencia son comunes en las especies.

Este patógeno representa un problema importante de salud en centros hospitalarios especialmente cuando se trata de pacientes inmunosuprimidos sobre todo aquellos con cáncer o quemados; pero también puede afectar a pacientes sanos y ocasionar Infección del Tracto Urinario (UTI). Infecciones del tracto respiratorio (Neumonías), septicemia, infección por dispositivos intravasculares, Infección de herida, etc.; en pacientes de la comunidad o del ambiente hospitalario.(Bradley J.S., 1999)

Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no solo daño tisular extenso, sino también interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección por

éste microorganismo tenemos exotoxinas A y S; así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos por lo que su tratamiento es difícil por su resistencia natural.

Existe un grupo poblacional vulnerable a la infección por éste patógeno formado por enfermos de fibrosis quística, en donde coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio y a medida que progresa la infección son cepas mucoide de la bacteria las que se forman y que producen grandes cantidades del exopolisacarido Alginato, entrando de esta forma a la etapa terminal de la enfermedad, debido a que estas cepas no pueden ser eliminadas del pulmón y hasta ahora no existe tratamiento efectivo contra estas cepas mucoides.(Bush K, 2005)

Por otra parte, en ambientes acuosos ésta bacteria se adhiere a las superficies produciendo una serie de agregados llamados Biopelículas; la formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pública, debido a que contaminan dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como, por ejemplo: dispositivos intrauterinos, catéteres, válvulas cardiacas.

De acuerdo a distintas fuentes bibliográficas, *P. aeruginosa*, es responsable del 17% de las neumonías asociadas a asistencia respiratoria mecánica, 11% de infecciones del tracto urinario, y 3.8% de bacteriemias primarias en las unidades de cuidados intensivos de adultos. Sin embargo en las unidades de pacientes quemados, es causa del 21.5% de las neumonías; 20% de las infecciones urinarias y 9% de las bacteriemias primarias.(G. Pagniez, 2006)

#### 6.1.1 Historia:

El papel de *P.aeruginosa* como agente patógeno responsable de infecciones comunitarias y, sobre todo, nosocomiales, está plenamente reconocido. Frecuentemente la elección del antimicrobiano más adecuado para tratar las infecciones que produce es problemático. Ello se debe básicamente a dos factores: elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, lo que conlleva una clara reducción de las posibilidades terapéuticas y la con extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, por lo general mediante mutaciones o adquisición de nuevos genes.

Hay muchos factores que intervienen en el mecanismo de resistencia intrínseca como : la escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de bombas de expulsión, sobre todo MexAB-OprM, con capacidad para expulsar antibióticos Betalactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetoprim, modificación del sitio de unión al antibiótico, modificación de rutas metabólicas internas y producción de enzimas como las metalo-betalactamasa que hidrolizan o degradan a los antibióticos de la serie de los carbapenemes: Imipenem (IMP) y Meropenem (MEM).(Castanheira M, 2006)

*Pseudomonas* literalmente significa «falsa unidad», derivado del griego *pseudo* (falso) y *monas* (una sola unidad), debido a su amplia obicuidad, las *Pseudomonadaceae* fueron observadas en los inicios históricos de la microbiología; sin embargo el nombre genérico de este microorganismo estaba definido en conceptos relativamente vagos en 1894, como bacteria Gram negativa, bacilos con flagelo polar. No obstante, con nuevas metodologías y la aparición de abordajes basados en los estudios de macromoléculas, propiedades de los mismos, y perfiles de resistencias antimicrobianas conservadas entre diversos organismos, han reclasificado a muchas especies.

*P.aeruginosa*, especie descubierta por Schroter en 1872, está clasificada como el patógeno oportunista emergente en la relevancia clínica. (Pitout JDD, 2005), y la especie productora de MBLs se identificó por primera vez en Japón en 1991. Estas cepas MBLs positivas pertenecen a la clase B de *Ambler* y tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de B-lactámicos como penicilinas, cefalosporinas e inclusive carbapenem, último escalón en el tratamiento contra infecciones, sin embargo para poder actuar requieren de zinc y se inhiben por quelantes de metales como el EDTA(RP, 2000)

Los genes responsables de la producción de MBLs forman parte de una estructura integral y se transportan básicamente en plásmidos. Por lo general, las cepas de *P. aeruginosa* productora de MBLs tienen resistencia a diferentes grupos de antibióticos y ésta puede transferirse a distintos tipos de bacterias. Las MBLs adquiridas pueden clasificarse en 5 grupos según la estructura molecular: se las denomina IMP (Imipenemasas), VIM (Verona integron encoded metallo  $\beta$ -lactamase), GIM (German- Imipenemasa), SPM (Sao Paulo metallo  $\beta$ - lactamase) y SIM (Seul- Imipenemasa).

En los últimos años se ha registrado a nivel mundial, especialmente en Europa, Asia, América Latina un notable incremento en el informe de nuevas MBLs y en la diseminación entre microorganismo relacionados e incluso no relacionados. Sin embargo, en el Perú la presencia de estas enzimas hasta la fecha todavía no son detectadas ni reportadas, razón por la cual se propusieron a realizar un estudio en 186 cepas de esta bacteria resistentes o con sensibilidad intermedia tanto al Imipenem como al Meropenem, a fin de detectar la presencia de la enzima Metallo-betalactamasa con una metodología simple, sencilla y económico utilizando monodiscos de EDTA ; en cepas colectadas de pacientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen de Lima –Perú, en el año 2008.

### **6.1.2 Variabilidad Genética**

Contrariamente a lo que ocurre con otras bacterias patógenas, no existen clones de *P. aeruginosa* asociadas con el desarrollo de una enfermedad; por lo que, en una determinada región geográfica se encuentra que la frecuencia con la que se aísla una cepa es la misma si se muestrean hospitales, pacientes con distinto tipo de infecciones o se toman muestras ambientales. Sin embargo existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria aún aislada en la misma región.(Salcedo Posadas, 1998)

La secuencia del genoma de distintas cepas de *P. aeruginosa* varía entre 5 y 7 millones de pares de bases, y comprende un mosaico de genes específicos de la especie que va del 70 al 90% de la secuencia de DNA de una cepa. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad de información accesoria que cada cepa tiene, pero el orden de los genes propios de la especie está conservado entre todos los aislamientos. Estos bloques de DNA se interrumpen por secuencias específicas de cada cepa que pueden ser de entre 1 a 200 kb.

La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria, a excepción del gen *pilA* que codifica para la fimbria tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. De hecho la variabilidad de las secuencias específicas de *P. aeruginosa* es 10 veces menor que la que presentan distintas cepas de *E. coli* o *Salmonella*, lo que sugiere una alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria. La alta frecuencia de recombinación entre las distintas clonas, comparada con la menor tasa de mutación espontánea, mantiene una información genética común a toda la especie.

La alta prevalencia entre cepas de la mayor parte del genoma de *P. aeruginosa*, asociada a la presencia de genes de clon específico, podría explicar la capacidad de esta bacteria de colonizar tan diversos nichos y de utilizar como sustrato una gran variedad de compuesto. En un determinado nicho ecológico toda la población bacteriana puede explotar toda la información genética propia de la especie y, al mismo tiempo, cada clona contiene secuencias propias que son blanco de una acelerada evolución genética.(Maruo, 2005)

## 6.2 Patogenicidad

*Pseudomonas aeruginosa* infecta los pulmones y las vías respiratorias, las vías urinarias, los tejidos, (heridas), y también causa otras sepsis (infecciones generalizadas en el organismo). Puede causar neumonías a grupos, lo que en ocasiones precisa ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los microorganismos más frecuentes aislados en muchos estudios. La piocianina es un factor de virulencia de la bacteria y se ha conocido que puede hasta causar muerte en *C. elegans* por estrés oxidativo.(Miyata, 2004)

Sin embargo, la investigación indica que el ácido salicílico puede inhibir la producción de piocianina. La fibrosis quística también predispuesta a la infección por éste patógeno. Es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua de bebida, así como también de altas fiebres en infecciones.(Rahme, 2000)

Este microorganismo es un patógeno oportunista y posee una virulencia particular. El microorganismo por lo común requiere de una alteración significativa en las líneas de defensa primarias (p. ej., una herida) o una vía para esquivarlas (p. ej., una solución contaminada o una sonda endotraqueal) para iniciar la infección.

La unión a las células epiteliales es el primer paso en la infección y probablemente esté mediada por pilosidades, flagelos y una cubierta de polisacáridos extracelulares. Los receptores incluyen ácido siálico y N-acetilglucosamina que se originan en los glucolípidos de la superficie celular. La unión es favorecida por la pérdida de fibronectina de superficie, lo que explica en parte la propensión en personas debilitadas.

Dentro de las determinantes de patogenicidad que presenta *Pseudomonas aeruginosa* tenemos las siguientes:

**Adhesinas:** Las adhesinas son, por lo general, lectinas (proteínas que tienen afinidad por los azúcares) y su función es la adherencia. En algunos casos, la fimbria posee dos o más adhesinas distintas para dos o más receptores diferentes y se les llama adhesinas fimbriales. Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales.(UNAM, 2014).

Esta bacteria tiene como adhesinas a los Pili, que se adhieren a la superficie epitelial (receptores a GM1) produciendo la liberación de IL-8 y neuraminidasa que a su vez altera al ácido siálico de la superficie celular y facilita nuevos receptores a GM1. Otras adhesinas no pilosas son las hemaglutininas, exotoxinas X, exopolisacárido mucoide y otras, que se adhieren a las mucinas e interaccionan con las células fagocíticas.

**Endotoxinas:** La endotoxina o lipopolisacárido (LPS) corresponde a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. La porción lipídica (lípido A) es la porción tóxica de la molécula, ejerciendo su efecto solamente cuando la bacteria se lisa. La lisis ocurre como resultado del efecto del complejo de ataque a membrana o por el complemento, ingestión y destrucción por fagocitos o la muerte por ciertos tipos de antibióticos.(Rocha García, 2006)

**Citotóxica:** son proteínas que funcionan como reguladores maestros o exhiben funciones celulares vitales. Son enzimas que modifican los blancos eucariotas de manera catalítica, de ahí se debe su alta toxicidad. Las toxinas catalizan reacciones casi irreversibles, cuyo equilibrio favorece la modificación del blanco. Sin embargo, datos recientes indican que la modificación unilateral definitiva de los blancos no responde a los requerimientos de los patógenos. Por lo tanto, algunas bacterias como la *P. aeruginosa* han desarrollado mecanismos para modular de manera reversible las proteínas blanco y funciones de los reguladores eucariontes.

**Exotoxina A:** Es producida por éste patógeno, inhibiendo de esta manera la síntesis de proteínas. La inhibición ocurre por la ADP ribosilación del Factor de elongación 2 y

detiene la elongación durante la producción de las proteínas. Este mecanismo es igual al de la toxina diftérica.(Horii, 2005)

**Proteasas:** Producen necrosis en piel, pulmón, córnea, además de la inactivación proteolítica del interferón gamma humano y del factor de necrosis tumoral (TNF).

**Elastasa:** La elastasa es una enzima encargada de la degradación de las fibras elásticas. En la etapa de invasión a los tejidos, *P. aeruginosa* produce y excreta toxinas que le permiten implantarse como es la elastasa, la cual es una metalo-proteasa que degrada la elastina, el colágeno, IgA, IgG y la fibronectina, para exponer receptores al ataque bacteriano en la mucosa de los pulmones donde interfiere en la función ciliar en infecciones crónicas. Junto con la elastasa, la proteasa alcalina destruye estructuras compuestas por fibrinas y elastina; se reporta que inactiva el interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

**Bacteriocinas:** Son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora. Las colicinas y las microcinas son las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas más reportadas.

### 6.3 Factores de Virulencia

#### 6.3.1 Factores estructurales

**Proteasas:** Las proteasas son importantes enzimas proteolíticas que licuan la gelatina, disuelven la elastina y fibrina, y destruyen el colágeno. Cuando se inyecta en la piel de animales, produce necrosis y lesiones hemorrágicas similares a las de ectima gangrenoso aparecido en las infecciones humanas. Las hemorragias en órganos internos, especialmente pulmones, durante la infección por éste patógeno están probablemente desencadenadas por éstas proteasas (Tillotson JR, Lerner AM., 1968).

**Pigmentos:** Este microorganismo produce una variedad de pigmentos como son la clorafina, piomelanina, piorrubina y piocianina. Estos pigmentos, particularmente las fenacinas, se han implicado en su patogenicidad. Se cree que la piocianina podría suprimir el crecimiento de otras bacterias con lo que facilitaría la colonización.(Hugh R, Gilardi GL, 1974).

**Fosfolipina y glucolípidos:** La Fosfolipina es una sustancia termolábil que libera fosforilcolina a partir de lecitina y puede jugar un papel importante en la patogenia de la neumonía por *Pseudomonas*. Su mecanismo de acción estaría en relación con la destrucción del surfactante pulmonar (cuyo principal componente es la lecitina) dando lugar a la atelectasia. Además, la fosfolipasa de *P. aeruginosa* provoca necrosis en los tejidos pulmonares. El glicolípido de *P. aeruginosa* parece actuar como cofactor de la fosfolipasa por su acción detergente solubilizando los fosfolípidos (Kurioka S, Liu PV, 1967).

### 6.3.2 Factores celulares

**La Pili y el flagelo polar:** la Pili son estructuras que permiten al organismo adherirse a superficies y que además pueden jugar un papel tanto en la conjugación como el actuar como receptores de RNA y DNA de bacteriófagos. Otro potencial factor de virulencia es el flagelo polar de *Pseudomonas aeruginosa* el cual posibilita su movilidad. Estas organelas filamentosas contienen proteínas inmunes específicas. Los anticuerpos contra estas proteínas inhiben la movilidad de la bacteria lo que determina una protección contra las infecciones por *Pseudomonas*.(Dogeth RG, 1995)

**El polisacárido “slime”:** este componente, se localiza en la parte más externa de la célula y está compuesto de polisacáridos, ácido hialurónico, lípidos y proteínas. Parte del slime de cepas obtenidas a partir de niños afectados por fibrosis quística, ha mostrado ser similar al ácido alginico que típicamente se aísla de ciertas algas marinas, por lo cual se considera la amplia toxicidad de este factor por su actividad antifagocítica.

**Endotoxina LPS y lípido A:** Componente que puede tener importancia estructural en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular, así como significado inmunológico, ya que las propiedades endotoxicas de LPS vienen determinadas por el lípido A, debido a las diferencias en su composición, haciendo que la potencia endotoxica de *Pseudomonas aeruginosa* sea menor que los LPS de otros bacilos Gram negativos.(Young, 2000)

En resumen, las estructuras de la superficie bacteriana como son los Pili y el polisacárido capsular o glicocalix (“slime”) parece que son las que posibilitan que *P. aeruginosa* ataque al huésped en cuestión permitiendo por lo tanto la colonización inicial.

Las enzimas extracelulares como son la proteasa alcalina, elastasa, fosfolipasa c, las endotoxinas y la exotoxina A destruyen el tejido infectado facilitando la invasión bacteriana.

Los anticuerpos más protectores se dirigen hacia las porciones lipopolisacaridas de *Pseudomonas aeruginosa* no toxicas y sin función de virulencia “per se”. No obstante, hay algunos datos preliminares que apuntan el hecho de que estos anticuerpos opsonizantes pueden ver aumentada su potencia por la presencia de anticuerpos neutralizantes de toxinas dirigidos hacia el lípido A de la endotoxina, y hacia la exotoxina A.(Pollack, 1990)

#### **6.4 Mecanismos de transmisión**

La vía de infección principal son las exposiciones de tejidos vulnerables, en particular heridas y mucosas, o agua contaminada, así como la contaminación de instrumentos quirúrgicos. Dicho esto, podremos decir que, las maneras en que se transmite *P. aeruginosa* son:

- |                                               |                                         |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| ✚ A pacientes inmunosuprimidos hospitalizados | ✚ Recipientes para lavar a los enfermos |
| ✚ Heridas quirúrgicas                         | ✚ Instrumentos hospitalarios            |
| ✚ Quemaduras                                  | ✚ Catéteres                             |
| ✚ Tubos respiradores                          | ✚ Punción lumbar                        |

#### **6.5 Factores y población de riesgo**

Representa uno de los factores de riesgos más importante en la resistencia de ésta bacteria ya que se da por la existencia de una enfermedad crónica de base, inmunodepresión como pacientes trasplantados y/o neoplasias, enfermedades pulmonares como las bronquiectasias, fibrosis quísticas y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Desde el punto de vista de la patogénesis de la relación entre la colonización por éste patógeno y la disminución de la función pulmonar se ha comprobado que el espacio bronquial en este tipo de pacientes se comporta como un nicho ecológico ideal para la colonización bacteriana por microorganismos potencialmente patógenos.(Murphy TF, 2008). Dentro de estos encontramos:

### 6.5.1      Ámbito Hospitalario

Este representa otro importante factor de riesgo, ya que se da por la realización de procedimientos diagnósticos o terapéuticos. Tanto la ventilación mecánica invasiva como la no invasiva está relacionada con la adquisición de *P. aeruginosa* y neumonía nosocomial multirresistentes, la utilización de sonda nasogástrica y el sondaje vesical con el consecuente daño urotelial es uno de los factores de riesgos más importantes de adquirir infecciones urinarias por gérmenes resistentes; también se encuentra el tiempo de estancia hospitalaria, ya que, en cuanto mayor sea ésta, mayor es la probabilidad de colonización por bacterias resistentes.

De la misma manera, la transmisión cruzada de persona a persona o por la selección de mutantes resistentes secundarias a la presión antibiótica, representan otros factores(Martinez Solano L, 2008)

### 6.5.2      Utilización de tratamiento previo

Es otro importante factor de riesgo independiente en la adquisición de microorganismos multirresistentes, en especial el uso previo de quinolonas, carbapenémicos y todos los Betalactámicos.(Pestaña, 2012)

### 6.5.3      Agente infeccioso

El factor de riesgo relacionado directamente al agente infeccioso, se destaca por los mecanismos de resistencias, la susceptibilidad antibiótica que varían no solo de un área geográfica a otra sino también en diferentes sectores del mismo ambiente hospitalario. Por todo esto, es fundamental conocer todos los factores de riesgos propios de cada centro, los mecanismos de resistencias implicados que determinarían el perfil de antibiograma predominante en cada uno de ellos, para de esa manera guiar al personal sanitario a tomar las medidas más eficaces individualizando las decisiones según las características epidemiológicas de cada hospital.(Diego, 2006)

Aparte de estos importantes factores de riesgos que propician la resistencia antimicrobiana que tiene *Pseudomona aeruginosa*, también se destacan las siguientes:(Alvarez Larran A, 2012)

- + Pacientes con quemaduras.
- + Pacientes tratados con sondas urinarias y diabéticos
- + Pacientes de la tercera edad.

- + Pacientes con fibrosis quística
- + Pacientes con lentes de contacto.
- + Pacientes con diferentes tipos de prótesis.

## 6.6 Inmunología

### 6.1 La barrera epitelial

Las células epiteliales de la piel y membranas mucosas forman la primera línea de defensa contra éste microorganismo. Estas células actúan como barrera mecánica contra la invasión bacteriana; toda causa que produzca una agresión sobre estas células (Ej. Quemaduras, traumatismo) o permita la colonización por ésta bacteria, será motivo predisponente al desarrollo de infecciones en sus diferentes colonizaciones de las células epiteliales del tracto respiratorio.(Strauss, 2000)

### 6.2 Inmunidad humoral

Una vez que las barreras mecánicas han sido alteradas, *P. aeruginosa* puede invadir y causar lesión tanto tisular como en los vasos sanguíneos, por lo tanto las enzimas proteolíticas del organismo contribuyen a esta capacidad de invasión. Existe evidencia de que la producción de anticuerpos frente a componentes de la célula bacteriana así como de las toxinas en el curso de una infección se correlaciona con la supervivencia.(Warden Gutierrez, 2000)

No obstante, la inmunización frente a infecciones por gérmenes Gram negativos, incluyendo este microorganismo, se ha intentado mediante el uso de antígenos glicolipídicos del Core. Estos antígenos consisten en 2-keto-3 deoxioctonato unido al lípido A y se encuentra en Enterobacterias y gérmenes no fermentadores de la lactosa como es *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de anticuerpos frente a este Core glicolipídico se ha asociado con una protección a las secuelas de las bacteriemias por Gram negativos.

### 6.3 Complemento

Este complejo sistema de proteínas séricas es fundamental en la defensa del huésped contra la infección. Las inmunoglobulinas suelen iniciar la activación del complemento ya sea por la vía clásica o la alternativa. Ambas vías pueden jugar un papel en la opsonización

de *P. aeruginosa*, aunque algunas cepas pueden ser opsonizadas por el complemento en ausencia de anticuerpos, estos parecen ser los responsables en iniciar la activación del complemento a su vez opsonizar a la mayoría de cepas.(Holland EJ, 2001)

Se han identificado los factores del suero humano normal que se requieren para la fagocitosis y muerte de este patógeno por parte de los leucocitos polimorfonucleares; es esencial un pro-activador del tercer componente del complemento, la properdina, así como anticuerpos IgG naturales. Si se dispone de IgG “inmune”, se elimina la necesidad de la properdina. Estas observaciones sugieren que 2 mecanismos en la activación del complemento tengan importancia en la fagocitosis de este microorganismo

La fagocitosis de *P. aeruginosa* por parte de los macrófagos de los alveolos pulmonares también parece estar mediada por el sistema del complemento. Los productos bacterianos extracelulares pueden interferir con varios mecanismos de defensa del huésped por su acción sobre el sistema del complemento. Por ejemplo, una de las proteasas de *Pseudomonas aeruginosa*, la elastasa, es muy destructora de varios componentes del complemento e inhibirá la fagocitosis de bacterias opsonizadas por C3.

Por consiguiente, la activación de los componentes finales del sistema del complemento son críticos para la función bactericida del suero. La importancia de la actividad bactericida del suero en la defensa del huésped frente a éste patógeno no está bien definida, ya que los diferentes métodos que se usan para determinar la actividad bactericida del suero pueden dar resultados muy diferentes, y esta variación podría explicar al menos en parte la falta de correlación con la virulencia.(Guttman RM, 1975)

#### 6.4 Inmunidad celular

El papel de la inmunidad celular frente a *P. aeruginosa* ha sido estudiado menos extensamente que otras funciones inmunitarias. Algunos datos sugieren que la inmunidad celular puede ser un importante mecanismo de defensa. Por ejemplo, en pacientes con fibrosis quísticas, la proliferación linfocitaria en respuesta a ésta bacteria está disminuida pero no ante otros estímulos bacterianos o mitógenos de células T. Dado que la cooperación de las células T es esencial para muchas respuestas de la inmunidad humoral, cualquier

disfunción de células T potencialmente puede comprometer el status inmunológico general del huésped.

La inmunidad celular ante éste patógeno puede estar intrínsecamente alterada no solo por una infección concomitante sino también por la propia *Pseudomona*. Si se utiliza la hipersensibilidad de tipo retardado frente a hematíes de carnero y la inmunidad frente a *Listeria* como parámetros para determinar los efectos de *P. aeruginosa* sobre la inmunidad celular en ratones, se comprueba que la infección por *Pseudomonas aeruginosa* produce cambios a los linfocitos T y macrófagos que determinan una supresión celular y una consiguiente depresión de la inmunodepresión celular.(Harvath L, 1976)

### 6.5 Células fagocíticas

La granulocitopenia es uno de los factores predisponentes más importantes para desarrollar infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Además del defecto cuantitativo, los granulocitos pueden presentar alteraciones funcionales como las aparecidas en pacientes leucémicos, o alteraciones resultantes de la interacción con productos bacterianos o factores séricos, por ejemplo, la glicolipoproteína “slime” es toxica para los granulocitos, si bien este efecto es reversible gracias a anticuerpos contra esta sustancia. Es también de interés la observación “in vitro” de fagocitosis anormal en pacientes con fibrosis quística. En pacientes con infecciones crónicas por éste microorganismo se ha demostrado un bloqueo de la actividad bactericida debido a anticuerpos IgG.(Mathews LW, 1973)

### 6.6 Sistema fagocíticas mononuclear

Además, de los neutrófilos, los monocitos y macrófagos juegan un importante papel en la defensa del huésped ante la infección por *Pseudomonas*. Los macrófagos pulmonares son especialmente importantes en los mecanismos de defensa pulmonar.

Experimentos “in vitro” demuestran que se reduce el porcentaje de fagocitosis y muerte intracelular de *Pseudomonas aeruginosa* por macrófagos alveolares de conejo en presencia de suero de pacientes afectados de fibrosis quísticas. No tan solo factores inhibidores del huésped, sino además productos bacterianos pueden afectar a los macrófagos. Por ejemplo, macrófagos periféricos humanos expuestos a exotoxina A presentan evidencia morfológica de muerte celular y una inhibición de la captación de timidina.(Anderson SE Jr, 1978)

## 6.7 Manifestaciones clínicas de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*

Este microorganismo puede causar diversos tipos de infecciones, pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. (Leibovitz A, 2003)

**Algunos de los síntomas de las enfermedades más comunes y conocidas son:** (Zavascki AP, 2006)

- ✚ **Sepsis:** Esta enfermedad puede incluir algunos de estos síntomas, aunque estos solo se producen cuando la bacteria se ha establecido como: Temblores, Escalofríos, Fiebre, Debilidad, Náuseas, Vómitos, Diarrea
- ✚ **Neumonía:** Tos con mucosidad verde o amarillenta, ocasionalmente se presenta esputo con sangre, Fiebre con escalofríos y temblor, Dolor Torácico, Respiración Rápida, Dificultad Respiratoria, Fatiga, Pérdida del Apetito
- ✚ **Endocarditis:** Fatiga, Debilidad, Fiebre, Escalofríos, Sudoración nocturna, Pérdida de peso, Dolores musculares, Soplo cardíaco, Dificultad para respirar con la actividad, Inflamación de pies, piernas o abdomen, Orina con Sangre y Sudoración excesiva
- ✚ **Infecciones Oftálmicas:** Dolor Ocular, Visión Defectuosa, Enrojecimiento del Ojo, Parche blanco en la córnea, Sensibilidad a la Luz (fotofobia), Ojos llorosos, Ardor, picazón, y secreción del ojo.
- ✚ **Otitis:** Dolor persistente del oído, Prurito u otra molestia en el oído o en el conducto auditivo, Drenaje del oído, Pérdida de la audición., Ruidos o Zumbidos en el oído, Fiebre, Escalofrío, Irritabilidad, Indisposición (sensación de enfermedad general), Náuseas, vómitos, Diarrea.
- ✚ **Infecciones óseas y articulares:** No es muy frecuente, pero se producen por 3 mecanismos diferentes: bacteriemia, inoculación directa dentro del hueso y por diseminación contigua desde otro sitio de infección.

## 6.8 Mecanismos y perfil de resistencias

*Pseudomonas aeruginosa* es resistente, tanto de manera natural como adquirida, a un gran número de antibióticos (AB): como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. Esto se debe a las características de su membrana celular que tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad. La resistencia a los antibióticos usualmente activos sucede en el medio hospitalario. Las cepas pueden transmitirse entre ellas el material genético que media la resistencia, incluso a partir de otras bacterias Gram negativas como las enterobacterias.(Miró E, 2004)

Otro factor preocupante es la capacidad de éste patógeno de tornarse resistente en el curso del tratamiento antibiótico. Los mismos antibióticos son capaces de inducir los mecanismos de resistencia que un aislamiento tiene latentes. Otras sustancias como el zinc, componente de una clase de catéteres urinarios, también inducen cambios moleculares que activan la resistencia a Imipenem.

Se ha evidenciado que en 10.2% de los tratamientos para *P. aeruginosa* emerge una cepa resistente que antes del tratamiento era sensible. Esta inducción de resistencia varía dependiendo de cada antibiótico. Por ejemplo, ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación con actividad antipseudomonas, tiene el más bajo riesgo de inducir resistencia en bacterias previamente sensibles a ceftazidima; en contraste, Imipenem presenta la más alta tasa de emergencia de resistencia después del tratamiento.(Poirel L, 2000)

Lo preocupante, son las pocas opciones que quedan para el efectivo tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes. Los antibióticos que se consideran con buena actividad son: las penicilinas antipseudomonas (piperacilina, ticarcilina, carbenicilina, azlocilina) asociadas a inhibidores de b-lactamasas, ceftazidima, cefepime, monobactámicos como aztreonam, carbapenem (Imipenem y Meropenem), quinolonas especialmente ciprofloxacina y aminoglucósidos. Sin embargo, ante el surgimiento de aislamientos multirresistentes a veces es necesario acudir a antibióticos que se consideraban fuera de uso por su alta toxicidad como las polimixinas.

Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de  $\beta$ -lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembrana.(Torres, González, Sanoja, & Calvo, 2005)

#### 6.8.1 $\beta$ – lactamasa

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámicos de los antibióticos, de esta manera destruyen el sitio activo del AB e impiden su actividad. Las  $\beta$ -lactamasas se caracterizan por su capacidad de inhibir determinados subgrupos de  $\beta$ -lactámicos, es por esto que algunas subclasificaciones las denominan, penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas, dependiendo de la familia de  $\beta$ -lactámicos que tenga mayor susceptibilidad a ser atacadas por la enzima.(Yatsuyagani, 2004)

Así mismo, estas enzimas son susceptibles de ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam, aunque no todas son susceptibles ni responden de igual forma a esta inhibición. *Pseudomonas aeruginosa* posee dos clases de  $\beta$ -lactamasas: Amp-C y las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Amp-C, está codificada en el cromosoma de la bacteria y tiene la capacidad de ser inducida por los propios  $\beta$ -lactámicos, especialmente cefalotina y ampicilina. Cuando esto sucede, hay resistencia a penicilinas y cefalosporinas (ceftazidime, cefepime); el grado de resistencia, depende del grado de represión de la Amp-C.

El problema radica en que esta enzima, es inducida en cuestión de días, por tanto, antes del tratamiento, el  $\beta$ -lactámicos parece servir, pero clínicamente el paciente no mejora y se descubre posteriormente la inducción completa de la enzima. Las BLEE son codificadas por plásmidos, se adquieren mediante transporte de DNA extracromosomal y se manifiestan también por resistencia a penicilinas y a cefalosporinas. En enzimas llamadas carbapenemasas se evidencia resistencia a carbapenémicos.

Las  $\beta$ -lactamasas más frecuentemente adquiridas por plásmidos son la PSE-1 y la PSE4. Otras BLEE incluyen la PER-1 que confiere franca resistencia a ceftazidima pero que pierde su poder al adicionar clavulanato. TEM, SHV y OXA, son BLEE que generan resistencia a monobactámicos, penicilinas, cefalosporinas, pero respetan carbapenem.

Existen metalo  $\beta$ -lactamasas que tienen la capacidad de hidrolizar las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas pero no el aztreonam; estas son IMP y VIM recientemente descritas en Japón y Europa.(Marco, 2002)

La resistencia mediada por este mecanismo se debe sospechar ante un antibiograma que revele resistencia a todas las penicilinas y cefalosporinas anti-Pseudomonas. La opción terapéutica en este caso son los carbapenemas, siempre que no se trate de una carbapenemasa.(Ibañez A, 2004)

### 6.8.2 Bombas de Expulsión

Las bombas de expulsión son complejos enzimáticos de membrana, que expulsan de la célula, detergentes y sustancias antipáticas que de otra manera destruirían la bacteria. Antes de la era de los antibióticos, *P. aeruginosa* ya poseía estos complejos enzimáticos. Este complejo llamado MexAB- OprM, se compone de una proteína bomba en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa. Tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración,  $\beta$ lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim. Estos sistemas de expulsión son los responsables de la "impermeabilidad" a la mayoría de los antibióticos.(Yan. J.Y. Hsueh P, 2002)

Las bombas de expulsión, tienen también la capacidad de ser inducidas por antibióticos, especialmente ciprofloxacina, además, los cambios mutacionales, incluso de una sola base nucleotídica en el ADN cromosómico de la bacteria, pueden sobre-expresar estas bombas. La sobreexpresión de MexAB-OprM, compromete la acción de quinolonas, penicilinas, cefalosporinas e incluso Meropenem pero no Imipenem. El sobre-expresión de la bomba, MexEF-OprN, confiere resistencia a quinolonas y algunos  $\beta$ -lactámicos, que incluyen Meropenem e Imipenem.

Ésta última bomba tiene una importante particularidad debido a que su expresión está estrechamente relacionada con el gen Mex T, que también está involucrado en la mutación que origina la pérdida de la porina OprD como se verá más adelante. La sobreexpresión de

MexXY-OprM afecta a los  $\beta$ -lactámicos, las quinolonas, el Meropenem y los aminoglucósidos sin afectar la acción del Imipenem.(Cardoso, 2004)

La resistencia mediada por bombas de expulsión se sospecha por un antibiograma que demuestra resistencia a las penicilinas y cefalosporinas antipseudomonas, que también afecta la susceptibilidad a Meropenem, Imipenem o aminoglucósidos dependiendo de la clase de bomba.(Suárez Carlos José, 2006)

### 6.8.3 Porinas de Membranas

Las porinas son proteínas transmembranales que se ubican en la membrana externa de las bacterias y cumplen diversas funciones. OprD es una porina de membrana presente en *P. aeruginosa*. Su papel primitivo es permitir la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa. Se sabe además, que es capaz de permitir la entrada de carbapenémicos, aunque no de otros  $\beta$ -lactámicos. La afinidad y la capacidad de difusión de Imipenem a través de esta porina son casi 70 veces más altas que la de Meropenem.

El Imipenem tiene la capacidad de seleccionar durante el tratamiento cepas que muestran mutaciones en la porina OprD, que demuestran disminución de la afinidad y el transporte de este antibiótico a través de esta proteína. Estas cepas mutantes muestran un aumento de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para Imipenem, lo que las hace francamente resistentes a este carbapenémicos.(Lee, 2003)

Con respecto a Meropenem, estas cepas mutantes también han demostrado un aumento de la CIM a valores que, si bien no demuestran resistencia, si revelan disminución de la susceptibilidad. La resistencia franca a Meropenem exige dos mecanismos de resistencia ya mencionados: la mutación del gen que codifica la porina OprD y la activación de bombas de expulsión que toman a Meropenem como sustrato. La mutación del gen OprD se sospecha ante una cepa francamente resistente a Imipenem con susceptibilidad reducida o preservada a Meropenem y sin afectar a otros  $\beta$ lactámicos, a menos que estén presentes otros mecanismos de resistencia.

#### 6.8.4 Modificación del sitio de Acción.

El sitio blanco de los carbapenémicos y de todos los B-lactámicos, son proteínas unidoras de proteínas de penicilinas (PUP), macromoléculas que forman parte de la membrana citoplasmática y participan en la síntesis de la pared bacteriana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los  $\beta$ -lactámicos, pero que no afectan su actividad funcional: Aunque la producción de proteínas unidoras de penicilinas con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos no es un mecanismo de resistencia común entre las bacterias Gram negativas, el número de reportes se ha incrementado en los últimos años.(Sánchez, 2004)

#### 6.8.5 Carbapenemasas

Las Carbapenemasas son enzimas que hidrolizan a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas y a los carbapenems; para ser activadas necesitan de un ión metálico; o de un grupo Serino, según la clasificación de Buch, Jacoby y Medeiros se las ubica en el grupo 1, 2, 3 y según Ambler en la clase molecular A, B; C, D, pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico o por ácido etilendiamino tetracético, se les encuentra en bacilos Gram negativos no fermentadores (*Pseudomonas*) y con poca frecuencia en las enterobacterias; a las carbapenemasas se las clasifica en dos grupos: Serino-carbapenemasas y Metallo B-lactamasas.(Ambler R, 1992)

#### 6.8.6 Serino – Carbapenemasa

Necesitan de serina en el sitio activo para ser activadas, son enzimas de clase A, C y D de Ambler, son responsables de la resistencia a carbapenems en enterobacterias y *Acinetobacter* spp., son sensibles al ácido clavulánico y resistentes al aztreonam.

**Las Serino – carbapenemasas clase A, tipo Sme, IMI – 1 y MMC- A:** comparten las siguientes características, poseen mayor capacidad hidrolítica a Imipenem que a Meropenem, confieren resistencia al Aztreonam, pero no a las cefalosporinas de tercera generación, son inhibidas por el ácido clavulánico, se encuentra en los cromosomas, se puede inducir y se ha encontrado en unas pocas cepas de enterobacterias.(Khezam, 2008)

**Las Serino-carbapenemasas del tipo KPC:** fueron descritas recientemente y hasta el momento todos sus genes codificadores se han encontrado en plásmidos, presentan gran habilidad hidrolítica a amino-penicilinas, ureido-penicilinas, aztreonam y a los carbapenémicos y baja actividad hidrolítica a cefalosporinas de tercera generación.

**Las Serino – carbapenemasas del tipo GES – 2:** aparece por sustitución sencilla de aminoácidos de GES – 1 que pertenece al grupo de B- lactamasas de espectro extendido no derivados del TEM o SHV. Con esta sustitución, la GES- 2 se convierte en una carbapenemasa y ha sido reportada en una cepa de *P. aeruginosa* en el África.

**Las carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas):** se han encontrado principalmente en *Acinetobacter baumannii*. El espectro de actividad entre todas las oxacilinasas es bastante similar, puesto que hidrolizan débilmente Imipenem y Meropenem, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam a excepción de OXA 27 todas son penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a oxacilina a excepción de OXA 27 que es resistente. Su actividad como carbapenemasas es pobre, pero ella se incrementa por otros mecanismos de resistencia presentes como: bombas de flujo o disminución en la permeabilidad ocasionada por porinas o modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas.(M & Mandell GL, 2000)

#### 6.8.7 Metal $\beta$ – lactamasa (MBLs)

Las Metalo- $\beta$ -Lactamasas: son enzimas que pertenecen al Grupo 3 según clasificación funcional de Buch Jacoby y Medeiros, y a la Clase Molecular B según Ambler; estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes de zinc, como el ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) y el SMA (mercaptoacetato de sodio), son sensibles al aztreonam. Tienen 2 familias importantes la VIM y la IMP, poseen baja homología en sus aminoácidos (30%), pero tienen propiedades similares, son transferibles, la mayoría se encuentra en genes casetes localizados en integrones tipo 1 y en ocasiones en plásmidos y transposones.

Habitualmente estas enzimas están asociadas con otros genes de resistencia ubicadas en los mismos genes casetes lo cual le permite tener resistencia a múltiples antibióticos como: a los  $\beta$ - lactámicos (eximio, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemes), aminoglucósidos y quinolonas, presentan sensibilidad variable al aztreonam; el grado de resistencia al

Imipenem varia CIM entre 4mg/dl y 128 mg/dl. La resistencia a ceftazidima es de alto grado, con CIM mayor 64 mg/dl. Actualmente se encuentran muy diseminada principalmente en *Pseudomonas* y *Acinetobacter* lo mismo que su distribución es a nivel mundial.(Tato M, 2006)

Las primeras Metallo- $\beta$ -Lactamasas (Metaloenzimas) del tipo IMP -1 fue aislada en el Japón, la cual para el año 1996 estaba desimanada entre bacilos gran negativos por todo el mundo, La metalo-betalactamasa del tipo VIM (clase B) se detectaron en un aislamiento clínico de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en Verona (Italia) en 1997. Se denominaron VIM-1.

Posteriormente se identificaron variantes de esta VIM en Marsella (Francia), Grecia, Corea, Portugal, Japón y diferentes países de América del Sur. En España se descubrieron en el año 2002. Fue una metalo-betalactamasa de tipo VM-2, codificado por un integrón de la clase I de un plásmido, en el año 2004 se detectada la Metallo- B- Lactamasa VIM-3; en el año 2006 se reportó el hallazgo de Metallo- $\beta$ -Lactamasa en América Latina en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* del tipo IMP- 1; a la fecha muchos son los países que reportan los hallazgos de ésta enzima 28 países y 5 continentes (Prats, 2002)

## **6.9 Metaloenzimas transferibles (Genes de Resistencias)**

### **6.9.1 Metaloenzimas tipo IMP (Imipenemasa)**

El origen de los genes blaIMP se ha dado en diferentes áreas geográficas del mundo, así como en diferentes tipos bacterianos, (imagen 5). La primera indicación de metaloenzimas móviles fue con el descubrimiento de la cepa GN17203 de *P. aeruginosa*, en 1988 en Japón. El aislamiento poseía una CMI de 50 ug/ml, así como resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido; a ceftazidima CMI > 400ug/ml. El alelo de resistencia fue encontrado en un plásmido de conjugación transferible, el cual podía ser movilizado entre diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Durante un estudio de peritaje de aislamientos clínicos de *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Pseudomona aeruginosa* y *Alcalígenes spp*, para detectar la presencia de metaloenzimas, se identificaron tres variantes de IMP-1 en Japón, IMP-3, IMP-6 (dada por

la sustitución de una glicina por una serina, lo cual causa una actividad reducida con las penicilinas y una hidrólisis de Meropenem mucho mayor que en Imipenem) e IMP-10.

IMP-12 fue producida por *Pseudomona putida* proveniente de un aislamiento clínico en Verona en el año 2000 y su alelo bla IMP-12 fue localizado en un plásmido no transferible de 50KB. Es altamente divergente de IMP1, posee 36 diferencias aminoacídicas y tiene poca actividad contra penicilina. Por otro lado, el gen bla IMP-13 fue clonado de un espécimen clínico de *Pseudomona aeruginosa* aislado en Roma, el cual tenía 19 aminoácidos diferentes a IMP-1 y estaba codificado cromosómicamente. El alelo bla IMP - 13 fue encontrado más tarde en un plásmido y ha sido asociado con una epidemia de poca importancia en un hospital en el sur de Italia.

#### 6.9.2 Metaloenzimas tipo VIM (Verona Imipenemasa)

El segundo grupo predominante de las metaloenzimas adquiridas son las tipos VIM. La VIM-1 fue descrita primero en Verona, Italia la cual procedía de un aislamiento de *Pseudomona aeruginosa*. Este aislamiento clínico, obtenido en 1997, presentó resistencia a varios  $\beta$ -lactámicos, incluyendo piperacilina, ceftazidima, Imipenem y aztreonam. En particular, la CMI de Imipenem fue  $> 128\mu\text{g/ml}$ . El análisis bioquímico realizado de un extracto crudo de un cultivo de esta cepa reveló una actividad hidrolizadora de carbapenem que fue exhibida por EDTA y la utilización de  $\text{Zn}^{+2}$ . Estas observaciones sugirieron la producción de una metaloenzima.(Bennett, 2000)

El perfil de hidrólisis de VIM-1 analizada de una cepa de *Escherichia coli* recombinante es típico de las enzimas clase B, hidrolizando a la mayoría de  $\beta$ -lactámicos excepto aztreonam. La resistencia a monobactam aztreonam, en el aislamiento original de *Pseudomona aeruginosa*, se cree que se debe a sus mecanismos de resistencia como bombas de expulsión o hiperproducción de cefalosporinasas, al igual que los genes bla IMP-1, los genes bla VIM-1 están integrados en un cassette genético dentro de integrones clase 1.(Laurettil, 2000)

El gen bla VIM-2 fue identificado primero en el sur de Francia de un aislamiento proveniente de *P. aeruginosa* en un hemocultivo de un paciente neutropénico en 1996. Este aislamiento mostró resistencia para la mayoría de  $\beta$ -lactámicos, incluyendo ceftazidima,

cefepime, e Imipenem y susceptible a aztreonam. El VIM-2 está relacionado estrechamente a VIM-1 (90% de identidad aminoacídica) y se encuentra codificado por un cassette genético, en un integrón clase 1 y siendo localizado en un plásmido no conjugativo de 45kb.

VIM-3, ha sido identificada en aislamientos de *P. aeruginosa* en Taiwán. La secuencia aminoacídica de ésta difiere de VIM-2 por dos sustituciones de aminoácidos. El ambiente genético preciso de bla VIM-3 aún se desconoce, no se sabe si su localización es cromosómica.(Kenedith, 2003)

VIM-4 fue reportada en aislamientos de *P.aeruginosa* en Larissa, Grecia. Esta cepa fue recuperada en el 2001 de un paciente que recibía Imipenem. Esta cepa presentó resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos pero aztreonam presentó actividad antibacteriana (CMI de 16ug/ml). VIM-4 difiere de VIM-1 por un simple cambio de un aminoácido (Serina por Arginina) que también difiere entre VIM2 y VIM-3. Asimismo se identificó en Suecia un aislamiento de *P. aeruginosa* productor de VIM-4 el cual es resistente a carbapenem. Este aislamiento proviene de un paciente transferido de Grecia.

El último tipo de  $\beta$ -lactamasa de tipo VIM que fue totalmente caracterizado es VIM-7, la cual se obtuvo de un aislamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenem procedente de Houston, Texas. Este comparte solo un 77% de identidad con VIM-1 y 74% con VIM-2, además constituye un tercer subgrupo entre las  $\beta$ -lactamasa tipo VIM y siendo localizado en un plásmido de 24 Kb e identificado de un aislamiento clínico, presentó resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo aztreonam y a todos los antibióticos disponibles, excepto polimixinas B.(Young M. , 2003)

### 6.9.3 Metaloenzimas tipo SPM-1

Proveniente de Sao Paulo, Brasil, fue analizado en el año de 1997, el cual mostró la presencia de un gen al cual se designó como blaSPM-1 (Sao Paulo, metaloenzima). La cepa, 481997A fue obtenida de un aislamiento proveniente de una muestra de sangre, de una niña de 4 años quien padecía leucemia. El aislamiento mostró ser altamente resistente a todo el estándar anti-gram-negativo, excepto Colistina.(García Toledo, 2008)

La secuencia de SPM-1 difiere significativamente de la de IMP y VIM, debido a la presencia de una inserción de 24 aminoácidos, después del sitio activo. Esta inserción ha mostrado ser muy flexible y actúa como un bucle, aumentando probablemente la hidrólisis de los  $\beta$ -lactámicos. El contexto genético de blaSPM-1 es el único, en ser inmediatamente asociado con una región de elementos y no con transposones o integrones. Estos elementos comunes difieren significativamente en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, colectadas en áreas diferentes de Brasil, aunque los genes blaSPM son idénticos.

#### 6.9.4 Metaloenzimas tipo GIM-1

En el 2002, cinco aislamientos de *P. aeruginosa*, fueron recolectados de diferentes pacientes en un sitio médico en Dusseldorf, Alemania los cuales mostraron que poseían la clase B de  $\beta$ -lactámicos, designada como GIM-1 (German imipenemase). Los cinco aislamientos fueron susceptibles únicamente a polimixinas B, estas cepas fueron comparadas con seis aislamientos susceptibles a carbapenémicos los cuales fueron recolectados al mismo tiempo en Alemania en el mismo sitio médico. (Teran, 2002)

GIM-1 contiene dos iones  $Zn^{2+}$  en el sitio activo sin embargo su mecanismo de hidrolizar los antibacterianos es similar al de IMP-1, pero su valor de  $K_m$  es más alto. Similarmente a la mayoría de metaloenzimas, los genes blaGIM-1 fueron encontrados en la clase 1 de integrones, los cuales se encuentran en pequeños plásmidos (45Kb). Este integrón también posee otros tres genes de resistencia, dos hacia los aminoglucósidos (aacA4 y aadA1) y un gen de resistencia hacia los  $\beta$ -lactámicos (blaOXA-2).

## 7. Métodos Diagnósticos para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

### 7.1.1 Cultivo

Las muestras se cultivan en agar sangre, Mac Conkey o cualquier otro medio diferencial, no fermenta la lactosa siendo fácil su diferenciación de las bacterias que si la fermentan. Este microorganismo produce un olor dulzón semejante a jugo de uvas o de maíz, algunas cepas producen hemólisis, forma colonias redondas, lisas con frecuencia produce un pigmento azulado no fluorescente: piocianina que difunde en el agar, también produce

pioverdina pigmento que confiere un color verdoso al agar, algunas producen pigmento rojo oscuro piorrubina o negro piomelanina

**Agar Mac Conkey:** A las 18 horas de incubación se observan colonias medianas de 2 a 3 mm de diámetro. Algunas veces se puede observar la producción de pigmentos como los anteriormente mencionados. Para ambos casos, tanto *Pseudomonas* como *Burkholderia* presentan colonias translúcidas lactosa negativa.

#### 7.1.2 Identificación microbiana mediante el sistema VITEK 2. (GSusuki, 2012)

VITEK 2 es un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibidoras.

Las tarjetas están selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Cada tarjeta tiene un tubito de transferencia pre-insertado para la inoculación. Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema. Una vez que ha sido debidamente preparada la suspensión, colocada ésta última en la gradilla especial, e insertándole el respectivo cassette, dentro del equipo sucede lo siguiente:

- a) Inoculación: Las muestras son transportadas a una cámara en la que se aplica vacío y en seguida se reintroduce nuevamente el aire, ésta acción hace que la suspensión bacteriana pase a través del tubo de transferencia hacia los microcanales que llenan todos los pozos.
- b) Sellado e incubación de las tarjetas: Las tarjetas inoculadas pasan por un mecanismo que corta los tubos de transferencia y las sella, previo a la carga dentro del carrusel-incubador. Todos los tipos de tarjetas se incuban en línea a  $35.5 \pm 1.0^\circ \text{C}$ .

- c) Lectura de las reacciones: Cada tarjeta es removida del carrusel-incubador cada 15 minutos, transportada al sistema óptico de transmitancia el que usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar las reacciones de turbiedad o el color de los productos metabólicos, y devuelta a su sitio en el carrusel hasta el siguiente tiempo de lectura. Los datos son registrados a intervalos de 15 minutos durante el periodo de incubación total.
- d) Base de datos: están contruidos con un gran número de cepas de microorganismos perfectamente caracterizados y probados bajo varias condiciones de cultivo. Estas cepas provienen de una variedad de fuentes clínicas e industriales, así como de colecciones de cultivo públicas (Ej: ATCC)

### 7.1.3 PCR convencional, multiplex y punto final

La PCR es un método in vitro de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN.

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. (Baumforth K, Nelson P., 1999)

Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN. (Shendure J, Ji H., 2008)

Esta temperatura depende de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante una fórmula, pero generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los

cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde.(Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R., 1993)

## **7.2 Tratamiento (Profilaxis) de *Pseudomonas aeruginosa***

### 7.2.1 Azlocilina

Se trata de una acilureidopenicilina semisintética disponible en la forma de sal sódica. Su capacidad intrínseca supera a la de todas las carboxipenicilinas (ticarcilina, carbenicilina) en más de 8 veces. Es bastante efectiva en el tratamiento de infecciones graves por éste patógeno como sepsis, neumonías o infecciones urinarias; es activa a muchas cepas resistentes a la carbenicilina. Su mecanismo de acción radica en ser bactericida, sin embargo, la acción depende de su capacidad para alcanzar las proteínas que ligan penicilinas localizadas en las membranas citoplasmáticas y unirse a ellas; inhibe además la síntesis de la pared y del septo bacteriano.(Coppens L, Klastersky J, 2000)

### 7.2.2 Gentamicina

La Gentamicina fue el primer antibiótico con actividad importante frente a *P. aeruginosa*; no obstante cuando fue introducida, la mayoría de cepas aisladas eran muy sensibles “in vitro” a la Gentamicina, no así que actualmente han aparecido cepas resistente a éste fármaco. Su mecanismo de acción radica en que al pertenecer a los amino glucósidos, se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la transcripción del DNA bacteriano y, por tanto, la síntesis de proteínas en los microorganismos susceptibles.(Reyes MP, Brown WJ, Lerner AM., 1978)

### 7.2.3 Ceftazidima

Se trata de una cefalosporina de tercera generación con una muy elevada actividad intrínseca frente a la mayoría de cepas de *P. aeruginosa*. Su mecanismo de acción se fundamenta en que, al ser bactericida inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana por preferencialmente la unión a proteínas de unión a penicilina (PBP) específicos que se encuentran dentro de dicha pared. Las PBPs son responsables de varios pasos en la síntesis de la pared celular y se encuentran en cantidades de varios

cientos a varios miles de moléculas por célula bacteriana. En particular, ceftazidima se une preferentemente a la PBP-3 de los gram-negativos

#### 7.2.4 Carbenicilina

El descubrimiento de la actividad antipseudomonica de la carbenicilina supuso un gran avance en el tratamiento de las infecciones por *Pseudomona*, sin embargo, no faltó mucho para que poco tiempo después aparecieran cepas resistentes a este fármaco. Su mecanismo de acción se fundamenta en la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, uniéndose a las PBPs

#### 7.2.5 Ticarcilina

La ticarcilina es una penicilina antipseudomonica que es el doble de actividad “in vitro” ante *P. aeruginosa* en relación a carbenicilina. No obstante, la mayoría de cepas que son resistentes a la carbenicilina lo son también en la ticarcilina. Su mecanismo de acción es similar al de la ticarcilina.

#### 7.2.6 Piperacilina

Se trata de una aminobenzilpenicilina con una cadena lateral que contiene un grupo ureido. Tiene un espectro de actividad antimicrobiana cualitativa pero no cuantitativamente similar a la carbenicilina. Es tan activa o en ocasiones más, que azlocilina frente a *P. aeruginosa*; al igual que el resto de ureidopenicilinas, es frecuente la aparición de resistencias por parte de éste microorganismo debido a un aumento de síntesis de betalactamasas de origen cromosómico.(Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L., 1983)

Piperacilina ha demostrado ser útil en el tratamiento de las infecciones por éste patógeno, pero a pesar de ser superior “in vitro” a carbenicilina o ticarcilina, no ha demostrado una clara superioridad a estos antibióticos en la práctica clínica. Ha sido útil en el tratamiento de exacerbaciones pulmonares de fibrosis quística, si bien la combinación de este antibiótico con un aminoglucósido siempre ha demostrado ser superior a la administración de piperacilina sola, o de lo contrario la aparición de cepas resistentes son muy frecuentes.(Hoogkan-Korstan, Van der Laag J., 2006).

### 7.2.7 Cefsulodina

Es un antibiótico con una alta afinidad por las PBP de *P. aeruginosa* pero que se une muy débilmente a las de otras bacterias, de la misma manera tiene la propiedad de atravesar fácilmente la pared externa de ésta bacteria y la mayoría de betalactamasas cromosómicas no la hidrolizan o lo hacen en muy pequeña cantidad.(Whitecar JP Jr, Luna M, Bodey GP., 1970)

Existen bastantes estudios sobre la eficacia y seguridad de cefsulodina como monoterapia en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* de origen cutáneo, infecciones en quemados, infecciones del tracto urinario, osteomielitis y en infecciones del tracto respiratorio bajo en pacientes con y sin fibrosis quística demostrando en todos los casos una buena tolerancia y una eficacia igual o superior a los otros fármacos utilizados de referencia (normalmente aminoglucósidos)

### 7.2.8 Cefepime

Es un antibiótico del grupo de las cefalosporinas de cuarta generación, desarrollado en 1994. El mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, a la que se une por su alta afinidad con las PBP 3, sin embargo, muestra más actividad frente a cocos Gram-positivos y mientras otras cefalosporinas son degradadas por diversas betalactamasas mediadas por plásmidos y cromosomas, esto no sucede con cefepime. Ésta resulta efectiva sobre cepas productoras de betalactamasas como *Enterobacteriaceae*, responsables de sepsis graves, resistentes a los antibióticos tradicionales, entre el cual figura el patógeno en estudio.

### 7.2.9 Imipenem

Es principalmente bactericida, inhibiendo la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular mediante la unión a determinadas proteínas de unión de las penicilinas (PBPs) que se encuentran dentro de dicha pared. Es activo frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos a excepción de *Enterococcus faecium* y cepas de estafilococos con resistencia variable a meticilina; así como también Gram negativos.

#### 7.2.10 Meropenem:

Inhibe la formación de la pared celular, teniendo lugar en la tercera y cuarta parte de la misma, al unirse a las proteínas ligandos específicos de las penicilinas (PBPs, Penicillin-Binding- Proteins) facilitando la lisis de la bacteria, siendo su efecto bactericida. Sin embargo, se conocen varios mecanismos resistencia a los carbapenems incluyendo Meropenem como la permeabilidad de las membranas en Gram negativas, modificación del sitio de acción y el aumento de la expresión de enzimas carbapenemasas capaces de destruir el antibiótico.

#### 7.2.11 Aztreonam:

A diferencia de las penicilinas y cefalosporinas, este fármaco es un monobactam que contiene un grupo sulfónico que le confiere su actividad, es bactericida inhibiendo el tercer y último paso de la síntesis de la pared bacteriana uniéndose de forma irreversible a las PBPs, principalmente a la PBP-3 responsable del septum durante la división celular

## VII. DISEÑO METODOLOGICO

### **Tipo de estudio**

Se realizó un estudio descriptivo prospectivo de corte transversal, con el objetivo de determinar genóticamente la enzima Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en un grupo de población estudiada y con un tiempo establecido. Se va a medir, evaluar y recolectar datos sobre diversos conceptos, aspectos o componentes del fenómeno a investigar(Sampieri, 2006)

### **Área de estudio**

El área de estudio se ajustó en el Hospital Cesar Amador Kuhll ubicado en el Distrito V de la ciudad de Managua, correspondientes a las áreas médicas: UCI, Cirugía, Pediatría, UCIP, Oncología, Medicina interna de dicho centro médico para ser procesada en los Laboratorios de Biología Molecular y Celular Dr. Elmer Cisneros In Memoriam que ha puesto a disposición el Instituto Politécnico de la Salud (POLISAL), UNAN-Managua.

### **Población de estudio**

#### **Universo:**

El universo se basó en 67 muestras aisladas de los pacientes que presentaron enfermedades nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* identificadas de diferentes procesos infecciosos en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll de la ciudad de Managua, y que corresponden a casos del período comprendido de enero a septiembre del año 2017 del Municipio de Managua, departamento Managua.

#### **Muestra:**

Para seleccionar el tamaño de la muestra se tomaron 33 cepas que se detectaron en el laboratorio con resistencia a Imipenem y Meropenem dando en sus CMI  $\geq 2$ .

El tipo de muestreo es no probabilístico, por conveniencia se analizaron todos los casos positivos de la población en estudio.

**Tipo de muestra:** Secreciones, Urocultivo, Hemocultivo, puntas de catéter y líquidos corporales.

#### **Criterios de inclusión:**

1. Cepas fenotípicamente identificadas mediante la técnica de sinergia con EDTA y que presentan resistencia a Imipenem, Meropenem, Ertapenem.
2. Pacientes diagnosticados con *Pseudomona aeruginosa* en el periodo establecido.
3. Pacientes que estén hospitalizados.

#### **Criterios de exclusión:**

1. Pacientes que tengan diagnósticos previos de *Pseudomona aeruginosa* con sensibilidad a los carbapenem.
2. Ingreso fuera del periodo establecido en la investigación.
3. Pacientes que no se encuentran Hospitalizados.

#### **Procesamiento y análisis de la muestra**

#### **Materiales**

- ❖ Tubos Eppendorf de 500 µl estériles
- ❖ Tubos para PCR estériles
- ❖ Gradillas para tubos Eppendorf de 500 µl
- ❖ Micropipetas para volúmenes de 2, 20 y 200 µl
- ❖ Puntas para micropipetas estériles (diferente capacidad), Palillos estériles y Recipiente con hielo
- ❖ Frasco para desechar puntas sucias de micropipetas
- ❖ Gel de agarosa al 1.5%
- ❖ Lentes de protección contra luz UV
- ❖ Tubos con 3 mL de medio líquido LB-Amp o placa de LB-Amp
- ❖ Marcadores indelebles y Guantes de látex

## **Equipos**

- ❖ Termociclador
- ❖ Transiluminador con UV
- ❖ Cámara de Electroforesis

## **Reactivos**

- ❖ Placa con células transformadas en la práctica anterior (fuente de ADN molde)
- ❖ Amortiguador 10X con Mg<sup>2+</sup> para PCR (amortiguador para enzima Taq)
- ❖ Primers blaIMP (Forward and Reverse)
- ❖ Primers blaSPM (Forward and Reverse)
- ❖ Primers blaVIM (Forward and Reverse)
- ❖ Primers blaGIM (Forward and Reverse)
- ❖ Primers blaSIM (Forward and Reverse)
- ❖ dNTPs
- ❖ Enzima ADN polimerasa Taq
- ❖ Amortiguador de carga para gel de agarosa
- ❖ TBE 10X
- ❖ TBE 1X
- ❖ Bromuro de etidio y Marcador molecular.

## **Procedimiento para el procesamiento de las muestras**

Para la recolección de la información se realizó fichas de recolección de datos de laboratorio y guías de observación en visitas de campo al área de Bacteriología del Laboratorio Clínico del Hospital Central Cesar Amador Kuhll.

El Transporte de las cepas, del Hospital Central Cesar Amador Kuhll al POLISAL, se realizó en agar MacConkey y sellado con parafina, cada muestra con su respectivo código, con el cual fueron procesadas en el hospital, almacenándolas a una temperatura de 37 a 42°C.

## Identificación y susceptibilidad en Vitek 2 Compact

La identificación del género, especie y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el sistema VITEK 2 compact en el Hospital Central Cesar Amador Kuhl. Para la preparación del inóculo, se tomó una UFC de MacConkey de la cepa problema, luego se realizará una suspensión homogénea en un tubo de ensayo conteniendo 3 ml de solución salina al 0.45%, para las tres tarjetas restantes se pasaran 145 µl en tubos con 3 ml de solución salina, posteriormente ajustamos la turbidez en el equipo DensiCheK Plus al del estándar 0.5-0.63 de McFarland, que es con la que trabaja el VITEK 2.

Se procedió a montar en cuatro tarjetas de plástico (GN, AST -XN06, AST- GN69 y AST- XN05), se utilizara una escala McFarland en el tubo madre es decir en el primer tubo donde va la tarjeta de identificación (GN) y del tubo madre se trasega 145 µl a cada uno de los siguientes tubos para cada tarjeta y se procesara en el VITEK, donde cada tarjeta es llenada por el equipo con el inóculo bacteriano estandarizado, mediante una bomba de vacío y luego las tarjetas son selladas herméticamente, se introducen a una incubadora a 35°C y cada 10 minutos el sistema hace una lectura y se mide la concentración del inóculo bacteriano. Cada tarjeta tiene un pozo control positivo de crecimiento y es en este pozo, donde se construye una curva normal de crecimiento bacteriano.

Se utilizaron las siguientes tarjetas:

- ✚ GN: 64 pruebas bioquímicas
- ✚ AST XN06: AN, ATM, CF, CTX, CTT, FOX, CPD, CZX, CXM, DOR, MEM, MXF, NA, NOR, PIP, TE, TIC, TCC, TGC.
- ✚ AST GN69: AMC, AM, SAM, CZ, FEP, CAZ, CRO, CIP, ETP, GM, IPM, LEV, FT, TZP, TM, SXT.
- ✚ AST- XN05: COL

### Control de calidad

- ✚ Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- ✚ Escherichia coli ATCC 25922

## Reaislamiento y extracción de ADN

1. En tubo Eppendorf se miden 100 µl de agua sigma (libre de ADN y sales minerales)
2. De un cultivo fresco de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó un pool de célula
3. Seguidamente se le da vortex para mezclar bien. A continuación, se coloca el tubo en baño maría en ebullición por 10 minutos.
4. Posteriormente se retira la muestra y se deja enfriar en hielo por 5 minutos.
5. Luego se centrifugara a 12000 rpm por 5 minutos.
6. Se extraen 80 µl del sobrenadante en nuevo tubo Eppendorf.
7. Después de la extracción se mide la cantidad de ADN molde en el Nanodrop, siendo esto muy importante para evitar una reacción muy cargada y aparezcan dímeros en la corrida.

## Reacción en cadena de la polimerasa

Para ello se utilizó un Termociclador de PCR, marca Eppendorf AG, Modelo: 22331, Número de serie: 5341-005452, Voltaje: 100-130, Potencia: 800 watt, Frecuencia: 50/60 H. Para la amplificación del ADN molde se utilizó puRe Taq Ready-To-Go PCR beads, la concentración corresponde a Tris- HCl 10 mM, (pH 9.0), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPa 200 µM y de Taq polimerasa 2.5 ul.

## Secuencias de iniciadores y tamaño del producto amplificado

Iniciadores	Secuencias 5'-3'	Gen	Tamaño	Programación del Termociclador
IMPF	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC-3	BlaIMP	188 pb	<b>Desnaturalización</b> 94°C por 5min;;1 ciclo <b>Anillamiento</b> 94°C 30 seg-50°C 30 seg- 72°C 60 seg ; 30-35 ciclos <b>Extensión final:</b> de 72°C por 10 min; 1 ciclo
IMPR	5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3			
VIMF	5'- GATGGTGTTTGGTTCGCATA-3	BlaVIM	390 pb	
VIMR	5'- CGAATGCGCAGCACCAG-3			
SPMF	5'- AAAATCTGGGTACGCAAACG-3	BlaSPM	271 pb	
SPMR	5'- ACATTATCCGCTGAAACAGG-3			
GIMF	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3	BlaGIM	477 pb	
GIMR	5'- AACTTCCAACTTTGCCATGC-3			
SIMF	5'- TACAAGGGATTTCGGCATCG-3	BlaSIM	570 pb	
SIMR	5'- TACAAGGGATTTCGGCATCG-3			

<b>Master Mix</b>	<b>UI por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Buffer 10X</b>	5 µl	
<b>Enhancer</b>	10 µl	
<b>dNTPs</b>	1 µl	0.1 µM
<b>IMPf</b>	1 µl	0.1 µM
<b>IMPr</b>	1 µl	0.1 µM
<b>VIMf</b>	1 µl	0.1 µM
<b>VIMr</b>	1 µl	0.1 µM
<b>SPMf</b>	1 µl	0.1 µM
<b>SPMr</b>	1 µl	0.1 µM
<b>GIMf</b>	1 µl	0.1 µM
<b>GIMr</b>	1 µl	0.1 µM
<b>SIMf</b>	1 µl	0.1 µM
<b>SIMr</b>	1 µl	0.1 µM
<b>Enzima Taq polimerasa</b>	1 µl	
<b>ADN</b>	2 µl	
<b>H2O Sigma</b>	21 µl	
<b>Volumen total</b>	50 µl	

### **Preparación de gel de agarosa al 1.5%**

Se pesó 1.5 gr de agarosa, para luego disolverlo en 100 ml de buffer (TBE 1X); seguidamente y con ayuda de un microondas se procede a calentar la disolución de 3 a 5 minutos aproximadamente. Transcurrido el tiempo, la disolución será colocada a un recipiente que contenga agua para bajar la temperatura hasta un punto que fuese soportable al tacto, para finalmente agregar 2 µl de bromuro de etidio, mezclándose de manera circular.

### **Corrida de Electroforesis**

Se dispenso la disolución de agarosa lentamente en la cámara de corrida por uno de los extremos de la bandeja, se dejara polimerizar, seguidamente se le agregara buffer TBE 1X hasta cubrir el gel, luego se monta el marcador, los controles y las muestras. A continuación se conectaran los electrodos de la cámara a la fuente de poder, graduándose el voltaje a 120 v para la corrida de las muestras, por un periodo de 1 hora y 30 minutos.

Los Genes investigados serán: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM y que, al ser transferidos en el gel se expondrán a luz ultravioleta para determinar el tamaño del producto de amplificación comparándolo con el de los marcadores, según su peso molecular y fotografiados.

### **Control de Calidad Interno**

Los controles utilizados para la validación de la PCR fueron los siguientes:

#### **Controles Positivos:**

-  CP 17-011: IMP, SPM, VIM, SIM
-  CP 17-010: VIM, GIM

#### **Control Negativo:**

-  CN: H<sub>2</sub>O

### **Procedimiento de recolección de datos**

**Método de recolección de datos:** Se solicitó la autorización del Director del Laboratorio clínico Lic. Guadalupe Salinas y Control de resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* del Hospital Central Cesar Amador Kuhll de la ciudad de Managua. Posteriormente se procedió al análisis y procesamiento de las muestras diagnosticadas con *P. aeruginosa* y la revisión de los informes oficiales del sistema de vigilancia epidemiológica de infecciones nosocomiales presentes en la base datos.

#### **Fuente de datos:**

##### **Fuente de recolección secundaria**

Se realizó según la información proporcionada por el Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Hospital Central Cesar Amador Kuhll de Managua, durante el período de estudio.

**Plan de tabulación y análisis:** Para el plan de tabulación y análisis de la recolección de la información se realizó lo siguiente:

- ✚ Para la elaboración del documento se utilizó el programa Microsoft Word 2013.
- ✚ Para la elaboración de tablas y cálculos se utilizó el programa Microsoft Excel 2013.
- ✚ Para la elaboración de la presentación se utilizó el programa Microsoft Power Point 2013.

### **Metodología**

- Para recabar información se realizó:
  - ✚ Base de Datos, según el comportamiento de las infecciones causadas por este microorganismo.
  - ✚ Técnicas normativas como: Pruebas objetivas, es decir protocolos de identificación y confirmación de la cepa en estudio.
  - ✚ Análisis de documentos y producciones: Monografías, Resúmenes, Textos escritos, Informes de Investigación. Etc.
- Para analizar e interpretar la información se utilizó: Análisis de estadísticas oficiales
- Para intervenir en la realidad seleccionada se realizó:
  - ✚ Difusión de las medidas de prevención adecuadas a los destinatarios a través de: Charlas, Afiches y folletos.
  - ✚ Talleres de formación al personal médico de las áreas que se abarcan dentro del estudio.

### **Fondos para Proyectos de Investigación (FPI)**

Este estudio, se realizó con fondos para proyectos de investigación (FPI), de la UNAN-Managua, otorgado al Autor Principal **MsC. Oscar Arbízú Medina** y ejecutado por la Dirección Vice-Rectorado de investigación y posgrado.

## **Aspectos Bioéticos de la Investigación**

Las características de las fuentes de obtención de datos permitieron que no se involucraran pacientes de manera directa. Solo cuando fue necesaria la comunicación con un paciente se usaron datos personales o de identificación por fotografías, videos u otro tipo, por lo que se garantizó el respeto a los principios bioéticas por parte de la investigación.

Se garantizó la utilización de los resultados con fines científicos siendo aprobado el proyecto por parte del comité de ética y de investigación de la institución.

## **Protección de la confidencialidad**

Se les comunico al centro que la información sería utilizada con mucha discrecionalidad y los resultados serían expresados como datos generales más que individuales, en un estudio científico, preservando de esta forma la confidencialidad.

## Operacionalización de las Variables

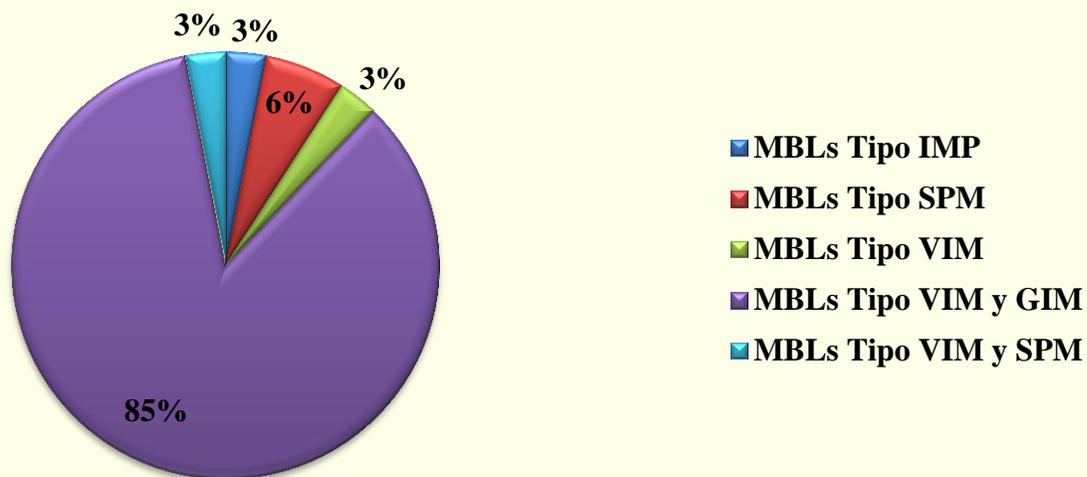
VARIABLE	SUB VARIABLE	INDICADORES	VALOR	CRITERIO	INSTRUMENTO
<b>Objetivo # 1: Establecer la prevalencia genotípica de la enzima Metallo-β-lactamasa en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll.</b>					
<b>Prevalencia genotípica de la enzima Metallo-β-lactamasa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ Metaloenzimas tipo IMP (Imipenemasa)</li> <li>✚ Metaloenzimas tipo SPM-1</li> <li>✚ Metaloenzimas tipo VIM (Verona Imipenemasa)</li> <li>✚ Metaloenzimas tipo GIM-1</li> <li>Metaloenzimas tipo SIM</li> </ul>	<p>Prueba de PCR Convencional</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ IMP 188pb</li> <li>✚ SPM 271pb</li> <li>✚ VIM 390pb</li> <li>✚ GIM 477pb</li> <li>✚ SIM 570pb</li> </ul>	<p>Presencia del gen Ausencia del gen</p>	Ficha de recolección de datos del laboratorio
<b>Objetivo #2: Analizar la frecuencia de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de Metallo-β-lactamasa en los diferentes tipos de muestras.</b>					
<b>Frecuencia de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Tipos de muestras	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ Urocultivo</li> <li>✚ Hemocultivo</li> <li>✚ Punta de Catéter</li> <li>✚ Líquidos corporales</li> <li>✚ Secreciones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ SI</li> <li>✚ NO</li> </ul>		Ficha de recolección de datos del laboratorio
<b>Objetivo #3: Describir la distribución de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de Metallo-β-lactamasa por salas médicas en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll.</b>					
<b>Distribución de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de MBLs</b>	Procedencia de la sala medica	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ UCI</li> <li>✚ Medicina interna</li> <li>✚ INSS</li> <li>✚ Cirugía General</li> <li>✚ Neonato</li> <li>✚ Oncología</li> <li>✚ UCIP</li> <li>✚ Pediatría</li> <li>✚ Medicina General</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ SI</li> <li>✚ NO</li> </ul>		Ficha de recolección de datos del laboratorio

**Objetivo # 4: Identificar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano mediante el sistema Vitek 2 Compact en cepas de Pseudomonas aeruginosa.**

				<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	
<b>Susceptibilidad antimicrobiana presente en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	1) GN 64 Pruebas Bioquímicas 2) AST GN69 3) AST XN06 4) AST- XN05	Piperacilina 100 µg	Sensible Intermedio Resistente	≤16	32-64	≥128	Base de datos y hoja de resultados
		Piperacilina-Tazobactam 30µg		≤16	32- 64	≥128	
		Ceftazidima 30 µg		≤ 8	16	≥ 32	
		Cefepime 30 µg		≤ 8	16	≥ 32	
		Aztreonam 30 µg		≤ 8	16	≥ 32	
		Ticarcilina / Acido Clavulanico 75µg		≤16	32- 64	≥128	
		Ceftolozane - Tazobactam		≤ 4	8	≥ 16	
		Amoxicilina/Acido clavulanico 10 µg		≤ 8	16	≥ 32	
		Colistin		≤ 2	No Existe	≥ 4	
		Gentamicina 10 µg		≤ 4	8	≥ 16	
		Amikacina 30 µg		≤16	32	≥ 64	
		Tobramicina 10 µg		≤ 4	8	≥ 16	
		Ciprofloxacina 5 µg		≤ 1	2	≥ 4	
		Levofloxacina 5 µg		≤ 2	4	≥ 8	
		Ofloxacina 5 µg		≤ 2	4	≥ 8	
		(IMP) Imipenem		≤ 2	4	≥ 8	
		(MEM) Meropenem		≤ 2	4	≥ 8	
Doripenem	≤ 2	4	≥ 8				

## VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

**Gráfico #1. Prevalencia genotípica de la enzima Metallo-β-lactamasa según procedencia de la sala médica en las 67 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll de Enero a Septiembre del año 2017**



**Fuente:** Anexo 2

IMP: Metallo-β-lactamasa tipo Imipenemasa, SPM: Metallo-β-lactamasa tipo Sao Pablo, VIM: Metallo-β-lactamasa tipo Verona Integron encode metalo- β- lactamasa, GIM: Metallo-β-lactamasa tipo German Imipenemasa y SIM: Metallo-β-lactamasa tipo Seoul Imipenemasa.

Del mes de enero a septiembre del año 2017 en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll se recolectaron 67 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de las cuales 33 resultaron MBLs Positiva con una prevalencia de 49.25%.

La detección de los genes productores de MBLs en *Pseudomonas aeruginosa* se determinó con la técnica de PCR-Multiplex en el cual, de los 33 aislamientos, el 85% dieron positivos para los genes VIM+ GIM simultáneamente, luego el 3% portaba el gen IMP, el 6% portaba el gen SPM, el 3% portaba VIM y finalmente un 3% portaba el gen VIM+ SPM simultáneamente. Sin embargo el gen SIM no se logró ser detectado en el estudio y los genes que más prevalecen son VIM+ GIM con una sensibilidad y especificidad del 100%

En cuanto a países de América Latina hay cierta similitud en los resultados; así en el trabajo realizado en Chile del año 2004 en el estudio de Alfonso Pérez y colaboradores se aislaron en forma sucesiva 834 cepas de *Pae* provenientes de muestras clínicas procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile en Santiago. Se encontró que de las 834 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 128 presentaron MBLs con resistencia a Imipenem con una prevalencia de 15.3 %.

En Lima, Perú del año 2008 en un trabajo realizado por Díaz Tello se colectó 186 cepas de *Pae* resistentes al Imipenem (IMP) y al Meropenem (MEM) o con resistencia Intermedia a los dos antibióticos o a uno de ellos. Utilizando el Método Fenotípico de Doble Difusión en Disco con Monodiscos de EDTA; se llegó a detectar 13 cepas de *P. aeruginosa* positivas para MBLs, correspondiente al 6.99 % de las cepas testadas.

En cuanto a un estudio elaborado en México en el año 2008, Rojas Larios Fallo identificó cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras procedentes de Hospitales de Colima, Durango y Guadalajara donde obtuvo 239 muestras de las cuales el 37% fueron de Guadalajara, 33% de Durango y 30% de Colima. De estas 239 cepas 70 (29%) fueron resistentes a carbapenémicos, y en 40 de ellas se encontraron genes MBLs; 25 cepas que corresponden al 62.5% tuvieron un solo gen (IMP-1, VIM-1, VIM-2), 13 cepas con el 32.5% dos genes (VIM-1 + IMP-2, VIM-1 + VIM-2, IMP-1 + VIM-2, IMP-1 + VIM-1) y 2 cepas con el 5% tres genes con una Sensibilidad y Especificidad del 100%.

### **Discusión:**

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno muy importante, por ser causa frecuente de muchas infecciones especialmente nosocomiales, así como por tener una elevada resistencia intrínseca a los antibióticos y una gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, ya sea por mutación o por adquisición de nuevos genes. Desde la aparición de la resistencia, ha adquirido muchos genes transferibles que incrementa la agresividad de las infecciones en los pacientes, llamadas Metallo- $\beta$ -lactamasa que están normalmente localizadas en genes móviles como transposones, plásmidos e integrones, que son movilizados mediante elementos de inserción.

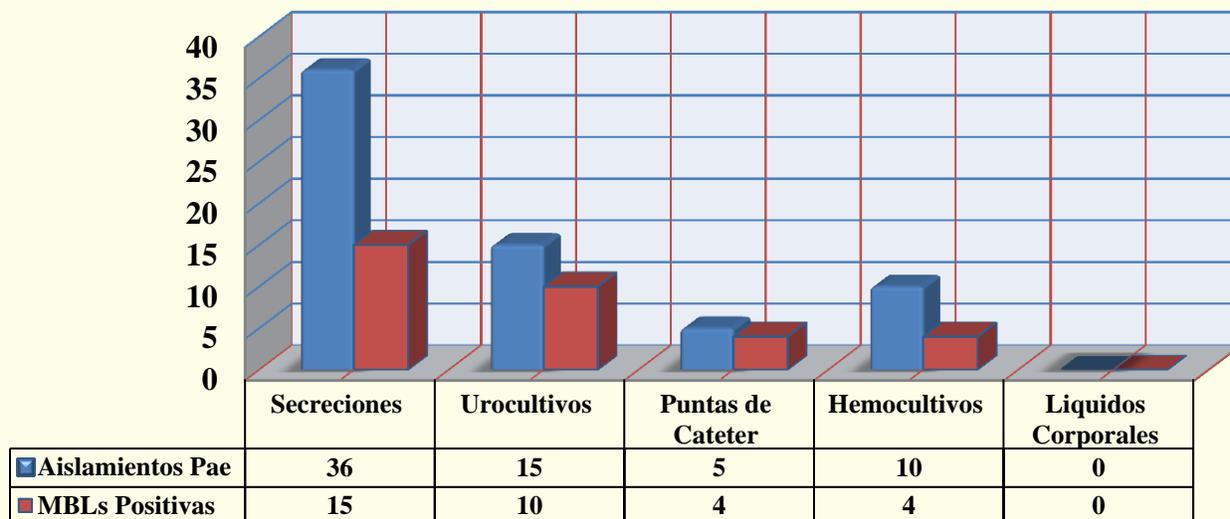
La Detección de MBLs en *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras clínicas constituye un hecho observable en todos los países del mundo, lo cual denota una frecuencia creciente en los últimos años. Un estudio de casos y controles de Japón mostró que los pacientes infectados con cepas productoras de MBLs recibían generalmente múltiples antibióticos. Además, los fallecimientos relacionados con infección por *P. aeruginosa* productora de MBLs fueron más frecuentes en comparación con sujetos infectados por *P. aeruginosa* MBLs negativas.

La aparición de bacterias MBLs en el ámbito hospitalario se asocia con un problema clínico importante, así como a programas de control de infecciones. Por estos motivos se requiere disponer de métodos diagnósticos confiables y precisos la identificación de estas cepas. A la vista de estos resultados, el 100 % de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en las que se detectó las metaloenzimas fueron de pacientes hospitalizados; por lo tanto se conoció de los carbapenémicos que el Meropenem es un buen sustrato para la detección de la MBLs, y que debe siempre usarse acompañado del Imipenem.

La prevalencia de las MBLs responsables de la resistencia a los carbapenem en *Pseudomonas aeruginosa* es diferente en cada región del mundo: el abuso de la administración de los B- lactámicos y de los carbapenem en *Pae* es un factor importante en la generación y selección de organismos multirresistentes, que en el futuro limitará la elección de esquemas terapéuticos para el tratamiento de infecciones agudas.

Finalmente debemos de continuar buscando MBLs en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenem o en aquellas que muestren susceptibilidad antimicrobiana solo a estos antibióticos, especialmente en muestras de orina y de vías respiratorias; se debe comparar y utilizar otros métodos fenotípico como el Método de EDTA, y la recomendada por el CLSI. A fin de mejorar la sensibilidad y tener mayor porcentaje de detección de MBLs. Se recomienda que todas las cepas no susceptibles o resistentes a Imipenem o Meropenem sean evaluadas en forma rutinaria para determinar la posible producción de MBLs mediante el sistema de rastreo con discos con EDTA.

**Grafico #2. Tipos de muestra en los que se aislo *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBLs en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll de Enero a Septiembre del año 2017**



**Fuentes:** Anexo 4

Las muestras Biológicas en los que se aisló con mayor frecuencia *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBLs de enero a septiembre del año 2017 en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll son Secreciones, con 36 muestras, de los cuales 15 resultaron positivos (42%), Urocultivo, 15 muestras, con solo 10 dando positivo (67%), Puntas de Catéter, con 5 aislamientos de los cuales, 4 resultaron positivos (80%), y hemocultivos con 10 muestras, resultando solamente 4 positivos (40%). Por lo tanto las muestras en donde se aislaron con mayor frecuencia *Pseudomona aeruginosa* fueron Puntas de catéter y Urocultivos, teniendo en cuenta el criterio de aceptación de la punta de catéter acompañaba del hemocultivo para verificar que la bacteria estaba en el torrente sanguíneo.

En Lima, Perú del año 2008 en un trabajo realizado por Díaz Tello las muestras biológicas en las que se aislaron *Pseudomonas aeruginosa* productora de MBLs fueron: orina, aspirado bronquial, heridas, secreción, líquidos y sangre, siendo el primero el de mayor aislamiento con el 46.2%, en el Servicio de Medicina-1 se detectó el mayor número de casos con el 30.8 %, seguido de Cardiología 23.07 %, además de UCI, Cirugía Plástica, Cirugía General, Nefrología y Medicina 2.

## Discusión:

Los microorganismos asociados a infecciones nosocomiales pueden proceder de fuentes exógenas o endógenas, por lo tanto la aparición de las infecciones están vinculadas también con el número de manipulaciones a las que está sometido el paciente y una serie de factores de riesgo en relación con la transmisión desde fuentes externas.

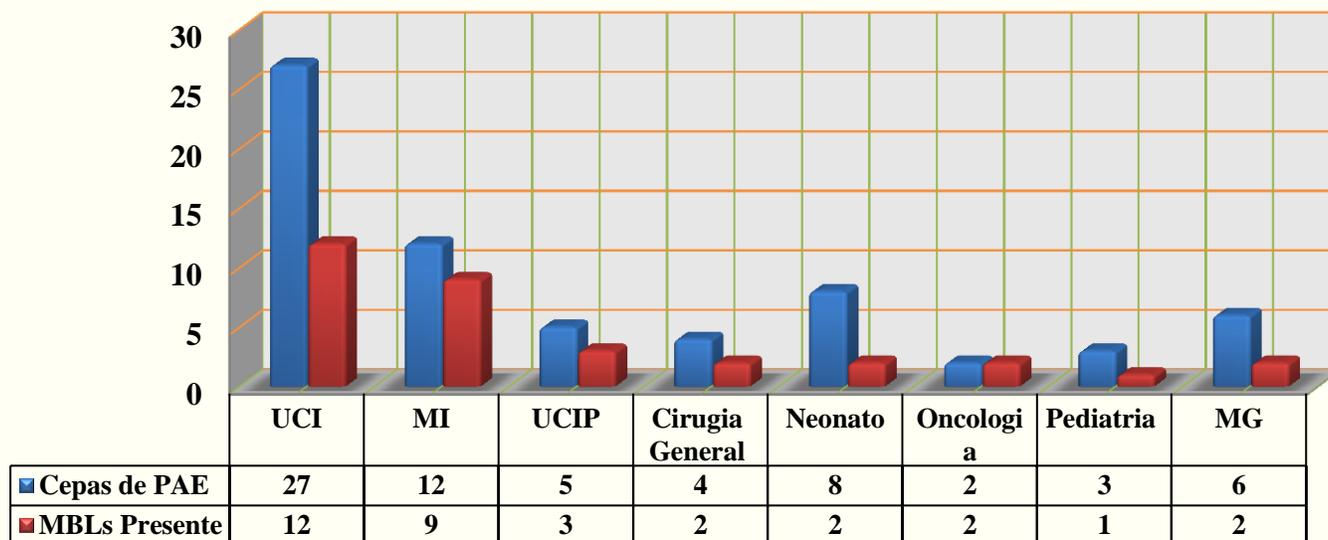
El personal que cuida de los pacientes ha sido implicado como reservorio y vector de brotes, un ejemplo es que la transmisión de *Pseudomonas* a través de sus manos se ha postulado como un mecanismo frecuente en infecciones de este tipo, aunque solo los que atienden a pacientes fuertemente contaminados pueden ser colonizados.

Este microorganismo llega a las instituciones hospitalarias a través del agua del grifo, por los desagües, en suministros líquidos diversos e, incluso, con los ramos de flores, sin contar con las presentes normalmente en la flora de las personas hospitalizadas. Por lo que los hospitales han sido considerados como uno de los principales reservorios de *P. aeruginosa*, que contribuye a su diseminación ambiental y persistencia. La incidencia varía en dependencia de la complejidad de esas instituciones, la más elevada es en grandes hospitales y en aquellos con actividad docente. La sala de ingreso, según sea general o Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), es otro factor vinculado con estas infecciones.

El tiempo de estancia hospitalaria ha sido descrito como un factor determinante para el desarrollo de infecciones nosocomiales, ya que hay relación entre éste y la duración de los factores de riesgo. Así por ejemplo, el paciente geriátrico con estancia hospitalaria prolongada, tiene mayor posibilidad de contraer una infección.

*Pseudomonas aeruginosa* representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer, quemados o a los internos en terapia intensiva. Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por *P. aeruginosa*, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes.

**Gráfico #3. Distribucion de las cepas de Pseudomonas aeruginosa productoras de MBLs segun procedencia de la sala medica en el Hospital Central Cesar Amador Kuhl de Enero a Septiembre del año 2017**



**Fuente:** Anexo 3

UCI: Unidad de Cuidado Intensivo, MI: Medicina Interna, MG: Medicina General, UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos

Del mes de enero a septiembre la distribución de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBLs de acuerdo a las salas médicas en el Hospital Central Cesar Amador Kuhl se vieron afectadas en UCI 27 aislamientos, de los cuales 12 resultaron positivos (44%), en Medicina Interna, 12 aislamientos con 9 positivos (75%), en UCIP, 5 aislamientos con 3 positivos (60%), Cirugía General 4 aislamientos, con 2 positivos (50%), en Neonato, 8 aislamientos con 2 positivos (25%), en Oncología, 2 aislamientos con 2 positivos (100%), en Pediatría, 3 aislamientos con 1 positivo (33%) y en Medicina General, 6 aislamientos con 2 positivos (33%). Por tanto, las salas más afectada con un alto índice de prevalencia Oncología, Medicina Interna, UCIP, UCI y Pediatría.

En cuanto a países de América Latina hay cierta similitud en los resultados; en el trabajo realizado en Buenos Aires, Argentina del año 2006 por G. Pagniez, M Radice y colaboradores encontraron una prevalencia de MBLs en cepas de *Pae* resistentes a los

carbapenémicos de 14 % donde resultaron 18 cepas resistentes de 129 aislamientos de este microorganismo durante ese año en el Hospital "Eva Perón" de la Provincia de Buenos Aires; y éstos fueron recuperados en su mayoría de pacientes internados en la Unidad de Cuidados Intensivos (14/18 aislamientos).

En Chile del año 2004 en el estudio de Alfonso Pérez y colaboradores se aislaron en forma sucesiva 834 cepas de *Pae*, provenientes de muestras clínicas procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile en Santiago. Se encontró que de las 834 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 128 presentaron MBLs con resistencia a Imipenem con una prevalencia de 15.3 %.

En México, en un trabajo doctoral realizado por Rojas Larios, cuyo estudio era descriptivo multicentrico transversal, realizado con cepas de *PAE* procedentes de Hospitales de Colima, Durango y Guadalajara del 2007 a 2008; se obtuvieron 253 cepas, 14 se excluyeron, analizándose un total de 239. El 37% fueron de Guadalajara, 33% de Durango y 30% de Colima, en las cuales 70 cepas con el 29% fueron resistentes a carbapenémicos y en 40 de ellas se encontraron genes MBLs.

En Lima Perú del año 2008, en un trabajo realizado por Díaz Tello se aislaron 186 cepas de *Pae* resistentes al Imipenem (IMP) y al Meropenem (MEM) o con resistencia Intermedia a los dos antibióticos o a uno de ellos. Utilizando el Método Fenotípico de Doble Difusión en Disco con Monodiscos de EDTA; se detectaron 13 cepas de *P. aeruginosa* positivas para MBLs, correspondiente al 6.99 % de las cepas testadas.

Por lo tanto, el 53.8 % de la sinergia (efecto de la Metaloenzimas) se manifestó en el disco de Meropenem, el 30.8 % se manifestó en ambos discos (Imipenem y Meropenem) y solo el 15.4 % se manifestó en el disco de Imipenem; estos hallazgos son similares a los de otros países, lo cual hace inferir que el Meropenem es un buen sustrato para la detección de la MBLs. Y que debe siempre usarse acompañado del Imipenem. En este mismo estudio, los Servicios en donde se encontró *Pae* MBLs más fueron: Medicina 1, con 30.8 % de casos, Cardiología con: 23.8%, UCI con 15.4 % y Cirugía 2, Cirugía Plástica, Nefrología y Medicina 2 con 7.6%.

## **Discusión:**

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de gran trascendencia económica y social, además de ser un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable. Ellas son de importancia clínica y epidemiológica porque condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad e inciden en los años de vida potencialmente perdidos de la población que afectan, a lo cual se suma el incremento en los costos de atención.

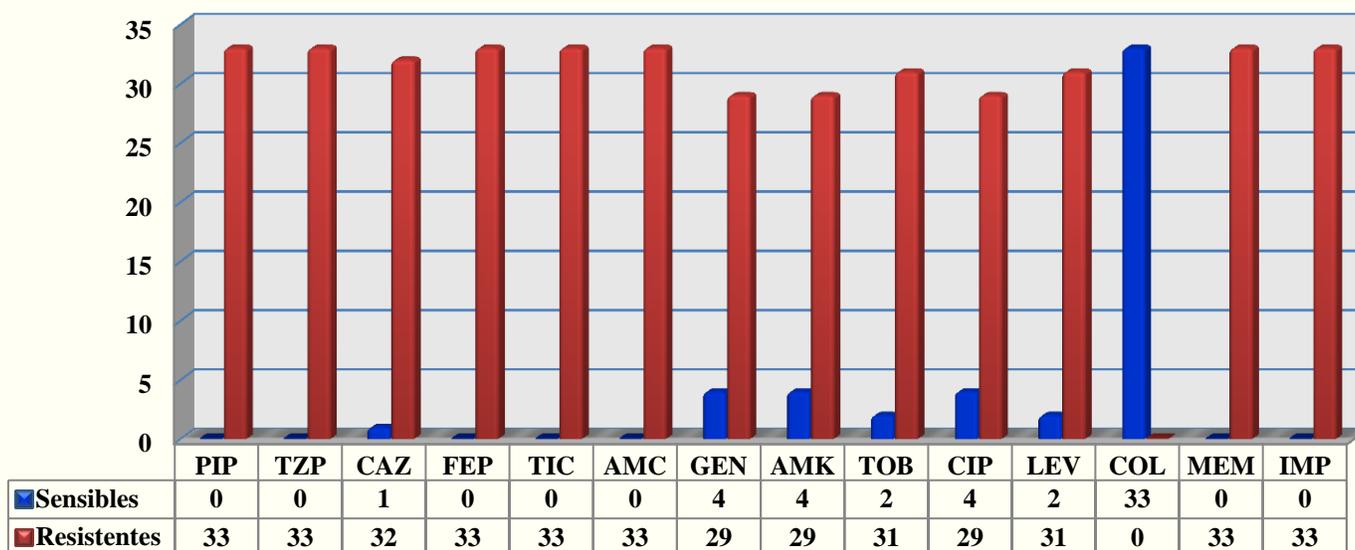
En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, que es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, por su alto grado de adaptabilidad fisiológica y los elevados niveles de resistencia que manifiesta frente a numerosos agentes antimicrobianos. Constituye, por estas razones, uno de los patógenos nosocomiales más frecuentes y es reconocida como un gran problema de salud al nivel mundial.

Las sepsis adquiridas por este patógeno en instituciones de salud se observan con mayor frecuencia en servicios donde ingresan pacientes con severas enfermedades de base y los procedimientos terapéuticos son más agresivos, afectan áreas como las salas quirúrgicas, de inmunocomprometidos, y las UCI. Se plantea que del 5-10 % de los pacientes que ingresan a una UCI adquieren una infección nosocomial, porque aquí se trata a gran número de pacientes con diversos factores de riesgo asociados. También las salas de quemados muestran una alta incidencia, ya que las quemaduras pueden experimentar infiltración intensa por microorganismos y actuar como foco para bacteriemia subsiguiente, una complicación con frecuencia letal.

Las áreas con más riesgo de desarrollar infecciones nosocomiales en los hospitales pediátricos son precisamente las UCI pediátricos y las UCI neonatales; así mismo, se consideran las unidades donde se atienden a pacientes con neutropenia grave, las áreas quirúrgicas y todas aquellas donde se practican métodos de diagnóstico y tratamiento invasivos.

*P. aeruginosa* es la segunda causa más común de sepsis en las UCI. La mayoría de los brotes de neumonías causados por este patógeno están asociados a la estancia en estas áreas, en un menor porcentaje se asocian a bacteriemias relacionadas con procedimientos endoscópicos y en un número reducido se han asociado con infecciones quirúrgicas.

**Gráfico #4. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante el sistema Vitek 2 Compact en cepas de Pseudomonas aeruginosa de Enero a Septiembre del año 2017**



**Fuente:** Anexo 5.

PIP: Piperacilina, TZP: Piperacilina/Tazobactam, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, TIC: Ticarcilina/Clavulanico, AMC: Amoxicilina/Acido Clavulanico, GEN: Gentamicina, AMK: Amikacina, TOB: Tobramicina, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, COL: Colistin, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem.

La sensibilidad antimicrobiana se determinó mediante el sistema VITEK 2 compact, donde se encontró que los 33 aislamientos con MBLs positivas según las Normas CLSI 2016-2017 de Enero a Septiembre del año 2017, son tantos resistentes como sensibles, en el caso de las Penicilinas: Piperacilina, en donde 33 (100%) fue resistente, , seguidamente con  $\beta$ -lactámicos combinados se tienen: Piperacilina/tazobactam con 33 (100%) resistentes, Ticarcilina/Clavulanico con 33 (100%) resistente, y Amoxicilina/Acido Clavulanico con 15 usos donde el 100% resulto resistentes.

En el caso de las Cefalosporinas tenemos: Ceftazidima, con 32 (97%) resistentes y 1 (3%) sensibles; otra cefalosporina utilizada fue Cefepime donde 33 (100%) dieron resistentes. Por otro lado, en el Lipopeptido Colistin, 33 muestras (100%) resultaron sensibles.

De la misma manera, en ciertos antibióticos Aminoglucósidos dieron los resultados siguientes: Gentamicina, con 29 muestras (88%) resistentes y 4 (12%) sensibles, Amikacina con 29 (88%) resistentes y 4 (12%) sensibles, Tobramicina con 31 (94%) resistente y 2 (6%) sensibles.

En caso de las fluoroquinolonas se tiene a Ciprofloxacina con 29 muestras (88%) resistentes y 4 (12%) sensibles; Levofloxacina con 31 (94%) resistentes y 2 (6%) sensibles.

Con los carbapenémicos Meropenem, Imipenem y Doripenem, dieron como resultado 33 muestras (100%) resistentes, sin embargo el Intermedio se cataloga como resistente según las normas CLSI 2016- 2017. Cabe destacar, que de las 33 muestras resultaron con Carbapenemasa tipo MBLs Positivas, y que todas estas resultaron ser resistente en la mayoría de todos los antibióticos a excepción de Colistin.

En cuanto a estudios realizado en México y América Latina, son similares al nuestro como lo es con el trabajo realizado por Rojas Larios Fallo en México en muestras procedentes de Hospitales de Durango, Colima y Guadalajara en el año 2007 a 2008, donde se detectó en sus patrones de susceptibilidad antimicrobiana una mayor resistencia a las Cefalosporina con un 83%, Carbapenémicos con el 25% y Aminoglucósidos con 30%; cuyos antibióticos utilizados fueron: Amikacina, Aztreonam, Cefepime, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Imipenem, Meropenem, Piperacilina mas Tazobactam y Ticarcilina/Acido Clavulanico.

### **Discusión:**

La sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos es variante, debido a la aparición de resistencias y la posterior selección de las cepas que las expresan, Esta resistencia puede ser originada por factores tales como la incapacidad del antibiótico para atravesar la pared celular, la capacidad del microorganismo de expulsar el antibiótico, la alteración de la diana específica para el antibiótico o la hiperproducción de enzimas inactivadoras.

La resistencia a los antibióticos puede ser también innata a todos los miembros de una especie. *Pseudomona aeruginosa* es un patógeno con resistencia intrínseca debido a dos mecanismos secundarios como lo son la existencia de  $\beta$ - lactamasas (como la AmpC

cromosómica), las cuales pueden contribuir a la resistencia intrínseca de este microorganismo a los  $\beta$ -lactámicos, y los sistemas de E-flujo, siendo los más importantes el sistema MexAB-OprM y MexXY-OprM, que es expresado de manera constitutiva en cepas de tipo salvaje y que juega un papel muy importante en la resistencia intrínseca a muchos  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, carbapenémicos y Lipopeptidos (Colistin).

La aparición de nuevos antimicrobianos ha hecho aumentar el grado de resistencia de esta especie a los antibióticos. Es atribuible a una mutación cromosómica, a la expresión inducida por un gen latente o por el intercambio del material genético a través de estructuras génicas móviles como los plásmidos, los transposones y los integrones.

Los factores de riesgo que contribuyen a que la resistencia sea dada como tal, están relacionadas con la ventilación mecánica como la no invasiva y neumonía nosocomial por la adquisición de este patógeno multirresistentes, la utilización de sonda nasogástrica y sonda vesical que propicien infecciones urinarias. De la misma manera la estancia hospitalaria propicia la probabilidad resistente secundaria a la presión antibiótica, así como también el uso indiscriminado de los antibióticos a la hora de que un paciente ingrese de emergencia al hospital.

Con todo lo mencionado anteriormente, se debe recalcar que las opciones terapéuticas se están agotando a consecuencia del desarrollo de cepas multirresistentes a los mismos, lo cual ha conllevado a la utilización de diversos antibióticos que anteriormente habían sido excluidos de la terapia antimicrobiana por sus grandes efectos tóxicos. Uno de estos antibióticos es el Lipopeptido Colistin, el cual ha contribuido de cierta manera en la terapia en pacientes con infecciones por *Pseudomona aeruginosa*, no obstante debido a su toxicidad, solo debe ser administrado por concentración mínima inhibitoria (CIM).

## IX. CONCLUSIONES

La prevalencia genotípica de la enzima Metallo- $\beta$ -lactamasa en 67 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, en el mes de Enero a Septiembre del año 2017 en el Hospital Central Cesar Amador Kuhll que se identificó fue de 49.25% correspondiente a 33 aislamientos de PAE con MBLs positivas, determinándose por la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa multiplex, de modo que de los 33 aislamientos de PAE con MBLs, prevalecen los genes VIM + GIM en un 85%. Seguidamente se tienen los genes SPM con 6%, IMP CON 3%, VIM+ SPM con el 3% y VIM con 3% correspondientes al 100%.

El tipo de muestra en el que se tiene la mayor frecuencia de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBLs en el período estudiado son Puntas de Catéter, con 5 aislamientos, pero 4 resultaron positivos (80%), Urocultivo, 15 muestras, con 10 dando positivo (67%), Secreciones, con 36 muestras, pero 15 resultaron positivos (42%) y hemocultivos con 10 muestras, resultando solamente 4 positivos (40%). Por lo tanto las muestras en donde se aislaron con mayor frecuencia *Pseudomonas aeruginosa* fueron Puntas de catéter y Urocultivos.

La distribución de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBLs de acuerdo a las salas médicas en el Hospital en estudio, se vieron afectadas en Oncología, 2 aislamientos con 2 positivos (100%), Medicina Interna, 12 aislamiento 9 positivos (75%) UCIP, 5 aislamientos dando 3 positivos (60%), Cirugía General, 4 aislamiento, con 2 positivos (50%), UCI, 27 aislamiento, con 12 positivos (44%), Pediatría, 3 aislamientos con 1 positivo (33%), Medicina General, 6 aislamiento con 2 positivos (33%), Neonato, 8 aislamientos 2 positivos (25%). Por tanto, las salas más afectada con un alto índice de prevalencia Oncología, Medicina Interna, UCIP, UCI y Pediatría.

La identificación del perfil de susceptibilidad antimicrobiano que se determinó mediante el sistema Vitek 2 Compact en las 67 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* durante el periodo y lugar de estudio, demostró que la mayoría de los antibióticos utilizados resultaron con un alto porcentaje de resistencia, afectando a los  $\beta$ -lactámicos, Aminoglucósidos y Fluoroquinolonas por ser cepas panresistentes. Mientras que colistín se utilizó solo para 34 casos, los cuales dieron sensibles en un 100% de ellos.

## X. RECOMENDACIONES

### Al comité de prevención de infecciones nosocomiales del Hospital

- ✚ Examinar y evaluar el significado epidemiológico de los casos nuevos de infección registrados, tanto en pacientes, instrumentos quirúrgico o de la toma de muestra como en empleados.
- ✚ Calcular y determinar el significado de las tasas de ataque correspondientes a la aparición de nuevos casos de infección durante un período de una semana o un mes.
- ✚ Elaborar, recomendar y ayudar en la aplicación de política hospitalaria en cuestiones pertinentes como:
  - 1) Métodos para la investigación y el control de fuentes, y vías de transmisión de infecciones.
  - 2) Indicaciones para el aislamiento de pacientes, con designación de los locales que se han de utilizar y métodos que deberían de emplear en la atención de esos enfermos.
  - 3) Indicaciones y métodos para la investigación bacteriológica del personal del hospital y del medio hospitalario en relación con un brote concreto.
  - 4) Procedimientos para mantener un adecuado saneamiento del medio.
- ✚ Revisar y evaluar periódicamente las instrucciones y prácticas actuales del personal en la prevención y el control de las infecciones en los diversos departamentos del hospital.
- ✚ Recomendar que el hospital adquiera, utilice en sus programas de instrucción y facilite al personal información sobre la prevención y el control de las infecciones en los hospitales.

### Al hospital

- ✚ Evitar el uso de antibióticos de amplio espectro, antes de saber los resultados de laboratorio para evitar el reforzamiento en resistencia bacteriana.
- ✚ Campañas para evitar la automedicación con antibióticos, promover el chequeo médico y prevenir así la resistencia de las bacterias a estos medicamentos.
- ✚ Correcta distribución, control y contacto con los pacientes, aislando en dependencias separadas a aquellos que tengan ya establecidas infección intrahospitalarias.
- ✚ Desinfección adecuada de los equipos médicos o maquinas a utilizar para la intervención a los pacientes o soportes vitales.

- ✚ Limpieza y desinfección constante en las distintas salas en las que se encuentren los pacientes inmunocomprometidos.
- ✚ Cumplir medidas de Bioseguridad constante para proteger a los pacientes contra la exposición a las enfermedades infecciosas mediante técnicas adecuadas de lavado de manos, utilización correcta de batas, guantes y mascarillas.
- ✚ Realizar procedimientos y horarios estrictos que estimulen al personal médico y laboratorista a seguir las técnicas de asepsia prescritas, ya que debe ser constantemente reforzada mediante inspección y cumplimiento de las normas del Hospital.
- ✚ Control estricto de los procedimientos permanentes que se realiza sobre el paciente, como: la farmacoterapia, catéteres venosos y entubaciones endotraqueales,
- ✚ Asegurar que todo el personal, departamentos y servicios que puedan intervenir en el cuidado del paciente tengan un conocimiento claro de sus funciones y responsabilidades en la prevención de la transmisión de la infección.

### **A la comunidad**

- ✚ Promover información para instruir a las personas de la importancia que tiene el buen uso de los antibióticos.
- ✚ Hacer concientización sobre los cambios que van adquiriendo las bacterias y su comportamiento según el estado del paciente, de modo que sean factibles la búsqueda de opciones terapéuticas más eficaces.

### **A la Universidad**

- ✚ Mejorar la adquisición de documentos sobre la importancia que tiene la resistencia de esta bacteria a los antibióticos y la afectación que esta pueda tener en la actualidad.
- ✚ Promover los estudios a nivel molecular de las cepas bacterianas multirresistentes y poder otorgar mayor información y mejores soluciones a infecciones con estos patógenos.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso Perez I, P. G., & Eliana Romero O, L. P. (2008). Presencia de Metallo B-lactamasa en *P. aeruginosa* resistente al Imipenem. *Revista Médica Chilena* , pp: 136 : 423 - 432- 423 - 432.
2. Alvarez Larran A, A. E. (2012). *Evolución de la adquisición nosocomial de Pseudomonas aeruginosa multirresistente durante los años 2008-2012 en el servicio de Hematología del Hospital del Mar. LIV reunión nacional de la SEHH y XXVIII Congreso Nacional de la SETH.*Salamanca, España : McGrawhill.
3. Ambler R, C. A. (1992). A standard numbering scheme for the class a  $\beta$ -lactamases. *Biochem J. Revista Clinica Española*, pp: 276: 269 - 72. .
4. Anderson SE Jr, P. M. (1978). Toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A for Human macrophages . *Rev Infect Immunol*, pp 19: 1092-1096.
5. Baumforth K, Nelson P. (1999). *The polymerase Chain Reaction. Mol Pathol.*
6. Bennett, P. (2000). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Revista Antimicrob Chemother*, pp 43:1-4.
7. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. (1983). *Infections caused by Pseudomona aeruginosa.* (Vol. 5).
8. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. (1983). *Infections caused by Pseudomona aeruginosa.*
9. Bodey GP, Whitecar JP Jr, Middleman E, Rodriguez V. (2002). *Carbenicillin therapy for pseudomonas infections.* JAMA.
10. Bradley J.S., G. J. (1999). Carbapenemas in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Inter J Antimicrob Ag. Revista Médica Peruana* , pp: 93-100.
11. Bush K, J. G. (2005). A functional classification scheme for  $\beta$ lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother. Revista Medica Chilena* , pp. 39: 1211-33.
12. Cardoso, O, Figueiredo, A. (2000). Metallo – B- Lactamase VIM 2 In Clinical isolates of *Pseudomona aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist. Revista clinica Japonesa*, pp : 93 - 97.
13. Cardoso, O. L. (2004). Metallo – B- Lactamase VIM 2 In Clinical isolates of *Pseudomona aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist . Revista Medica Portugues*, pp : 93 - 97.

14. Castanheira M, T. M. (2006). Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1 encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother. Publicacion Mensual Adventure Works*, pp: 48: 4654-61.
15. Coppens L, Klastersky J. (2000). *Comparative study of anti-pseudomonas activity of azlocillin, mezlocillin and ticarcillin.* (15 ed.). *Antimicrob Ag Chemoter.*
16. Crespo M P, W. N. (2005). Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Revista J Clin Microbiol*, pp 42: 5094-101.
17. Diego, P. (2006). The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Revista clinical infects*, pp 43:S43-8.
18. Dogeth RG, H. G. (1995). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in patients with chronic illness. *Rev Lancet* , pp 1: 236-237.
19. Eduardo, C. (2012). *Determinación de la Susceptibilidad de Pseudomonas aeruginosa comparando dos métodos: MicroScam versus dilución en Disco Kirby Bauer- Hospital Guillermo Almenara.* Lima, Peru : Publicaciones Adventure Works.
20. G. Pagniez, M. R. (2006). *Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenemas en un Hospital Universitario de Buenos Aires .* Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Rev. Argent. Microbiol. v.38 n.1.
21. García Toledo, F. (2008). Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in Vitro. *Revista Chilena de Infecciones Bacterianas* , pp 19:96-100.
22. González, M. (2000). Determinación de Factores de Riesgo Intrahospitalario en un Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en la sala de CIREN, Hospital Universitario del Valle, Cali Colombia Médica. *Publicacion mensual Abventure Works*, 31:3-14.
23. Gorman SP, M. J. (2001). The concomitant development of poly (vinyl chloride) related biofilm and antimicrobial resistance in relation to ventilator-associated pneumonia. *Rev of the Biomaterials* , pp 22:2741–2747.
24. GSusuki. (28 de Septiembre de 2012). *IDENTIFICACIÓN MICROBIANA MEDIANTE EL SISTEMA VITEK 2 DE BIOMÉRIEUX.* Obtenido de <http://www.youtube.com/watch?v=1bVIcY30YU0>
25. Guttman RM, W. B. (1975). Bacterial blocking activity of apecific IgG in chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection . *Rev Clin Exp Immunol*, pp 19: 121-130.

26. Harvath L, A. B. (1976). Evaluation of tipe-specific and non-tipe-specific *Pseudomonas aeruginosa* vaccine for treatment of *Pseudomonas* sepsis during granulocytopenia. *Revista Infect Inmun* , pp 13: 1139-1143.
27. Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. (1993). *Kynetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions*. Bio Tecnology.
28. Holland EJ, L. A. (2001). Demostration of neutrophil dysfunction in the serum of patients with cystic fibrosis . *Rev J Clinical Lab Immunol*, pp 6: 137-139.
29. Hoogkan-Korstan, Van der Laag J. (2006). *Piperacillin and tobramycin in the treatment of Pseudomonas lung infections in cystic fibrosis*. *J Antimicrob Chemother*.
30. Horii, T. M. (2005). La liberación de la exotoxina A, peptidoglicano y endotoxinas después de la exposición de clínica *Pseudomonas aeruginosa* aísla a los carbapenémicos in vitro. . *Revista Clinica Chilena*, pp (5): 15-20.
31. Hugh R, Gilardi GL. (1974). *Manual of clinical microbiology* (1 ed.). (S. E. Lennette EH, Ed.) Washington D, EE.UU.
32. Ibañez A, F. Y. (2004). *Incidencia y Mecanismos de Resistencia de Pseudomonas aeruginosa a Carbapenemas*. *Hospital Materno Infantil de Malaga – España*. . Malaga, España: McGrawhill.
33. Jadas, C. (2 de Agosto de 2009). *Microbiology Pseudomas* . Recuperado el 15 de Octubre de 2016, de <http://microbiologymed.blogspot.com/2009/02/pseudomonas-pseudomonas-aeruginosa-es.html>
34. Jawetz, M. y. (2005). *Microbiologia Medica* . Manual Moderno .
35. Kenedith, L. (2003). VIM-and IMP type betalactamasas producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp in Korean Hospitals. *Microbiol Rev* , pp 9:235239.
36. Khezam, Y. V. (2008). Caracterización Genotípica de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* . *Revista Medica Venezolana* , pp: 276: 269 - 75.
37. Kurioka S, Liu PV. (1967). *Effect of the hemoysin of Pseudomonas aeruginosa on phosphatides and on phospholipase activity* (93 ed.). Bacteriol.
38. Lauretti, L. (2000). cloning and characterization of bla VIM, a new integronborne metallo - $\beta$ -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. . *Antimicrob Ag Chemother Rev*, pp 43:1584-1590.

39. Lee, K. L. (2003). Evaluation of the Hodge teste and the Imipenem EDTA. Double disk synergy test for differentiating Metalle – B- Lactamse- producind isolates of Pseudomona spp and Acinetobacter spp *J. Clinical Microbiol*, pp: 41: 4623 – 4629.
40. Leibovitz A, P. G. (2003). Pathogenic colonization of the oral flora in frail elderly patients fed. *Rev Gerontol Biol Sci Med Sci*, pp 58A: 52-55.
41. Liu PV, Yaoshil S, Hsieh H. (1973). *Exotoxinas of Pseudomonas aeruginosa* (128 ed.). (J. i. Dis, Ed.)
42. M, P., & Mandell GL, B. J. (2000). Pseudomonas aeruginosa. Bogota, Colombia: Ed. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Filadelfia, (PA): Churchill Livingstone.
43. Marco, J. V. (2002). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gram negativos no fermentadores - Enferm Infecc Microbiol Clin. *Publicacion Adventure Works*, pp: 20:304-12.
44. Martinez Solano L, M. F. (2008). Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease. Clin infect DIS. *Revista clinical adventure works*, pp 47(12): 1526-33.
45. Martinez-Martinez L, P. A. (2000). *Effect of three plastic catheters on survival and growth of Pseudomonas aeruginosa*. Lima, Peru : Publicaciones Adventure Works.
46. Maruo, k. P. (2005). La inhibición de la necrosis tumoral por factor-alfa-inducida RANTES La secreción de la proteasa alcalina en células A549. *Revista Americana de la célula respiratoria y Biología Molecular.* , pp (2): 35-50.
47. Mathews LW, K. M. (1973). Selective inhibition of phagocytic activity of rabbit alveolar macrophages by cystic fibrosis cerum. *Am Rev Respir Dis*, pp 108: 777-783.
48. Mercado Máximo, M. V. (2005). 2005)Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos para el estudio de criterios que parean la interpretación del antibiograma. *Rev. Española de Quimioterapia*, pp 13: 73-78.
49. Miró E, N. F. (2004). Carbapenemasas en Pseudomonas aeruginosa: seguimiento epidemiológico desde 1996. XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Bilbao, Comunicacion* , p. 157.
50. Miyata, S. M. (2004). Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Revista clinica de Infectologia* , pp 71:2404-2413.

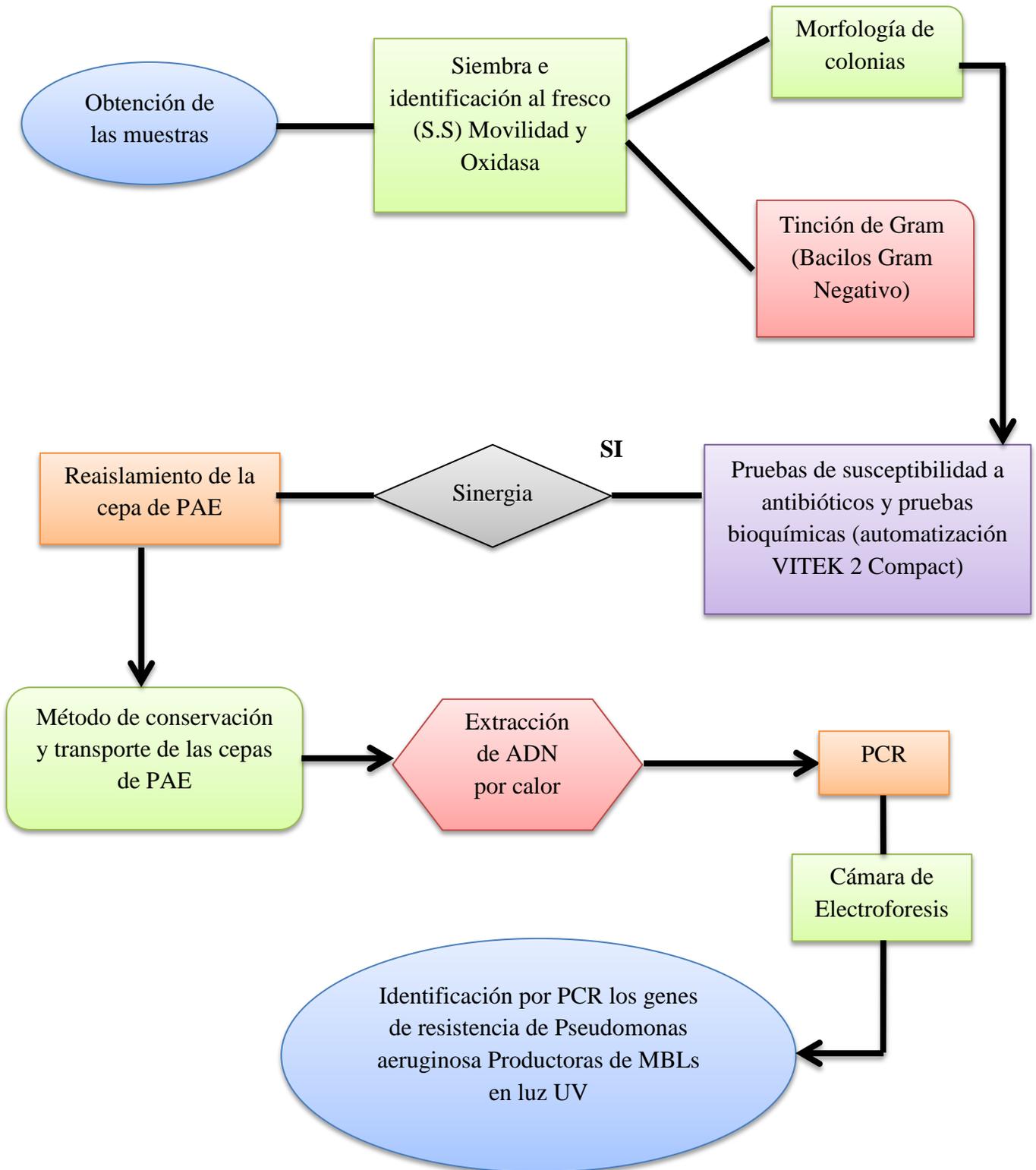
51. Murphy TF, B. A. (2008). Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med. Revista Adventure works clinical*, pp 177(8): 853-60.
52. Norman Rojas, E. S. (2006). *Bacteriología Diagnostica*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología.
53. Ortega B, G. A. (2004). Endemic multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in critically ill patients. *Revista Infect Control Hosp Epidemiol*, pp 25: 825-31.
54. Pagniez G, R. M. (2006). Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en Pseudomonas aeruginosa resistentes a los carbapenemas en un hospital universitario de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina : Revista Argentina de Microbiología .
55. Pestaña, M. (2012). *Caracterización de mecanismos de resistencia de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa no sensible a carbapenémicos y factores de riesgos a su adquisición*. . Chile : Tesis Doctoral. Universidad de Navarra.
56. Pitout JDD, G. D. (2005). colaboradores-Detection of Pseudomonas aeruginosa Producing Metallo-Beta-Lactamases in a Large Centralized Laboratory-Journal of Clinical Microbiology . *Revista Clinica de Microbiologia* , pp: 43(7):3129-3135.
57. Poirel L, N. T. (2000). Characterization of VIM-2, a Carbapenemasa hydrolyzing metallo  $\beta$ - lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother. Revista Medica Colombiana* , pp: 44:891-97.39. .
58. Pollack, M. (1990). The virulence of Pseudomonas aeruginosa . *Rev Infects Dis* , pp 6: 617-625.
59. Prats, G. M. (2002). First isolation of Carbapenm Hydrolyzing beta- lactamasa in Pseudomona aeruginosa in Spain Antimicrob agentes Chemother. *Revista Española de Microbiologia*, pp: 46 : 932 – 933.
60. Rahme, L. G.-W. (2000). Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp 94:13245-13250.
61. Reyes MP, Brown WJ, Lerner AM. (1978). *Treatment of patients with pseudomonas endocarditis wirh high dose aminoglycosine and carbenicillin therapy*. .
62. Rocha García, R. d. (2006). *Mecanismos de Patogenicidad e Interacción Parásito-Hospedero II*. Puebla, Mexico : Dirección de Fomento Editorial. .
63. Rodriguez, T. (2005). Metallo- $\beta$ -Lactamases: the quiet before the Storm? *Clin Microbol Rev*, pp 18:306-325.

64. RP, A. (2000). The structure of beta-lactamases – Philosophical transactions of the Royal society of London: Series B. Biological sciences . *Sciences Biology* , pp: 289 - 321 - 33.
65. Salcedo Posadas, A. &. (1998). *Fibrosis Quística*. Madrid, España : Ediciones Díaz de Santos S.A. .
66. Sampieri, R. H. (2006). *Metodología de la Investigacion* . Distrito Federal, Mexico : McGraw-Hill Cuarta Edicion .
67. Sánchez, S. S. (2004). Resistencia a los Carbapenemas por metaloenzimas en aislamientos clónicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Española de Quimioterapia*, volumen 17 (Nº): 336 – 340.
68. Setia U, Gross PA. (1977). *Bacteremia in a community hospital. Spectrum and mortality*. Arch Intern Med.
69. Shendure J, Ji H. (2008). *Next-generation DNA sequencing*. Nature Biotechnology.
70. Strauss, A. (2000). Therapeutic neutrophil transfusions: are controlled studies no longer appropriate? *Revista Medica Am J*, pp 65: 1001-1006.
71. Suárez Carlos José, K. N. (2006). *Mecanismos de resistencia en P. aeruginosa, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su Prevención y Control*. Infecto. Lima, Peru: McGrawhill.
72. Tato M, V. A. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de PER-1 en España. . *Revista Española de Enferm Infecc Microbiol Clin*, Pp: 24(7): 472.
73. Tenover FC, A. R. (2007). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Rev J Clin Microbiol*, pp 35: 2602–2605.
74. Teran, W. (2002). Evaluation of a new E test for detecting metallo- $\beta$ -lactamase in routine clinical testing. *Clin Microbiol Rev*, pp 40:1236-1238.
75. Tillotson JR, Lerner AM. (1968). *Characteristics of nonbacteremic pseudomonas pneumonia*. (68 ed.). Ann Intern Med.
76. Torres, L., González, A., Sanoja, Y., & Calvo, A. (2005). *Detección fenotípica de metalo B-lactamasas en bacilos Gram negativos resistentes a Carbapenemas*, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela : Caracas Venezuela -XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. .

77. UNAM, U. N. (14 de Febrero de 2014). *Determinantes de Patogenicidad de Pseudomonas aeruginosa*. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>
78. Valenti WM, T. R. (1978). Factors predisposing to oropharyngeal colonization with gram-negative bacilli in the aged . *Rev N Engl J Med*, pp 298: 1108–1111.
79. Villegas MV, C. A. (2004). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Rev Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, pp 49: 217–222.
80. Warden Gutierrez, M. M. (2000). Evakuition of leukocyte chemotaxis in vitro in thermally injured patients. *Revista clinica de investigaiones* , pp 54: 1001-1004.
81. Whitecar JP Jr, Luna M, Bodey GP. (1970). *Pseudomonas bacteremia in patients with malignant diseases*. *AM J Med Sci*.
82. Woods DE, Sokol PA. (1985). *Use of transposon mutants to assess the role of exoenzyme S in chronic pulmonary disease due to Pseudomonas aeruginosa* (4 ed.). (E. J. Microbiol, Ed.)
83. Yan. J.Y. Hsueh P, Y. W. (2002). Metallo- B- Lactamasa in Clinical Pseudomona Isolates in Taiwan VIM – 3<sup>a</sup> novel variant of the VIN- 2, enzyme antimicrob agentes Chemother. *Revista Clinica Europea*, pp : 45, 2224 – 2228 .
84. Yatsuyagani, J. S. (2004). Class Integron Containg Metallo –B- Lactamasa gene bla VIM 2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain isolated in Japan. . *Antimicrob Agents Chemother*, pp: 48: 626 – 628.
85. Young. (2000). Human inmunity to *Pseudomonas aeruginosa* II Relationship between heat-stable opsonins and type-specific lipopolysaccharides. *Rev Infect*, pp 126: 277-287. 287.
86. Young, M. (2003). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of Metallo b-lactamas producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. . *Clin Microbiol Rev* , pp 26:54-58.
87. Zavascki AP, B. A. (2006). Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in two tertiary care teaching hospitals. . *Rev Antimicrob. Chemother.*, pp 58: 882-885.

# ANEXOS

# ANEXO 1 ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *P.AERUGINOSA*



**Anexo 2 Genes Productores de Metallo- $\beta$ -lactamasa en cepas de PAE**

Genes productores de Metallo- $\beta$ -lactamasa en Pseudomonas aeruginosa		
Metallo- $\beta$ -lactamasa	Peso Molecular	Resultados
Metaloenzimas tipo IMP	188 pb	1
Metaloenzimas tipo SPM-1	271 pb	2
Metaloenzimas tipo VIM	390 pb	1
Metaloenzimas tipo VIM-GIM	390 pb y 477 pb	28
Metaloenzimas tipo GIM-1	477 pb	0
Metaloenzimas tipo VIM-SPM	390 pb y 271 pb	1
Metaloenzimas tipo SIM	570 pb	0
<b>Total</b>		<b>33</b>

*Fuente: Resultados de Laboratorio de Biología Molecular Dr. Elmer Cisneros In Memoriam del POLISAL.*

**Anexo 3 Procedencia de salas donde está presente PAE**

Procedencia de la sala medica donde está presente Pseudomonas aeruginosa		
Procedencia de la Sala	# de Aislamiento de PAE	MBLs Presente
UCI	27	12
Medicina Interna	12	9
Cirugía General	4	2
Neonato	8	2
Oncología	2	2
Pediatría	3	1
Medicina General	6	2
UCIP	5	3
<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>33</b>

*Fuente: Hoja de Resultados del Laboratorio Clínico del Hospital Central Cesar Amador Kuhll*

**Anexo 4 Tipos de Muestras donde se aisló PAE**

Tipos de Muestra en los que se aisló Pseudomonas aeruginosa	
Hemocultivos	10
Urocultivos	15
Líquidos Corporales	1
Puntas de Catéter	5
Secreciones	36

*Fuente: Hoja de Resultados del Laboratorio Clínico del Hospital Central Cesar Amador Kuhll*

**Anexo 5 Susceptibilidad Antimicrobiana de los Antipseudomonicos**

<b>Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>			
<b>ATB Antipseudomonicos</b>	<b>Sensibles</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistentes</b>
Piperacilina 100 µg	0%	0%	100% (33)
Piperacilina-tazobactam 30 µg	0%	0%	100% (33)
Ceftazidima 30 µg	3% (1)	0%	97% (32)
Cefepime 30 µg	0%	0%	100% (33)
Aztreonam 30 µg	-	-	-
Ticarcilina / Acido Clavulanico 75µg	0%	0%	100% (33)
Ceftolozane - Tazobactam	-	-	-
Amoxicilina/Acido clavulanico 10 µg	0%	0%	100% (33)
Gentamicina 10 µg	12% (4)	0%	88% (29)
Amikacina 30 µg	12% (4)	0%	88% (29)
Tobramicina 10 µg	6% (2)	0%	94% (31)
Ciprofloxacina 5 µg	12% (4)	0%	88% (29)
Levofloxacina 5 µg	6% (2)	0%	94% (31)
Ofloxacina 5 µg	-	-	-
Colistin	100% (33)	No Existe	-
Imipenem	0%	0%	100% (33)
Meropenem	0%	0%	100% (33)
Doripenem	0%	0%	100% (33)

**Fuente:** Hoja de Resultados del Laboratorio Clínico del Hospital Central Cesar Amador Kuhll

**Anexo 6 Base de Datos de PCR *Pseudomonas aeruginosa* Metallo-β-lactamasa**

<b>Resultados de PCR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Metallo-β-lactamasa</b>				
<b>Numero Muestra</b>	<b>Código de Cepa</b>	<b>Fecha Recepción</b>	<b>Diagnostico</b>	<b>Resultado PCR</b>
17 – 010	851 – 1	19 – 01 – 17	Pediatría Aspirado Traqueal	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 012	647 – 1	19 – 01 – 17	UCI Cultv. Escara Región Sacra	<b>MBL (VIM)</b>
17 – 013	2180	19 – 01 – 17	Medicina Interna CVC	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 014	10120	19 – 01 – 17	Medicina Interna Urocultivo	<b>MBL (VIM , GIM)</b>

17 – 015	815	19 – 01 – 17	UCI-Pediátrica Aspirado Traqueal	<b>MBL (Negativo)</b>
17 – 016	11123	19 – 01- 17	Medicina Intensiva- UCI Adulto Urocultivo	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 020	869	19 – 01 – 17	Medicina Interna Cultv. Escara Región Sacra	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 021	11263	19 – 01 – 17	UCI-Pediátrica Urocultivo	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 022	40 Sec	19 – 01 – 17	Medicina Interna Región Pectoral derecho	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 033	126 – 1	17 – 03 – 17	Aspirado traqueal Neonato	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 034	60 – 1	17 – 03 – 17	UCI Adulto	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 035	136 – 1	17 – 03 – 17	Medicina interna	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 036	120 – 1	17 – 03 – 17	UCI	<b>MBL (IMP)</b>
17 – 037	21 – 1	17 – 03 – 17	Medicina General	<b>MBL (SPM)</b>
17 – 038	95 – 1	17 – 03 – 17	Neonatología Aspirado traqueal Neonato	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 039	1345 – 1	17 – 03 – 17	Medicina Intensiva- UCI	<b>MBL (Negativo)</b>
17 – 041	13 – 1	17 – 03 – 17	Punta de Catéter UCIP	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 053B	430 – 1	29 – 08 – 17	INSS II	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 054B	451 – 1	29 – 08 – 17	Cirugía	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
<b>17 – 055</b>	<b>5065 – 1</b>	<b>29 – 08 – 17</b>	<b>Medicina Interna Urocultivo</b>	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 056	488 – 1	29 – 08 – 17	Medicina Intensiva- UCI Secreción	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 057 <sup>a</sup>	434 – 1	29 – 08 – 17	Oncología Secreción	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 058	1603 – 1	29 – 08 – 17	Medicina Intensiva- UCI	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 – 059	1604	29 – 08 – 17	Oncología	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
<b>17 – 060</b>	<b>1600 – 1</b>	<b>29 – 08 – 17</b>	<b>Medicina Interna y Cirugía General</b>	<b>MBL (VIM , SPM)</b>
17 – 061	415 – 1	29 – 08 – 17	Medicina Interna Secreción	<b>MBL (VIM , GIM)</b>

17 - 062	414	29 - 08 - 17	Cirugía General Secreción	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 - 063	1324	29 - 08 - 17	Medicina General Hemocultivo	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 - 064	1330	29 - 08 - 17	Medicina Intensiva- UCI Punta de Catéter	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 - 066 <sup>a</sup>	1382	29 - 08 - 17	Medicina Interna Hemocultivo	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 - 067	55	29 - 08 - 17	Medicina Intensiva- UCI Punta de Catéter	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 - 068	60	29 - 08 - 17	UCI Punta de Catéter	<b>MBL (VIM , GIM)</b>
17 - 069 <sup>a</sup>	1456	29 - 08 - 17	UCI	<b>MBL (VIM , GIM)</b>

*Fuente: Resultados de Laboratorio de Biología Molecular Dr. Elmer Cisneros In Memoriam del POLISAL.*

**Anexo 7 Lectura en Nanodrop para el Control de Extracción**

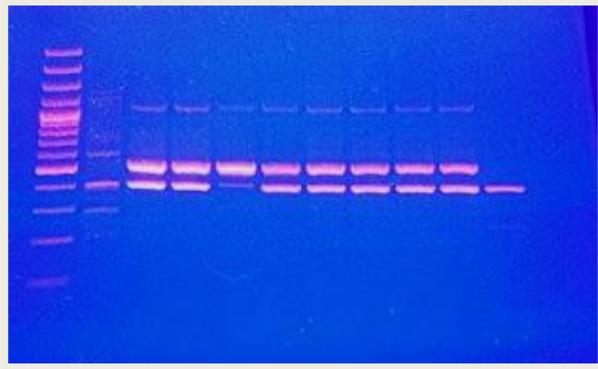
Control de Extracción – Lectura en el Nanodrop 2017				
Fecha Extracción	Código Muestra	Tipo de Extracción	Absorbancias	Concentración (ng/μl)
20 - 01 - 17	17 - 010	ADNds	1.9	347.3
20 - 01 - 17	17 - 012	ADNds	1.89	213.0
20 - 01 - 17	17 - 013	ADNds	1.87	201.6
20 - 01 - 17	17 - 014	ADNds	1.87	353.0
20 - 01 - 17	17 - 015	ADNds	1.94	485.2
20 - 01 - 17	17 - 016	ADNds	1.93	669.5
20 - 01 - 17	17 - 020	ADNds	1.9	315.2
20 - 01 - 17	17 - 021	ADNds	1.9	710.7
20 - 01 - 17	17 - 022	ADNds	1.8	282.5
22 - 03 - 17	17 - 033	ADNds	1.9	519.0
22 - 03 - 17	17 - 034	ADNds	1.9	645.2
22 - 03 - 17	17 - 035	ADNds	1.9	613.9
22 - 03 - 17	17 - 036	ADNds	1.9	457.3
22 - 03 - 17	17 - 037	ADNds	1.72	363.4

22 - 03 - 17	17 - 038	ADNds	1.9	576.6
22 - 03 - 17	17 - 039	ADNds	1.9	635.2
22 - 03 - 17	17 - 040	ADNds	1.79	635.2
22 - 03 - 17	17 - 041	ADNds	1.9	263.8
30 - 08 - 17	17 - 053B	ADNds	1.87	390.9
30 - 08 - 17	17- 054B	ADNds	1.83	363.1
30 - 08 - 17	17 - 055	ADNds	1.79	389.6
30 - 08 - 17	17 - 056	ADNds	1.86	511.3
30 - 08 - 17	17 - 057 A	ADNds	1.82	624.2
30 - 08 - 17	17 - 058	ADNds	1.81	728.2
30 - 08 - 17	17 - 059	ADNds	1.80	649.1
30 - 08 - 17	17 - 060	ADNds	1.78	292.1
30 - 08 - 17	17 - 061	ADNds	1.77	178.8
30 - 08 - 17	17 - 062	ADNds	1.74	58.4
30 - 08 - 17	17 - 063	ADNds	1.78	73.2
30 - 08 - 17	17 - 064	ADNds	1.77	71.4
30 - 08 - 17	17 - 065B	ADNds	1.76	150.0
30 - 08 - 17	17 - 066 A	ADNds	1.85	191.6
30 - 08 - 17	17 - 067	ADNds	1.67	63.7
30 - 08 - 17	17 - 068	ADNds	1.73	59.5
30 - 08 - 17	17 - 069 A	ADNds	1.83	247.8

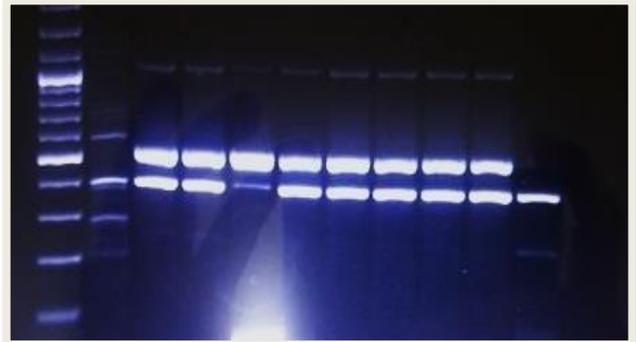
**Fuente:** Resultados de Laboratorio de Biología Molecular Dr. Elmer Cisneros In Memoriam del POLISAL.



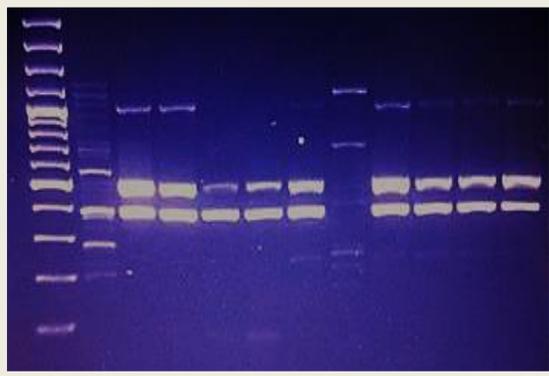
**Anexo 9 Lectura y Procesamiento de las muestras de PAE con MBLs Positivas**



***Ilustración 1: Resultado de Corridos de PCR Gen VIM y GIM***



***Ilustración 2: Detección de Genes VIM, SPM y GIM***



***Ilustración 3: Detección de Genes MBLs VIM y GIM***



***Ilustración 4: Cámara de Electroforesis***



***Ilustración 5: Montaje de la Cámara de Electroforesis***



***Ilustración 6: Transiluminador del Gel de Electroforesis***

## ANEXO 10. PRESUPUESTO

Ítem	Descripción del artículo	Qty	Unidad de medida	P/U \$	Total
1	Tubo para PCR; Fisherbrand; Tapa plana; Natural; capacidad 0.2 ml	5	CS Caja/1000	40	200
2	Guantes estériles	4	Caja/100 unidades	5	20
3	Platos Petri	8	Bolsa de 15 unidades	30	240
4	Asas bacteriológicas desechables	15	Bolsa de 10 unidades	4	60
5	Punta de pipeta de 0.1 a 10 $\mu$ L, PK/1000	5	PK	28	140
6	Punta de pipeta de 200 $\mu$ L, PK/1000	5	PK	13	65
7	Enzima Taq polimerasa	1	Paquete	150	150
8	Bromuro de etidio	1	Frasco de 20 ml	150	150
9	TBE 10X	1	Frasco de 1 lt	300	300
10	Primers de Carbapenemasa	5	Mililitro	300	1,500
11	Agar McConkey	1	Frasco de 200 ml	150	150
12	Kit de PCR dNTPs y Buffer PCR	2	Caja/4 reactivos	228	456
13	Marcador molecular Loading	2	Caja	243	486
14	Agua sigma	1	Litro	250	250
15	Agarosa	1	Frasco de 100 gr	350	350
16	Papel de impresora de PCR	1	Paquete	250	250
17	Tubos Eppendorf	2	Caja	180	360
18	Tarjetas Vitek 2 Compact	5	Caja	150	750
<b>Precio total de los materiales y reactivos en el estudio en \$</b>					<b>\$ 5,877</b>
<p><b>Nota:</b> Todos los materiales, reactivos y equipos van hacer proporcionados por el laboratorio de Biología Molecular y Celular brindado por el Instituto Politécnico de la Salud (POLISAL) UNAN-Managua, cuyo apoyo económico de los estudiantes va ser en la Enzima Taq Polimerasa que tiene un costo de 150\$ el Paquete</p>					