



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Identificación de genes de Metallo β -lactamasas en
Pseudomonas aeruginosa de aislados clínicos
hospitalarios 2016**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Gina Nilda SALVADOR LUJÁN

ASESOR

Ruth Hortensia GARCÍA DE LA GUARDA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Salvador G. Identificación de genes de Metallo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* de aislados clínicos hospitalarios 2016 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

603



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA



69

Siendo las 11:00 hrs. del 15 de mayo de 2017 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. María Elena Salazar Salvatierra e integrado por los siguientes miembros: Mg. Ruth García De La Guardia (Asesora), Mg. Mirtha Roque Alcarraz, Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz y la Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "IDENTIFICACIÓN DE GENES DE METALLO LACTAMASAS EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA DE AISLADOS CLÍNICOS HOSPITALARIOS 2016" presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas GINA NILDA SALVADOR LUJÁN.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magíster en Microbiología. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Dieciocho (18) MUY BUENO

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencias Biológicas GINA NILDA SALVADOR LUJÁN, el Grado Académico de Magíster en Microbiología.

Siendo las hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las hrs. del 15 de mayo de 2017.

[Firma de Dra. María Elena Salazar Salvatierra]

Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P., T.C.)
Presidente

[Firma de Mg. Ruth García de La Guardia]

Mg. Ruth García de La Guardia
Miembro - Asesor

[Firma de Mg. Mirtha Roque Alcarraz]

Mg. Mirtha Roque Alcarraz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

[Firma de Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz]

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

[Firma de Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo]

Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo (P. Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:

DEDICATORIA

*A mis padres, **María Bernabita y Fulgencio** por ser los pilares en mi vida, por su apoyo incondicional, su ejemplo de superación y por inculcarme valores para ser mejor persona.*

*A mis hermanos, **Marita, Marco y Hernán** por estar siempre conmigo e incentivarme a seguir siempre.*

AGRADECIMIENTOS

*Este trabajo ha sido posible al asesoramiento de la **Mg. Ruth García de la Guarda**, quien con su conocimiento, consejos y tiempo hizo posible que este trabajo se ejecutara.*

*A mis colegas y amigos del **Laboratorio de Microbiología del “Hospital Militar Central”**, Rosana, Cecilia, Rosita y Elfer.*

*A **Javier, Edgar y Katia** por el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de esta tesis.*

ÍNDICE

Índice de Tablas.....	VI
Índice de Figuras.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Situación Problemática.....	10
1.2 Formulación del Problema.....	13
1.3 Justificación Teórica.....	14
1.4 Justificación Práctica.....	15
1.5 Objetivos.....	16
1.5.1 Objetivo General.....	16
1.5.2 Objetivos específicos.....	16
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. Antecedentes de la investigación.....	18
2.2. Bases Teóricas.....	20
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.2.2 Importancia Clínica.....	21
2.2.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	24
2.2.3.1 β -Lactamasas.....	25
2.2.3.2 Sistemas de Eflujo.....	27
2.2.3.3 Porinas de Membrana.....	29
2.2.3.4 Carbapenemasas Metallo β -lactamasas.....	30
2.2.3.5 Métodos de detección de MBL en el laboratorio...	33

III.- METODOLOGÍA.....	35
3.1. Tipo de diseño.....	35
3.2. Selección de la muestra.....	35
3.2.1. Criterio de inclusión.....	35
3.2.2. Criterio de exclusión.....	35
3.2.3. Ficha de datos del paciente.....	35
3.3. Aislamiento e Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
3.4 Susceptibilidad Antimicrobiana.....	38
3.5 Detección Fenotípica de MBL.	40
3.6 Almacenamiento de cepas.....	41
3.7 Reactivación de cepas.....	41
3.8 Detección Genotípica de MBL.....	41
3.9 Aspectos éticos.....	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1 Resultados.....	47
4.2 Discusión.....	55
V. CONCLUSIONES.....	60
VI. RECOMENDACIONES.....	61
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Discos de antibióticos incluidos en la prueba de susceptibilidad con los diámetros de inhibición según CLSI 2014.....	39
TABLA 2. Secuencia de los iniciadores utilizados para la detección de MBL en <i>P. aeruginosa</i> , en la prueba de multiplex PCR y el tamaño del producto de amplificación.....	42
TABLA 3. Secuencia de los iniciadores utilizados para la detección de MBL tipo NDM en <i>P. aeruginosa</i> , en la prueba de PCR y el tamaño del producto de amplificación.	44
TABLA 4. Detección fenotípica con EDTA de MBL en 76 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>	49
TABLA 5. Detección molecular por PCR multiplex de genes codificantes de MBL en 76 cepas aislados de <i>P. aeruginosa</i>	50
TABLA 6. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en 24 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> positivos para MBL.	53
TABLA 7. Aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> MBL positivo. Datos epidemiológicos y perfil de susceptibilidad.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema de bombas de expulsión.....	28
FIGURA 2. Esquema de porina de membrana.....	30
FIGURA 3. Distribución porcentual de los 76 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> por unidades de hospitalización.....	47
FIGURA 4. Distribución porcentual de los 76 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> según tipo de muestra.....	48
FIGURA 5. Aislamiento clínico de <i>P. aeruginosa</i> con prueba fenotípica positiva a MBL, al observarse sinergia entre los discos de EDTA e imipinem.....	49
FIGURA 6. Electroforesis de la PCR multiplex para MBL de los 24 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> positivos para MBL.....	51
FIGURA 7. Distribución porcentual de los 24 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> positivos para MBL por unidades hospitalarias.....	52
FIGURA 8. Distribución porcentual de los 24 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> positivos para MBL según el tipo de muestra.....	52

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es un patógeno oportunista que causa infecciones intrahospitalarias en pacientes inmunosuprimidos. La resistencia a carbapenemes, es un problema a nivel mundial ya que representan el último recurso para el tratamiento de infecciones por bacterias multidrogorresistentes, por lo cual es importante investigar las carbapenemasas, especialmente metalo β -lactamasas (MBL) y el tipo de éstas, que circulan en cada centro hospitalario. En el Hospital Militar Central (HMC) no se ha investigado ello, por lo que el presente estudio tiene como objetivo identificar y determinar la prevalencia de genes que codifican carbapenemasas de tipo MBL en aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Se analizaron 76 aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a Ceftazidima y “no sensibles” (intermedio o resistentes) a Imipenem y/o Meropenem colectados en el HMC de Enero a Setiembre del 2016. Se procesaron en el Laboratorio de Microbiología, muestras de secreciones respiratorias, heridas, orinas y hemocultivos de pacientes hospitalizados. Se determinó la sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión según los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014. Se hizo la detección fenotípica y genotípica de MBL. La detección fenotípica se realizó por el *test* de sinergia de doble disco con imipenem, meropenem y EDTA. La detección de los genes de MBL de mayor importancia clínica se realizó amplificando por PCR multiplex los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}, mientras que para el gen *bla*_{NDM} se hizo PCR convencional. Se obtuvieron fenotípicamente 25 de 76 pruebas positivas para MBL, 24(31.58%) de las cuales se confirmaron genéticamente, encontrando el gen *bla*_{IMP} (23/24, 95.83%) y el gen *bla*_{VIM} (1/24, 4.17%). La sensibilidad de la prueba fenotípica fue del 100% y la especificidad del 98%. Se concluye que el 31.58% de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes hospitalizados en el HMC, presentan MBL, siendo el gen *bla*_{IMP} el más prevalente.

Palabras Clave: *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenemasas, metalo β -lactamasas, IMP, VIM.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is an opportunistic pathogen that causes hospital acquired infections in immunosuppressed patients. Resistance to carbapenems is a worldwide problema since they represent the last resource to treatment of multidrug resistant bacterial infetions, so it is important to investigate the carbapenemases, especially metallo β -lactamases (MBL) and the type of these ones, circulating in every hospital center. The Central Military Hospital (HMC) has not researching about this, so the objective for the present study is to identify and determine the prevalence of genes encoding MBL type carbapenemases in clinical isolates of *P. aeruginosa*. Seventy six clinical isolates of *P. aeruginosa* resistant to Ceftazidime and “non sensitive” (intermediate or resistant) to Imipinem and/or Meropenem were collected and analyzed at the HMC, from January to September 2016. Respiratory secretions, wounds, urine and blood samples were processed in the Microbiology Laboratory of hospitalized patients. Antimicrobial susceptibility was determined by the diffusion disc method according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014. The MBL detection was made using phenotypic and genotypic techniques. For the phenotypic detection, the double disc synergy *test* with Imipinem, Meropenem and EDTA was performed. The detection of MBL genes of most clinical importance was performed by multiplex PCR amplification for the *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} genes, while for *bla*_{NDM} gene was performed through conventional PCR. Phenotypically 25 of 76 positive tests were obtained for MBL, 24 (31.58%) of which were genetically confirmed, finding the gene *bla*_{IMP} (23/24, 95.83%) and the *bla*_{VIM} gene (1/24, 4.17%). The sensitivity of the phenotypic test was 100% and the specificity was 98%. It is concluded that 31.58% of the clinical isolates of *P. aeruginosa* recovered from hospitalized HMC patients show MBL, being the *bla*_{IMP} gene the most prevalent.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenemases, metallo β -lactamases, IMP, VIM.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), es la especie bacteriana más importante del género *Pseudomonas*, por ser un patógeno nosocomial que se presenta con frecuencia en pacientes críticos de allí su gran importancia clínica. Esta bacteria puede ser aislada del suelo, de los compuestos orgánicos en descomposición, de la vegetación y del agua. En el ambiente hospitalario esta bacteria ha sido aislada de lavatorios, baños, trapeadores, equipos de diálisis, de terapia respiratoria y en algunos casos de soluciones desinfectantes (Gales, Jones, Turnidge, Rennie, & Ramphal, 2001; Streeter & Katouli, 2016).

En los seres humanos, *P. aeruginosa* es poco frecuente que cause enfermedad en personas sanas, aunque se ha aislado como parte de la microbiota con tasas que se reportan de 0 a 2% para la piel, de 0 a 3,3% para la mucosa nasal, de 0 a 6,6% en la garganta y de 2,6 a 24% para las muestras fecales (Vilar Compete, Jacquemin, Diaz Gonzales, Velasquez, & Volkow, 2003; Rojas Larios, 2009; Gales et al., 2001). Sin embargo, la tasa de colonización podría superar el 50% durante la hospitalización cuando reciben terapia antimicrobiana. En la mayoría de los casos la enfermedad clínica se inicia con alguna alteración de la defensa del huésped; esto involucra el estado inmunológico alterado (neutropenia, inmunosupresión iatrogénica, etc.) y en otros casos involucra la ruptura de la integridad de la barrera física de la piel o mucosas, dando paso a la invasión bacteriana en líneas intravenosas, catéteres urinarios, tubos endotraqueales, cirugías, quemaduras, etc (Rojas Larios, 2009, Streeter & Katouli, 2016, Luján Roca, 2014).

Una de las características más preocupantes de *P. aeruginosa* es su elevada capacidad de resistencia a los antibióticos (resistencia intrínseca) y a

su gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia (resistencia extrínseca) por presión antibiótica, mutaciones en su cromosoma o de incorporar determinantes de resistencia móviles en casetes de transposones o plásmidos por transmisión horizontal (Gonzales, & Realpe, 2014, Jimeno, Alcalde, & Blázquez, 2010, Nicolau & Oliver, 2010, Saavedra, Duarte, Diaz Jimenez, 2008).

La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a los antibióticos, se debe en parte a la baja permeabilidad de su membrana externa (que permite el ingreso de pequeñas moléculas hidrofílicas y excluye a moléculas más grandes por las porinas), a la expresión natural de sistemas de eflujo (que expulsan sustancias de desecho, antibióticos fuera de la célula). Además posee una β -lactamasa inducible de tipo AmpC, que presenta baja resistencia a betalactámicos. Entre los mecanismos de resistencia adquirida se presenta la hiperproducción de la enzima AmpC, la hiperexpresión de alguna de las bombas de expulsión, la represión o inactivación de la porina OprD, la adquisición de genes codificantes de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), de metalo β -lactamasas (MBL) y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Livermore, 2002; Perez et al., 2008, Perozo Mena et al., 2013;).

Las MBL son enzimas codificadas en el cromosoma o en elementos móviles determinantes de resistencia en *P. aeruginosa*, que hidrolizan diferentes antibióticos betalactámicos dejando inactivos a las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Estas enzimas son codificadas por genes que pueden estar localizados en los casetes génicos dentro de integrones o transposones que a su vez pueden ser transferibles o no, además de coexistir con otros genes que codifican resistencia a otras familias de antibióticos y estas estructuras complejas se pueden integrar al cromosoma bacteriano o en plásmidos, siendo esta una forma de movilización y dispersión horizontal, provocando una alarmante emergencia de bacterias multirresistentes. (Estepa, 2014; Rojas Larios, 2009; Nicolau & Oliver, 2010; Radice et al., 2011; Ministerio de Salud, 2014).

La resistencia a los carbapenemes (imipinem, meropenem, doripenem), es un gran problema a nivel mundial ya que estos antibióticos betalactámicos de amplio espectro de acción son utilizados como último recurso para tratar infecciones potencialmente mortales por bacilos gram negativos productoras de BLEE, incluyendo *P. aeruginosa*, siendo consideradas como la última opción terapéutica en el tratamiento de infecciones nosocomiales, además de tener un alto costo de tratamiento (Ellington, Kistler, Livermore, & Woodford, 2007, Díaz Tello, 2008; Rojas Larios, 2009, García, Astocondor, & Banda, 2012).

Dentro de las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) para los pacientes portadores o infectados por bacterias productoras de carbapenemasas, está la aplicación de medidas estrictas de aislamiento de estos pacientes, debido a su alta transmisibilidad y mortalidad asociada, así como la vigilancia y detección de este mecanismo de resistencia, siendo por ello los laboratorios de los hospitales la primera línea de contención de estos patógenos multirresistentes (OPS/OMS, 2011; Ministerio de Salud, 2014; Levy Hara et al., 2012).

Es por ello, que es de gran importancia clínica y epidemiológica, la detección, identificación y reporte de los tipos de carbapenemasas circulantes en cada centro hospitalario. Solo esto permitirá reconocer cual es la complejidad y magnitud del problema, dando tratamientos adecuados y evitando brotes nosocomiales.

En nuestro país, Díaz Tello (2008) hizo el reporte fenotípico de la presencia de MBL en el 7% de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* en muestras de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen – ESSALUD. Posteriormente Gonzales Escalante et al. (2013) reportó MBL en el 15.7% de las cepas de *P. aeruginosa*, aisladas de muestras clínicas en seis hospitales de referencia de Lima, en todos los casos se detectó la presencia del gen *bla_{IMP}* como codificante de las MBL. Ríos Sanca (2013) aisló cepas de *P. aeruginosa* de diferentes hospitales y clínicas

de Lima, siendo estas no sensibles a carbapenemes y el 18.8% de las cepas aisladas presentó genes de MBL correspondiente al gen *bla_{IMP}*, no encontrando genes *bla_{NDM}*, ni tampoco *bla_{VIM}*. En otra publicación de Gonzales Escalante (2013) en 115 aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes, aisladas de pacientes hospitalizados del Instituto Nacional de Salud del Niño, el 21.7% presentó MBL y el 92% presentaron el gen *bla_{IMP}* y el 8% el gen *bla_{VIM}*.

En el Hospital Militar Central (HMC) se vienen aislando cepas de *P. aeruginosa* en muestras clínicas de pacientes hospitalizados con resistencia a todos los antimicrobianos incluyendo a los carbapenemes (Imipinem, Meropenem), complicando el tratamiento, elevando el costo y prolongando la estancia de hospitalización de los pacientes. Hasta la fecha, en el hospital no se ha determinado la presencia de enzimas tipo MBL, tampoco la existencia de genes que codifican dichas enzimas.

Por lo expuesto, se considera de sumo interés determinar la presencia y prevalencia de los genes que codifican MBL, siendo estos altamente transmisibles a otras bacterias de la misma o diferente especie, para tomar las medidas preventivas de control necesarias, a fin de evitar su diseminación y posibles brotes intrahospitalarios con alta letalidad.

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son los genes codificantes de Metallo β -lactamasas y su prevalencia, presentes en *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en el HMC de Enero - Setiembre 2016?

1.3. Justificación teórica

El uso indiscriminado de los antibióticos es un factor que a nivel mundial ha incrementado la resistencia en las bacterias, el uso desmedido de carbapenemes es un factor importante en la generación y selección de organismos productores de carbapenemasas. En *P. aeruginosa*, la resistencia a los carbapenemes, tiene una repercusión importante a nivel hospitalario, donde se observa fallas terapéuticas de los esquemas de tratamiento utilizados tradicionalmente, lo que supone un reto terapéutico, en un momento donde no está previsto ningún nuevo antimicrobiano frente a bacterias gram negativas. Además es un evidente problema de ecología hospitalaria, por la capacidad de estos microorganismos de transferir información de resistencia a los antibióticos a otras cepas de *P. aeruginosa* u otras enterobacterias (Rojas Larios, 2009, Morejon Garcia, 2012).

Las MBL son enzimas carbapenemasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas (primera, segunda, tercera, cuarta generación), cefamicinas y carbapenemes, no teniendo actividad sobre el aztreonam (Cornaglia, Giamarellou & Rossolini, 2011, Luján Roca, 2014). Estas enzimas son inhibidas en su actividad hidrolítica por agentes quelantes como el etilendiaminotetraacético (EDTA), el mercaptoacetato de sodio (SMA) o el ácido dipicolínico, siendo estos utilizados en el laboratorio para su detección fenotípica, las que se confirman detectando la presencia de los genes codificantes de MBL (Jimeno et al., 2010, Nicolau & Oliver, 2010, Radice et al., 2011).

Habitualmente los genes que codifican las MBL pueden estar localizados en casetes génicos dentro de integrones o transposones que a su vez pueden ser transferibles o no, pudiendo coexistir con genes que proporcionan resistencia a otras familias de antibióticos (aminoglucósidos, quinolonas), de allí que las MBL de transmisión plasmídica tienen una

importancia crítica, debido a su difusión mundial entre especies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *E. coli* (Nicolau & Oliver, 2010).

Las familias de MBL de mayor distribución y diseminación son las tipo IMP y VIM, sin embargo la emergida últimamente denominada “New Delhi Metalobetalactamasa” (NDM), en una cepa de *K. pneumoniae* y otra de *E. coli*, se está convirtiendo en la carbapenemasa más amenazante debido a su prolífica diseminación mundial en un periodo corto de tiempo y ser extremadamente resistentes a los antibióticos: fluoroquinolonas, aminoglucósidos y aztreonam (OPS/OMS, 2011, Pagniez et al., 2006; Jain et al., 2014).

1.4. Justificación práctica

La resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, ha ido en aumento a nivel mundial en los últimos años, representando un gran problema para los sistemas de salud debido a la falta de opciones terapéuticas para tratar infecciones producidas por estos gérmenes multirresistentes (MDR) (García Apac, 2012, Perozo Mena et al., 2013). Por ello, la detección temprana de cepas productoras de carbapenemasas tipo MBL en los laboratorios clínicos es fundamental, para definir una terapia antimicrobiana empírica e implementar las medidas de control de infecciones, evitando la diseminación de las cepas multirresistentes en los hospitales.

El algoritmo de trabajo para la búsqueda de carbapenemasas adquiridas, es el propuesto por el INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, consensado para la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana (RELAVRA), el cual está basado fundamentalmente en el efecto inhibitorio de agentes quelantes de Zn (EDTA) sobre las MBL (Ministerio de Salud, 2014).

Actualmente en el laboratorio de Microbiología del HMC no se utiliza ningún método fenotípico o genotípico para detectar la presencia de carbapenemasas de tipo MBL en *P. aeruginosa*; sólo se evidencia aislamientos con un patrón de sensibilidad de resistencia a carbapenemes (Imipinem, Meropenen), cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aminoglucósidos, quinolonas y en ciertos casos se evidencia sensibilidad al aztreonam. Por lo tanto, no se conoce si la resistencia a las diferentes familias de antimicrobianos se debe a mecanismos de resistencia intrínsecos propios de *P. aeruginosa* o a mecanismos adquiridos por la presencia de genes que codifican enzimas de tipo carbapenemasas MBL que se caracterizan por su fácil diseminación en el ambiente hospitalario y que podrían ser responsables de la resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa* aisladas en las diferentes salas de hospitalización; pudiendo ser la posible responsable de brotes epidémicos, si no se toman las medidas de control y aislamiento necesarias para evitar su dispersión a otros pacientes.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Identificar y determinar la prevalencia de los genes codificantes de Metallo β -lactamasas: *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} en *Pseudomonas aeruginosa* no sensibles a carbapenemes, aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en el HMC de Enero a Setiembre del 2016.

1.5.2. Objetivos Específicos

- a) Aislar cepas de *P. aeruginosa* de muestras clínicas (secreción respiratoria, herida, orina y hemocultivo) procedentes de pacientes hospitalizados en el HMC.

- b) Determinar el perfil de susceptibilidad a los carbapenemes, cefalosporinas, quinolonas, betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasa, polimixina y monobactam a las cepas aisladas.
- c) Determinar el fenotipo MBL en las cepas aisladas de *P. aeruginosa* “no sensibles” a imipinem (IMI) y/o meropenen (MER) y resistentes a ceftazidime (CAZ).
- d) Identificar los genes codificantes de MBL: *bla_{IMI}*, *bla_{VIM}* y *bla_{NDM}*, de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* no sensibles a Imipinem y/o Meropenen y resistentes a Ceftazidime.
- e) Determinar la prevalencia de MBL y de sus genes codificantes en las cepas aisladas durante el lapso estudiado.

II.- MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

La epidemiología de la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa* ha sido ampliamente reportada en todos los continentes. Con frecuencia es reportada en brotes epidémicos nosocomiales, salas de UCI, salas de hospitalización, salas de cirugía, etc (Jimeno, Alcalde, & Blázquez, 2010; Vilar et al., 2003; Villamil Gomez, Villareal, & Botia, 2011).

El primer brote epidémico de MBL en España se describió en el 2007, por una cepa productora de VIM-2, en el Hospital de Bellvitge (Barcelona), que afectó a 34 pacientes en un período aproximado de 2 años (Nicolau & Oliver, 2010). En mayo del 2009 en el Hospital Santa María de España, se detectaron seis aislamientos consecutivos de cepas de *P. aeruginosa* con el mismo perfil de resistencia a los betalactámicos imipenem y cefalosporinas, manteniendo sensibilidad al aztreonam. Se investigó la presencia de MBL mediante caracterización fenotípica y genotípica y se determinó la presencia de MBL tipo VIM (Jimeno et al., 2010).

La diseminación de los diferentes genes productores de MBL es a nivel mundial, sin embargo los reportes indican un predominio del gen tipo VIM en Europa (Gutkind, Di Conza, Power, & Radice, 2013). En Estados Unidos el primer caso de MBL fue detectado en Texas y se reportó el gen tipo VIM, posteriormente se han reportado los genes tipo IMP en *P. aeruginosa* (Gonzales-Escalante, 2012).

En Venezuela, Torres Castillo (2005) demostró que de 100 cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenemes, un 40% mostró actividad hidrolítica a carbapenemes y de este porcentaje alrededor de un 25% fueron detectadas como MBLs de la familia VIM. En Brasil, estudios

realizados indican que el gen prevalente de MBL es SPM-1, en diferentes regiones del país (Magalhaes, Lins, & Magalhaes, 2005).

En trabajos realizados en Argentina, Pagniez et al. (2006); y Cejas et al. (2008); reportaron una incidencia de MBL de 11% y 14% respectivamente, las enzimas fueron tipo VIM en el primer caso e IMP en el trabajo de Cejas. En Chile, Perez et al. (2008) reportó una incidencia de MBL en 18.6% del tipo VIM.

El 17 de noviembre de 2011, el Centro Nacional de Enlace para el Reglamento Sanitario Internacional (CNE) en Guatemala emitió una alerta epidemiológica por el aislamiento de cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente por carbapenemasa tipo NDM en el país. La OPS/OMS enfatizó la importancia de la vigilancia y detección de este mecanismo de resistencia en la región, que incrementa la morbilidad y mortalidad de las infecciones asociadas a la atención de salud (OPS/OMS, 2011). Esta nueva carbapenemasa ya ha sido reportada en *P.aeruginosa*, aislada de muestras de pacientes hospitalizados en Estados Unidos (Kathleen et al., 2015).

En nuestro país, en el 2001, se realizó una evaluación de los patrones de sensibilidad de *P. aeruginosa* en el Hospital Arzobispo Loayza, reportando una elevada resistencia a gentamicina (87.5%) y ciprofloxacina (68.8%) y entre las conclusiones se reportó una alta sensibilidad al Aztreonam, Meropenem e Imipinen, convirtiéndolos en las armas más importantes para el tratamiento de las infecciones intrahospitalarias por *P. aeruginosa* (Nuñez, Soto, Calmet, Castillo, & Casalindo, 2001).

Posteriormente García et al. (2012) analizaron 113 cepas de *P. aeruginosa* aislados de hemocultivos de varios hospitales de Lima y reportaron que el 59% de las cepas fueron MDR, definido como resistente al menos a tres de los siguientes antimicrobianos: ciprofloxacina, imipenem, amikacina y ceftazidime. Concluyendo que en la práctica clínica son más frecuentes los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a todos los

antimicrobianos anti-pseudomonas disponibles, particularmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI).

Díaz Tello (2008), hizo el reporte fenotípico de la presencia de MBL en 7% de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen – ESSALUD en Lima.

En un trabajo realizado por Gonzales Escalante et al. (2013) reportó la presencia de MBL en un 15.7% de las cepas de *P. aeruginosa*, aisladas en muestras clínicas de seis hospitales de referencia en Lima, además el 100% correspondieron al tipo IMP. En el mismo año, Rios Sanca (2013) reportó que el 18.8% de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes aisladas de 5 hospitales de Lima fueron MBL positivas y todas presentaron el gen tipo IMP. En el Instituto de Salud del Niño (Gonzales Escalante, www.insn.gob.pe, 2013) reportó que el 21,7 % de cepas aisladas de *P. aeruginosa* presentaron MBL del tipo IMP y VIM.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es una bacteria ubicua presente en diversos entornos ambientales pudiendo ser aislada del suelo, plantas, animales, aguas contaminadas, etc. Es una bacteria estrictamente aerobia, gram negativa en forma de bacilo recto o ligeramente curvo de 1,5 a 3µm, es móvil por flagelos polares mono o lofotrico, su temperatura óptima de crecimiento es de 37-42°C. No fermenta carbohidratos, pero muchas cepas oxidan glucosa. No forman esporas. La identificación fenotípica se basa en la morfología de la colonia, prueba de oxidasa positiva, la no fermentación de glucosa y presencia de pigmentos característicos (Murray, Rosental, & Pfaller, 2010).

P. aeruginosa puede sobrevivir en ambientes húmedos con mínimos requerimientos nutritivos, la degradación de los glúcidos lo realizan utilizando la ruta de Entner Doudoroff y el ciclo de los Acidos Tricarboxilicos. *In vitro* crecen formando colonias lisas circulares, irregulares o mucosas con capacidad de formar biopelículas en la mayoría de las superficies abióticas y biológicas. Durante su crecimiento, producen un olor dulzón semejante a jugo de uvas o de maíz. Algunas cepas producen hemólisis y con frecuencia producen pigmentos fluorescentes bajo la acción de luz ultravioleta (UV) a baja longitud de onda, sobre todo cuando crecen en medios con limitación de hierro. Los pigmentos de importancia clínica son la Píocianina (azul) y la Píoverdina (verde fluorescente). Otras cepas producen Píorrubina (rojo óxido), Píomelanina (negro). Presentan plásmidos, los cuales son responsables de la incorporación y diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos, desinfectantes y a las condiciones ambientales (Vasil 1986; Luján Roca 2014).

La patogénesis de *P. aeruginosa* es descrita como multifactorial, debido a los diferentes factores de virulencia que presenta. Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias, matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelículas. En el tracto respiratorio el alginato que es producido por algunas cepas interfiere en la respuesta del hospedero ya que este se adhiere a la superficie epitelial pulmonar, siendo una barrera para la fagocitosis, los anticuerpos y antibióticos. La exotoxina A daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta del hospedero a la infección (Luján Roca, 2014).

2.2.2. Importancia Clínica

Las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* están relacionadas al ambiente hospitalario, constituyendo un grave problema clínico. Se le ha asociado a infecciones relacionadas con instrumental médico: catéteres,

estetoscopios, prótesis, soluciones acuosas, desinfectantes, jabones, etc (Lloria, 2009, Ochoa et al., 2013).

Raramente ocasiona infección en hospederos inmunocompetentes, sin embargo en pacientes inmunodeprimidos (pacientes con cáncer, quemados, diabetes, neutropénicos, etc.) puede causar infecciones muy severas, ocasionando la muerte en ciertos casos (Streeter & Katouli, 2016). Por esta razón, es considerado un patógeno oportunista y uno de los mayores responsables de infecciones nosocomiales. Los principales sitios de infección son las zonas húmedas como los ojos, oídos, piel, tracto urinario, respiratorio, teniendo una alta prevalencia en pacientes con fibrosis quística causando infecciones respiratorias crónicas. En el tracto respiratorio de estos pacientes *P. aeruginosa* coloniza muy eficientemente y a medida que progresa la infección, se seleccionan cepas mucoides que producen gran cantidad de exopolisacáridos como el alginato (Díaz Tello, 2008, Estepa, 2014). Las infecciones en estos pacientes son a menudo difíciles de tratar por la producción de exopolisacáridos, la resistencia intrínseca que presenta *P. aeruginosa*, además de la expresión constitutiva de enzimas β -lactamasa tipo AmpC, bombas de eflujo y la baja permeabilidad de su membrana externa. Así como su capacidad notoria para adquirir mecanismos de resistencia a múltiples familias de antimicrobianos (De Gante-Martinez & De Gibes Nuñez, 2011).

En ambientes acuosos *P. aeruginosa* se adhiere a las superficies formando biopelículas, que son cúmulos de bacterias y material extracelular, estas se pueden formar en dispositivos que se implantan dentro del cuerpo humano como catéteres, válvulas cardíacas, dispositivos intrauterinos, causando septicemias (Ochoa et al., 2013).

Una revisión de los datos de vigilancia recogidos por la Red Nacional de Seguridad Sanitaria (NHSN) del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) 2011-2014, muestra que *P. aeruginosa* fue identificada como la segunda causa más común de neumonía asociada al ventilador (16.5%), el tercero más común en infecciones del tracto urinario (10.3%), el

quinto por causa de infección del sitio quirúrgico y el décimo más común en infecciones del torrente sanguíneo asociado a línea central (4%) (Weiner et al., 2016). En el 2006-2007 según el Sistema Informático de Resistencia (SIR) *P. aeruginosa* ocupó el tercer lugar (11%) en frecuencia de aislamientos recuperados de pacientes hospitalizados (Radice et al., 2011). La mortalidad en infecciones graves por *P. aeruginosa* productora de MBL va del 70% al 95% (Cornaglia et al., 2011).

P. aeruginosa presenta diferentes mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Pero la de mayor interés en el ambiente hospitalario es la resistencia que se adquiere por mecanismos de diseminación horizontal, tal es el caso de las carbapenemasas y las relacionadas con enzimas modificantes de aminoglucosidos. En este tipo de resistencia los genes de carbapenemasas y modificantes de aminoglucosidos normalmente están albergados en las mismas estructuras (integrones) pudiendo transferirse en forma conjunta y provocando el fenómeno de multirresistencia (Estepa, 2014).

P. aeruginosa MDR se define como aquella bacteria que es resistente al menos a 3 o más antibióticos de las siguientes clases: betalactámicos, carbapenémicos, aminoglucósidos y/o fluoroquinolonas (De Gante Martínez & De Gibes Nuñez, 2011) y se aísla con frecuencia del ambiente hospitalario. Además, el uso frecuente de antibióticos bajo presión selectiva en pacientes hospitalizados, así como el número de antimicrobianos recibidos, ha sido identificado como un factor de riesgo para la adquisición de multirresistencia de *P. aeruginosa* (Lloria, 2009).

El uso previo de betalactámicos, carbapenémicos, quinolonas, aminoglucósidos y otros factores adicionales como los procedimientos invasivos, uso de ventilación mecánica, inmunosupresión, edad y comorbilidades como diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, se han descrito también como factores de riesgo de *P. aeruginosa* MDR (Cuesta et al., 2012). La identificación de los factores de riesgo de *P. aeruginosa* MDR en servicios de hospitalización y en UCI, permitiría al personal del control de infecciones y resistencia intrahospitalaria controlar factores de riesgo

modificables y definir políticas institucionales del uso racional de antibióticos para el manejo de los pacientes.

2.2.3. Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos.

P. aeruginosa es resistente a los antibióticos de manera natural (intrínseca) o adquirida (extrínseca). La resistencia intrínseca, se presenta a un gran número de antimicrobianos: Aminopenicilinas con o sin inhibidor, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefamicinas, ertapenem, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, tigeciclina, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. Esta resistencia se debe a la baja permeabilidad de su membrana externa, la cual actúa como una barrera selectiva permitiendo el ingreso de pequeñas moléculas hidrofílicas y excluye a moléculas más grandes. Además, esta bacteria expresa bombas de expulsión del interior hacia el exterior de la célula, enzimas inactivantes, enzimas que modifican el sitio diana, producción de betalactamasas que inactivan a los antibióticos betalactámicos, lo que hacen que esta bacteria sea naturalmente resistente a un gran número de antibióticos (Streeter & Katouli, 2016).

La resistencia extrínseca, es por la capacidad que tiene *P. aeruginosa*, de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones o a través de la adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal. Entre los determinantes adquiridos, normalmente en forma de casetes situados en integrones, a su vez localizados en transposones o plásmidos que permiten su movilidad, destacan las β -lactamasas incluyendo las de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas, así como las enzimas modificantes de los aminoglucósidos (Gomez Alvarez, Leal Castro, Pérez de Gonzalez, & Navarrete Jiménez, 2005, Nicolau & Oliver, 2010).

La resistencia a los carbapenemes en *P. aeruginosa*, puede tener un origen cromosómico, por mutaciones en determinados genes o bien estar

mediada por la adquisición horizontal de genes que codifican carbapenemasas. Las carbapenemasas que se han reportado en *P. aeruginosa* pertenecen a las clases A, B y D de Ambler (Gutkind et al., 2013; Estepa, 2014).

Otro factor preocupante es la capacidad de *P. aeruginosa* de tornarse resistente en el curso del tratamiento con antibióticos. Ciertos antimicrobianos tienen la capacidad de inducir los mecanismos de resistencia bajo presión antibiótica (Livermore, 2002, Lloria, 2009). 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. Una cefalosporina de tercera generación (ceftazidime), con actividad antipseudomonas, tiene el más bajo riesgo de inducir resistencia en bacterias previamente sensibles a ceftazidima, en contraste, el imipenem presenta la más alta tasa de emergencia de resistencia después del tratamiento (Livermore, 2002 ,Lloria, 2009).

2.2.3.1. β -Lactamasas

Las β -Lactamasas son enzimas que actúan sobre los betalactámicos. Estos antibióticos inhiben la última etapa de la síntesis de péptidoglucano, por inhibición de la transpeptidasa conocida como proteína ligadoras de penicilina (PBP). Las β -Lactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de estos antibióticos destruyendo el sitio activo e impiden su actividad, confiriendo resistencia a la bacteria. Estas enzimas son susceptibles de ser inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam, aunque no todas son susceptibles a la inhibición. Estas enzimas se encuentran codificadas en genes localizados en el cromosoma o en plásmidos lo que les otorga la capacidad de diseminación entre distintas

bacterias de la misma o diferente especie, provocando su diseminación mundial (Gomez Alvarez et al., 2005).

Existe más de una clasificación de β -Lactamasas. La clasificación de Ambler se basa en su estructura molecular y las clasificó en 4 clases (A, B, C y D) y la clasificación de Bush se basa en su afinidad por el sustrato y la acción de los inhibidores, dividiéndolos en 4 grupos funcionales (1, 2, 3, 4) (Nicolau & Oliver, 2010, Gutkind et al., 2013, Ochoa et al., 2013,).

En *P. aeruginosa* se presentan las β -lactamasas: AmpC, las BLEE y las carbapenemasas.

La β -lactamasa AmpC, está codificada en el cromosoma de la bacteria y puede ser inducida por otros betalactámicos. Esta enzima codifica la resistencia de *P. aeruginosa* a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefamicinas, cefalosporinas de primera y segunda generación e incluso cuando hay hiperproducción de esta enzima aumenta la resistencia a cefotaxima y ceftriaxona, excepto a las cefalosporinas de cuarta generación, carbapenemes y en forma variable al aztreonam (Estepa., 2014, Nicolau & Oliver, 2010). La β -lactamasa AmpC es codificada por el gen ampC y su expresión es parcialmente controlada por el factor regulatorio. Los genes *ampC* producen bajos niveles de β -lactamasa AmpC pero pueden ser inducidos a producir altos niveles ante la presencia de ciertos β -lactámicos inductores tales como ceftioxitina, imipenem, cefalotina, ampicilina y el grado de resistencia depende del grado de represión de la AmpC (Livermore, 2002, Nicolau & Oliver, 2010).

Las BLEE es otro mecanismo de resistencia en *P. aeruginosa*, las cuales son enzimas que viabilizan la resistencia a penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam. A menudo están codificadas en genes localizados en plásmidos y son transferibles de una cepa a otra. Las más prevalentes son las de los tipos TEM, SHV y CTX-M (Lloria, 2009, Ochoa et al., 2013).

Las carbapenemasas, son enzimas que inactivan a todos los β -lactámicos penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Se clasifican en dos familias: las serin carbapenemasas y las Metallo β -lactamasas, siendo estas últimas codificadas por elementos genéticos móviles, convirtiéndose en un gran problema en el ambiente hospitalario (Pasteran, 2014).

En *P. aeruginosa* la resistencia a carbapenémicos esta asociada a carbapenemasas de clase A, clase B y en menor propoción a la clase D (oxacilinasas). Las carbapenemasas de la clase A pertenecen al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush y comprenden cinco grupos: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC. En *P. aeruginosa* se han reportado del tipo KPC (KPC-2 en Colombia y KPC-5 en Puerto Rico) y las variantes GES-2 y GES-5, todas de codificación plasmídicas (Gutkind et al., 2013). Las carbapenemasas de clase B más conocidas como MBL, son quizá el grupo más relevante de carbapenemasas en *P. aeruginosa*, tanto por su diversificación en diferentes variantes aminoacídicas, como por su diseminación prácticamente mundial y en diferentes microorganismos. La carbapenemasa de clase D en *P. aeruginosa* detectada es la OXA-40 con capacidad de ser transferible a otras bacterias (Saavedra et al., 2014).

2.2.3.2. Sistemas de Eflujo.

Son complejos enzimáticos situados en la membrana celular y tienen la capacidad de expulsar sustancias tóxicas para la bacteria. Entre los más relevantes están MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, que difieren en sus sustratos de acción, dependiendo de la bomba implicada, pueden afectar a prácticamente todos los betalactámicos, a las fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Livermore, 2002, Mesaros et al., 2007, Nicolau & Oliver, 2010).

La bomba MexAB-OprM, está constituida por una proteína de la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa (ver Figura 1). Esta bomba tiene la

capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración a los antibióticos, cloranfenicol, fluroquinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas, trimetoprim y a los β -lactámicos excepto Imipinem. Este sistema de expulsión es el responsable de la impermeabilidad a la mayoría de los antibióticos. La sobreexpresión de MexEF-OprN, confiere resistencia a quinolonas, meropenem e imipinem (Gomez Alvarez et al., 2005, Lloria, 2009).

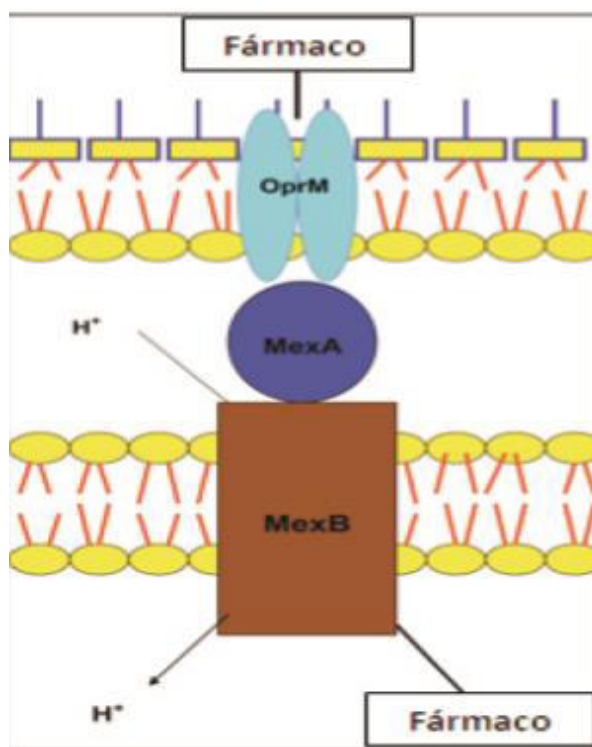


Figura 1. Esquema de bombas de expulsión. Constituida por el transportador (MexB), el enlazador (Mex A) y el canal de salida (OprM) de la membrana externa. Fuente: De Gante-Martinez & De Gibes-Nuñez, (2011).

2.2.3.3. Porinas de Membrana

Las porinas son proteínas que se ubican en la membrana externa de la bacteria formando canales inespecíficos que permiten la difusión pasiva de iones, pequeñas moléculas hidrofílicas y facilitan la captación de aminoácidos básicos a través de la membrana externa (ver Figura 2). En *P. aeruginosa* se encuentra la porina OprD que presenta 19 clases, su función esta en la captación pasiva de aminoácidos básicos, pequeños péptidos y su análogo estructural el imipinem (también permite el paso de meropenem y doripenem), a través de esta porina, la afinidad por imipinem es casi 70 veces más que el meropenem (Gomez et al., 2005). El imipinem 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 Mínima Inhibitoria (CIM) para imipinem, lo que las hace francamente resistentes a este carbapenémico. La resistencia a meropenem exige dos mecanismos, la mutacion del gen que codifica OprD y la activación de las bombas de expulsión. La mutación del gen OprD se sospecha ante una cepa francamente resistente a imipinem con susceptibilidad reducida o preservada a meropenem y sin afectar a otros lactámicos, a menos que estén presentes otros mecanismos de resistencia (Gomez Alvarez et al., 2005).

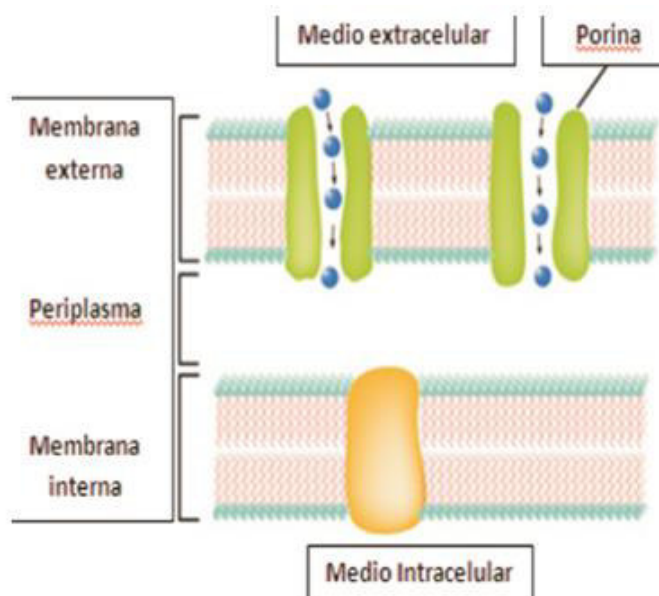


Figura 2. Esquema de porina de membrana. En *P. aeruginosa* la OprD permite el ingreso de pequeños aminoácidos y carbapenémicos. *Fuente:*De Gante-Martinez & De Gibes-Nuñez (2011).

2.2.3.4. Carbapenemasas Metalo β -lactamasas (MBL)

Las enzimas MBL en base a su secuencia molecular han sido clasificadas en la clase B de Ambler y en el grupo 3 según la clasificación funcional de Bush Jacoby y Madeiros, son las de mayor importancia clínica y epidemiológica a nivel mundial, debido al alto nivel de resistencia que presentan a los β -lactámicos excepto aztreonam, así como la alta tasa de morbilidad y mortalidad asociada al ambiente hospitalario por la diseminación horizontal que presentan. Todas las MBL tienen en común, la inhibición por quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dipicolínico, el mercapto acetato de sodio y requieren de cationes divalentes usualmente el zinc utilizados como cofactores para su actividad enzimática. Además las MBL no son inhibidas por inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam). Las MBL están codificadas por los genes *bla* transportados en elementos móviles localizados en casetes insertados en integrones tipo 1 y en ocasiones en plásmidos y transposones, por lo que se diseminan rápidamente en los ambientes hospitalarios, además

generalmente estos genes codificantes de MBL están asociados a otros genes de resistencia en los mismos casetes, por lo cual las cepas portadoras aparecen con multirresistencia a los betalactámicos y a otras familias de antibióticos (Levy Hara et al., Morejon Garcia, 2012).

Actualmente se han descrito diversos grupos de genes de MBL siendo IMP, VIM los de mayor frecuencia en el mundo (Ellington et al., 2007; Cejas et al., 2008; Navarro, Calvo, Canton, Fernandez Cuenca, & Mirelis, 2011). Otros genes descritos son SPM (Brasil), GIM (Alemania), SIM (Corea), AIM (Australia), KHM (Japón), DIM (Holanda), NDM (Japón) y TMB (Libia). Entre las clases de MBL adquiridas y reportadas en *P. aeruginosa* están las tipo VIM, IMP, SPM, GIM, NDM y AIM (Mesaros et al., 2007, Perozo et al., 2013).

En el año 1991 en Japón se identificó en un aislado de *Serratia marcescens* y en *P. aeruginosa* la primera MBL adquirida, denominada IMP-1 (Pagniez et al., 2006; Cornaglia et al., 2011). En la actualidad se han reportado alrededor de 38 variantes, en distintos microorganismos y prácticamente en todo el mundo, aunque con una mayor predominancia por la región del sudeste asiático-Pacífico. A excepción de IMP-3, 5, 17, 23 y 24, el resto se han detectado en *Pseudomonas*. Otra variedad de MBL, reportada en diversos países son las tipo VIM, la VIM-1 se identificó en el año 1997 en Verona-Italia, en un aislado de *P. aeruginosa*, en la actualidad existen hasta 34 variantes. Las enzimas tipo VIM son las detectadas de forma más habitual en Europa, en donde la VIM-2 se ha convertido en predominante. De todas las variantes las VIM-1, 2, 4 y 6 se han detectado en *P. aeruginosa* y *P. putida*. Las IMP en general parecen tener una menor eficiencia en la hidrólisis que las VIM. Los grupos SPM, GIM y SIM, con un solo representante cada uno, parecen tener una distribución geográfica mucho más restringida que las IMP y VIM y sólo en el caso de SPM-1 se han detectado brotes por cepas portadoras. La identificación de SPM-1 (Sao Paulo metalo- β -lactamasa) se realizó en un aislado clínico de *P. aeruginosa* en 1999 (Toleman et al., 2002). Esta MBL presentó localización plasmídica, aunque no relacionada con integrones o elementos móviles y un porcentaje de identidad en aminoácidos del 35% con IMP-1. Hoy en día, esta MBL está ampliamente diseminada en

Brasil. GIM-1 se detectó en Alemania (German IMipenemase), en diferentes aislados clínicos de *P. aeruginosa*, presentando una identidad aminoacídica próxima al 40% con respecto a las MBL tipo IMP. En cuanto a sus características de hidrólisis de betalactámicos, GIM-1 mostró una menor actividad, en general, que el resto de MBL clínicamente relevantes. Finalmente, SIM-1 (Seoul IMipenemase) se ha detectado únicamente en *A. baumannii* en Corea, y presenta un 69% de identidad en aminoácidos con respecto a las IMP. La NDM se ha reportado en cepas de *K. pneumoniae* y en *P. aeruginosa*. Las MBL AIM-1 y DIM-1 se han detectado recientemente en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, en Australia y Holanda, respectivamente, pero la información disponible acerca de ellas es aún muy escasa (Cornaglia et al., 2011).

Los genes codificantes de enzimas tipo IMP, VIM y GIM-1, se encuentran insertados en Integrones clase 1, que por si solos no son móviles, pero frecuentemente se encuentran asociados a plásmidos de 120 a 180 kb o transposones, por lo tanto la transferencia y diseminación está asegurada en el ambiente hospitalario si no se toman las medidas de control adecuadas (Rojas Larios, 2009). De la misma manera esta propagación puede generar un grave problema de salud ya que son muy pocas las opciones terapéuticas restantes (Perozo Mena et al., 2013). En algunos casos se puede utilizar aminoglicósidos, fluoroquinolonas, pero estas familias de antibióticos tienen mayores porcentajes de resistencia en muchos centros hospitalarios, por lo tanto en algunas instituciones, las opciones terapéuticas se están restringiendo fundamentalmente a las polimixinas (colistina), drogas con una alta toxicidad. El colistín con frecuencia considerado como una opción desfavorable debido a su potencial toxicidad y a sus propiedades farmacocinéticas, muchas veces constituye el único antibiótico disponible para microorganismos productores de MBL, especialmente cuando se trata de cepas de *Pseudomonas* sp. Es así que el uso de colistina como monoterapia o como terapia combinada con un carbapenémico o un aminoglucósido se ha asociado con respuestas positivas en varios estudios. De todos modos, se debe tener presente que el uso empírico de colistín ha llevado a la emergencia de cepas de *K. pneumoniae* productoras de MBL resistentes a este antibiótico

y probablemente favorezca la aparición de otras especies bacterianas con resistencia a colistina (Cornaglia et al., 2011). Asimismo, se ha sugerido que la fosfomicina, un antibiótico casi olvidado, podría ser una opción terapéutica para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* y enterobacterias multirresistentes, incluidas las productoras de MBL. De todos modos, la escasa experiencia clínica disponible y el perfil de seguridad de la fosfomicina hacen necesaria la realización de más estudios sobre el tema.

2.2.3.5. Métodos de detección de MBL en el laboratorio.

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, además la posible inhibición por los diferentes inhibidores de β -lactamasas, la epidemiología local y la identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas. Por lo cual es esencial valorar la posible presencia de otros mecanismos de resistencia que puedan enmascarar el fenotipo que confieren las carbapenemasas, entre ellos la alteración de la permeabilidad de la membrana externa, la presencia de bombas de eflujo, la expresión de otras β -lactamasas (Navarro et al., 2011).

La sospecha de una cepa de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas de tipo MBL, se basa en un perfil “no sensible” a imipinem (IMI), meropenem (MER) y resistente a cefalosporinas antipseudomónicas con sensibilidad al aztreonam (AZT) (Nicolau & Oliver, 2010, Jimeno et al., 2010, Ministerio de Salud, 2014).

En la actualidad existen varios métodos para detectar MBL. Los métodos fenotípicos son los más accesibles a los laboratorios de diagnóstico microbiológico, siendo necesario ser confirmados por métodos moleculares que detecten la presencia de genes que codifican MBL

Los métodos fenotípicos, se basan principalmente en la capacidad de los agentes quelantes EDTA, mercapto acetato de sodio, ácido dipicolínico de inhibir la actividad de las MBL y luego estas se confirman por biología molecular (Arakawa et al., 2000). Entre los métodos más utilizados están, el *test* de sinergia de doble disco con EDTA, método del disco combinado con EDTA, método de E-test-MBL® con carbapenemes y EDTA (Navarro et al., 2011).

III.- METODOLOGÍA

3.1. Tipo de diseño.

Observacional descriptivo, serie de casos de tipo transversal.

3.2. Selección de la muestra.

3.2.1. Criterio de Inclusión:

Aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de muestras de secreción respiratoria, herida, orina y hemocultivo de pacientes hospitalizados “no sensibles” a carbapenemes (Imipinen, Meropenem) y resistente a ceftazidime.

3.2.2. Criterio de Exclusión:

Cepas repetidas o duplicadas de un mismo paciente durante el mismo periodo de hospitalización. Aislamiento de *P. aeruginosa* sensibles a carbapenemes y a Ceftazidime.

3.2.3. Ficha de datos del paciente:

Código de Muestra:	Diagnóstico clínico:
Nombres y Apellidos:	Tipo de muestra:
Edad:	Diagnóstico laboratorio:
Sexo:	Antibiograma:
Sala de Hospitalización:	Fecha de aislamiento.

Tipo de Muestreo: No probabilístico por conveniencia teniendo en cuenta los criterios de selección anteriormente mencionados.

3.3.- Aislamiento e Identificación de *P. aeruginosa*.

El aislamiento y la identificación de *P. aeruginosa* se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar Central, siguiendo la metodología convencional indicada en el Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias del Instituto Nacional de Salud (Instituto Nacional de Salud, 2001) y como control de calidad para todas las pruebas se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (American Type Culture Collection).

De Enero a Setiembre se aislaron en forma sucesiva 212 cepas de *P. aeruginosa*, provenientes de muestras clínicas procesadas en el laboratorio de Microbiología del HMC. Se encontró que de los 212 aislamientos de *P. aeruginosa*, 76 cumplieron el criterio de inclusión (“no sensibles” a imipinem, meropenem y resistentes a ceftazidime) por el método de susceptibilidad a los antimicrobianos por disco de difusión.

El número de cepas aisladas incluidas en esta tesis corresponden a 44 de secreción respiratoria, 16 de heridas; 12 de orinas y 4 de hemocultivos.

Las muestras clínicas que llegaron al laboratorio de Microbiología, fueron sembradas en agar Sangre, agar Mac Conkey, agar Dextrosa Sabouroud y agar Manitol Salado, se colocaron en incubación por 24 a 48 hrs a 35-37°C. Se seleccionaron las cepas sospechosas de *P. aeruginosa* y se realizó la tinción Gram.

Para la identificación bioquímica se utilizaron las siguientes pruebas:

Utilización de Glucosa y Lactosa.

Se realizó la siembra en estría y en profundidad en el medio Triple Sugar Iron (TSI) y luego se dejó en incubación a 35-37°C por 18 a 24 hrs. *P. aeruginosa* no fermenta glucosa ni lactosa, no presentando cambio de color en el medio TSI.

Prueba de la Oxidasa

Una colonia de la cepa sospechosa en agar agar Tripticasa Soya (TSA) se colocó sobre la superficie de la tira Bactident® Oxidasa impregnada con el reactivo (dicloruro de N, N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0,1 µmol; 1naftol; 1,0µmol) para la detección de citocromo oxidasa. La reacción se consideró positiva cuando a los 20 a 60 segundos viró a un color azul o violeta azulado. *P. aeruginosa* es oxidasa positiva.

Crecimiento a 42°C

La cepa sospechosa se sembró sobre agar TSA y se incubó a 42°C por 18–24 hrs. *P. aeruginosa* crece bajo esas condiciones.

Utilización de Citrato

Se sembró por estría en un tubo con agar Citrato de Simmons y se dejó por 18-24hrs a 35-37°C. La utilización del citrato se evidencia por un viraje del color de verde a azul por acción de los productos alcalinos derivados de la utilización del citrato haciendo virar al indicador. *P. aeruginosa* es citrato positivo.

Reducción de Nitrato a Nitritos

La cepa sospechosa se sembró en caldo con Nitrato, se incubó a 35°C por 16-24 hrs. Luego se agregó una gota del reactivo comercial

solución A (ácido sulfanílico) y solución B (alfa-naftilamina). La aparición de un color rojo indica positividad. *P. aeruginosa* da una reacción positiva.

Crecimiento en Agar Cetrimide

La cepa sospechosa se sembró por estría sobre la superficie del agar cetrimide, siendo selectivo para el crecimiento de *P. aeruginosa*. Este medio estimula la producción de pigmentos, que pueden visualizarse a la exposición de luz ultravioleta.

3.4.-Susceptibilidad Antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de disco de difusión, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute 2014 M 100–S24. (CLSI 2014) y el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión del Instituto Nacional de Salud (INS 2002).

Se utilizó como control positivo la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y como control negativo la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Preparación del Inóculo.

Se seleccionaron de 3 a 4 colonias del agar TSA y se preparó una suspensión bacteriana en un tubo con 4ml de suero fisiológico estéril. La suspensión fue inmediatamente ajustada haciendo uso de un turbidímetro al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland.

Siembra en Placas.

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias

veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Se sembró sobre la superficie de las placas de Agar Mueller Hinton, estriando con el hisopo en 3 direcciones. Se dejó secar a temperatura ambiente por 3-5 minutos hasta que el inóculo sea absorbido en la superficie.

Colocación de discos de antibióticos.

Se colocaron los discos de antibióticos (Bioanalyse®) sobre la superficie del agar sembrado con la ayuda de una pinza estéril. Se distribuyeron los discos a una distancia de 2.5 cm uno del otro. Los discos que se incluyeron fueron los que se indican en la Tabla N° 1.

Tabla N°1. Discos de antibióticos incluidos en la prueba de susceptibilidad con los diámetros de inhibición según CLSI 2014 (M 100–S24).

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	<u>Diámetro de halos de inhibición.</u>		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Amikacina (AK),	30µg	≥ 17	15-16	≤ 14
Aztreonam (AZT),	30µg	≥ 22	16-21	≤ 15
Cefepima (CEP),	30µg	≥ 18	15-17	≤ 14
Ceftazidima (CAZ),	30µg	≥ 18	15-17	≤ 14
Ciprofloxacina (CIP)	5µg	≥ 21	16-20	≤ 15
Colistin (C)	10µg	≥ 11	-	≤ 10
Gentamicina (GE),	10µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Imipenem (IMP),	10µg	≥ 19	16-18	≤ 15
Meropenem (MEM)	10µg	≥ 19	16-18	≤ 15
Piperacilina/tazobactam (PTZ)	100/10µg	≥ 21	15-20	≤ 14

Luego las placas fueron incubadas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la colocación de los discos.

Luego se midieron los halos de inhibición, se registraron y se interpretaron según los puntos de corte propuestos por el CLSI 2014 (M 100 –S24).

Los aislamientos resistentes a ceftazidima y no sensibles a imipinem y meropenem con halos menores o iguales a 22 mm, fueron consideradas sospechosas de producir carbapenemasas siguiendo las recomendaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS- -“Dr. Carlos G. Malbran” (Ministerio de Salud, 2014, Lucero, 2014). Estas cepas fueron seleccionadas y almacenadas para la detección fenotípica y molecular de MBL.

3.5. Detección Fenotípica de MBL. Test de Sinergia de doble disco con EDTA y recomendación del INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbran”

Se empleó una modificación del ensayo del *test* de Sinergia de doble disco descrito inicialmente por Arakawa y otros (2000), con las recomendaciones del INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbran” (Ministerio de Salud, 2014). La modificación consiste en ajustar las distancias entre los discos de imipinem, meropenem y EDTA en base a los diámetros de inhibición obtenidos en la susceptibilidad primaria de los discos de imipinem y meropenem, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Distancia entre el disco de carbapenem y el inhibidor} = \text{radio del halo de inhibición del carbapenem} + \text{radio del halo de Inhibición del inhibidor} + 5 \text{ mm.}$$

Las placas se inocularon según las recomendaciones del CLSI (2014) M 100 – S24, para la prueba de difusión por disco. Se realizó una suspensión de la cepa en solución salina y se llevó a la escala de 0,5 de Mc. Farland. Luego se sembró uniformemente sobre una placa con agar Mueller Hinton, se dejó secar por unos 3 a 5 minutos a medio ambiente y se colocaron los discos de EDTA (750ug), IMP (10 ug) y MEM(10 ug), todos a la distancia obtenida por la fórmula anterior descrita de centro a centro. Las placas se incubaron por 18 horas a 35°C. Luego se realizó la lectura y se interpretó como positivo al *test* de sinergia, cuando existía un agrandamiento o distorsión (efecto huevo) en los halos de inhibición de los disco de IMI o MER hacia el disco de EDTA. Esta prueba fenotípica positiva nos indica posible presencia de MBL.

3.6. Almacenamiento de Cepas

Las cepas seleccionadas se sembraron por estría sobre la superficie de placas con TSA. Se dejaron incubar a 37°C x 18-20hrs. Los aislamientos se suspendieron en 1,5 ml de caldo Trypticase Soya (CTS) con 15% de glicerol y fueron almacenadas a -20°C en crioviales por duplicado.

3.7. Reactivación de cepas

Las cepas de *P. aeruginosa* fueron descongeladas y reactivadas mediante la siembra en placas con agar TSA, luego se incubaron a 37°C x 18-20hrs, para ser utilizadas en las pruebas genéticas.

3.8. Detección Genotípica de MBL

La detección genotípica de enzimas Metallo β -lactamasas se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrion” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Obtención del DNA total:

Las cepas seleccionadas de *P. aeruginosa* se reactivaron en placas con agar TSA durante 18 hrs y se resuspendieron 10 colonias en 200 µl de agua miliQ estéril. Se sometieron a ebullición durante 15 minutos y se centrifugaron durante 2 minutos a 12,000 rpm, para descartar los restos celulares. Se conservó el sobrenadante a -20°C (Ellington et al., 2007, Saavedra et al., 2014).

Detección de la presencia de genes codificantes de MBL por Multiplex PCR

Se amplificaron los genes codificantes de las MBL para las familias más ampliamente diseminadas *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando múltiples oligonucleótidos cebadores utilizando como molde DNA total (Ellington et al., 2007). Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos cebadores (5'-3') (ver Tabla 2).

Tabla 2 **Secuencia de los iniciadores utilizados para la detección de MBL en *P. aeruginosa*, en la prueba de PCR multiplex y el tamaño del producto de amplificación. (Ellington et al., 2007).**

GEN	SECUENCIA	pb
IMP	F5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3'	188
	R5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'	
VIM	F5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3'	390
	R5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	

Mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer 10x	2.5
MgCl ₂ 50 Mm	1.25
dNTPs 10 Mm	1.00
Cebador F 10 pmol/ μl (IMP)	1.00
Cebador R 10 pmol/ μl (IMP)	1.00
Cebador F 10 pmol/ μl (VIM)	1.00
Cebador R 10 pmol/ μl (VIM)	1.00
DNA molde*	2.00
Agua miliQ estéril	14.05
Taq 5U/ μl	0.20
Volumen Total	25

***Ver 3.8-Obtención del DNA total.**

Los reactivos empleados fueron de Invitrogen (EUA). Se empleó un termociclador VERITI Applied Biosystem (EUA) y las condiciones de amplificación fueron:

Desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 36 ciclos de: desnaturalización 94°C por 30 segundos; hibridación 52°C por 40 segundos, amplificación 72°C por 50 segundos y un período final de elongación 72°C por 5 minutos (Ellington et al. 2007).

Los fragmentos esperados para los distintos productos de amplificación correspondientes a los genes codificantes de MBL fueron: IMP: 188 pb, VIM: 390 pb.

Detección de la presencia de genes codificantes de MBL tipo NDM por PCR.

Se amplificaron los genes codificantes de MBL tipo NDM por PCR empleando oligonucleótidos cebadores para la familia NDM, utilizando como molde DNA total (Pasteran F. y otros, 2012). Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos cebadores (5'-3') (ver Tabla 3).

Tabla 3. **Secuencia de los iniciadores utilizados para la detección de MBL tipo NDM en *P. aeruginosa*, en la prueba de PCR y el tamaño del producto de amplificación (Pasteran F et al., 2012).**

GEN	SECUENCIA	pb
NDM	F'5'- AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC-3' R 5'- GGC GTA GTG CTC AGT GTC -3'	512

Mezcla de reacción:

Reactivos	Volumen (µl)
Buffer 10x	2.50
MgCl ₂ 50 mM	0.75
dNTPs 10 mM	0.50
Cebador F 10 pmol/ µl (NDM)	0.50
Cebador R 10 pmol/ µl (NDM)	0.50
DNA molde*	2.50

Agua milliQ estéril	17.60
Taq 5U/ μ l	0.15
Volumen Total	25

***Ver 3.8-Obtención del DNA total.**

Los reactivos empleados fueron de Invitrogen (EUA). Se empleó un termociclador VERITI Applied Biosystem (EUA) y la siguiente reacción de amplificación:

Desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de: desnaturalización 94°C por 30 segundos; hibridación por 50°C por 30 segundos; amplificación 72°C por 60 segundos; y un período final de elongación 72°C por 10 minutos (Pasteran F et al., 2012).

El fragmento esperado para el producto de amplificación correspondiente al gen codificante de MBL NDM fue de 512 pb.

Análisis de resultados.

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en agarosa al 2% conteniendo *RedSafe*. Para ello, se mezcló 9 μ l de cada producto con 1 μ l de buffer de carga de ADN 10x y se sembró todo el volumen en el gel de agarosa. Se incluyeron marcadores de tamaño molecular de 50 pares de bases. Las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador UV Cleaver Scientific (UK).

Los fragmentos esperados para los distintos productos de amplificación correspondientes a los genes codificantes de MBL fueron: IMP: 188 pb, VIM: 390 pb, NDM: 512 pb.

3.9. Aspectos Éticos.

Los aislamientos de *P.aeruginosa* se obtuvieron de muestras clínicas procedentes de pacientes hospitalizados, a las cuales se les realizó el cultivo microbiológico como parte de los procedimientos clínicos habituales en el Laboratorio de Microbiología del HMC, por lo cual no se solicitó la autorización de los pacientes. Durante la realización del trabajo de investigación los datos de identificación de las cepas aisladas se manejaron de forma confidencial.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Se recolectaron 76 aislamientos clínicos no repetidos y consecutivos de *P. aeruginosa*, durante los meses de Enero a Setiembre del 2016. Todos los aislamientos cumplieron el criterio de inclusión para sospecha de cepas productoras de carbapenemasas: no sensibles a imipinem y /o meropenem, además de ser resistente a ceftazidime. Todos los aislamientos correspondieron a pacientes hospitalizados en el HMC.

Los aislamientos procedieron de las unidades hospitalarias de: Medicina 51 (67.11%) UCI 16 (21.05%), Cirugía 5 (6.58%), Neumología 2 (2.63%) y Ortopedia- Traumatología 2 (2.63%). (ver Figura 3).

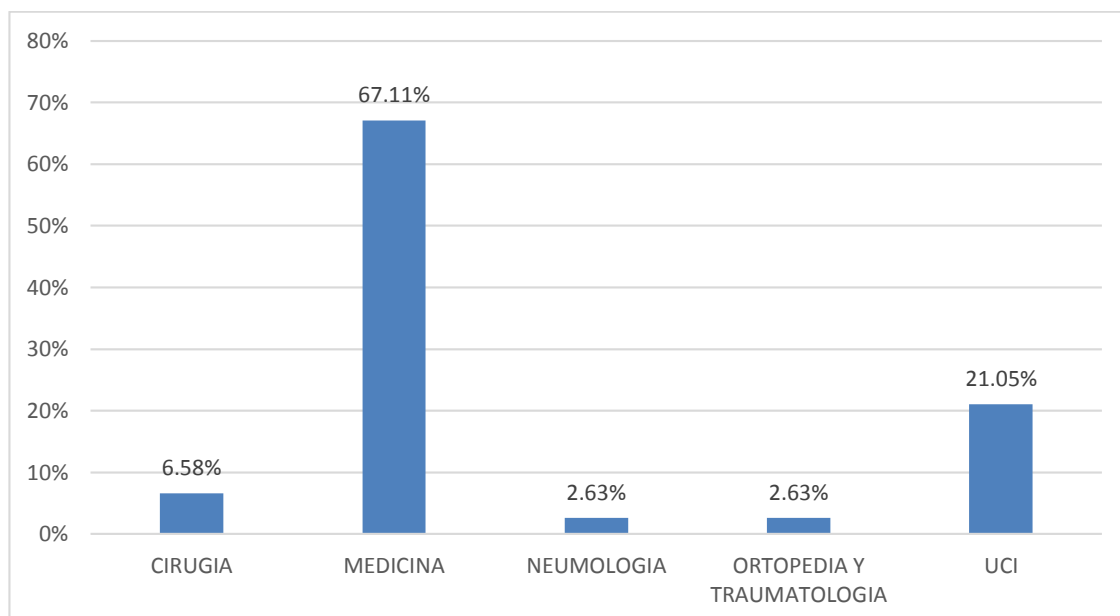


Figura 3. Distribución porcentual de los 76 aislamientos de *P. aeruginosa* por unidades de hospitalización.

El origen clínico de los 76 aislamientos de *P. aeruginosa* fueron en su mayoría muestras de secreción respiratoria 44 (57.90%); heridas 16 (21.05%); orinas 12 (15.79%) y hemocultivos 4 (5.26%). (ver Figura 4).

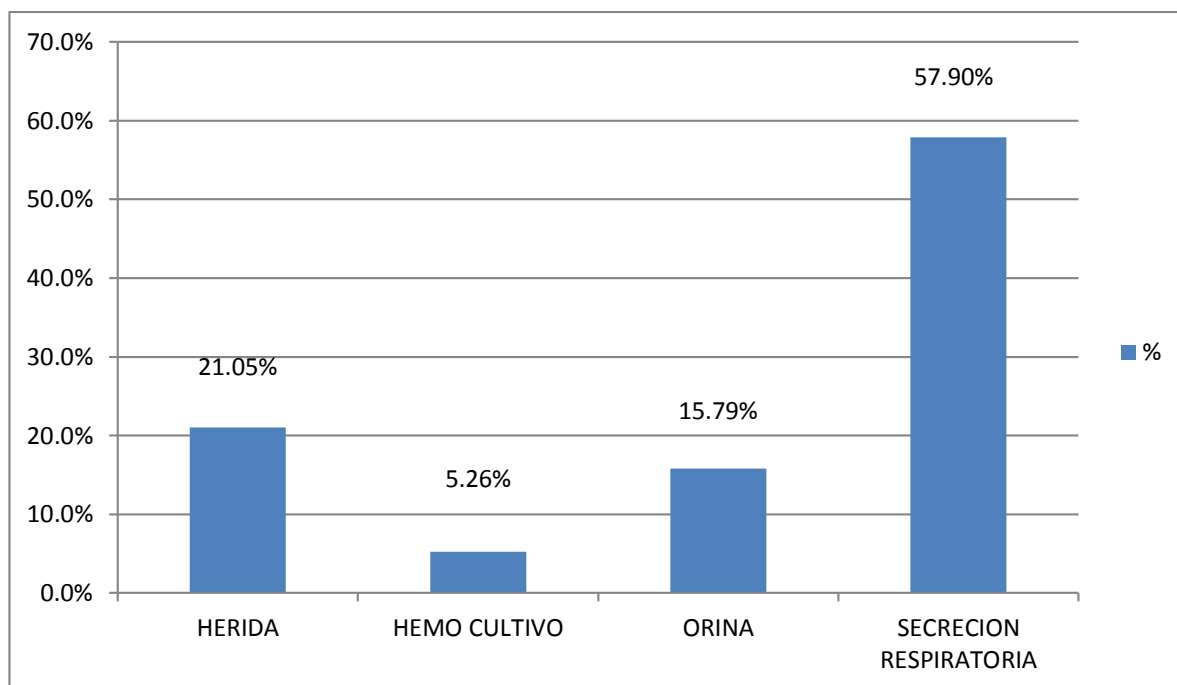


Figura 4. Distribución porcentual de los 76 aislamientos de *P. aeruginosa* según tipo de muestra.

Según las medidas de tendencia central la edad promedio de los pacientes fué de 63 años y la moda fue de 64, 84 y 87 años.

De los 76 aislamientos seleccionados de *P. aeruginosa* 13 (17.1%) correspondieron a pacientes femeninos y 63 (82.9%) pacientes masculinos.

En la detección fenotípica de MBL realizada a los 76 aislamientos de *P. aeruginosa*, resultaron positivos 25 (32.9%), los cuales mostraron sinergia con al menos uno de los dos carbapenemes y 51 (67.1%) resultaron negativos (ver Tabla 4 y Figura 5).

Tabla 4. **Detección fenotípica de MBL en 76 aislamientos de *P. aeruginosa*.**

Fenotipo MBL	N° de aislamientos (n=76)	%
Positivo	25	32.9
Negativo	51	67.1



Figura 5. **Aislamiento clínico de *P. aeruginosa* con prueba fenotípica positiva a MBL, al observarse sinergia entre los discos de EDTA e imipinem.**

La detección de genes codificantes de MBL en los 76 aislamientos de *P. aeruginosa* por el método confirmativo de PCR Multiplex, reveló 24/76 (31.58 %) aislamientos portaban genes codificantes para MBL. De ellos 23/24 (95.83%) portaron el gen *bla*_{IMP} codificantes de enzimas tipo IMP y 1/24 (4.17%) el gen *bla*_{VIM} codificante de la enzimas tipo VIM. No se detectó el gen *bla*_{NDM} (ver Tabla 5 y Figura 6).

Tabla 5. Detección molecular por PCR multiplex de genes codificantes de MBL en 76 cepas aislados de *P. aeruginosa*.

Gen	Número de aislamientos (n=76)	%
<i>bla</i> _{IMP}	23	30.26
<i>bla</i> _{VIM}	1	1.32
<i>bla</i> _{NDM}	0	0
Negativo	52	68.42

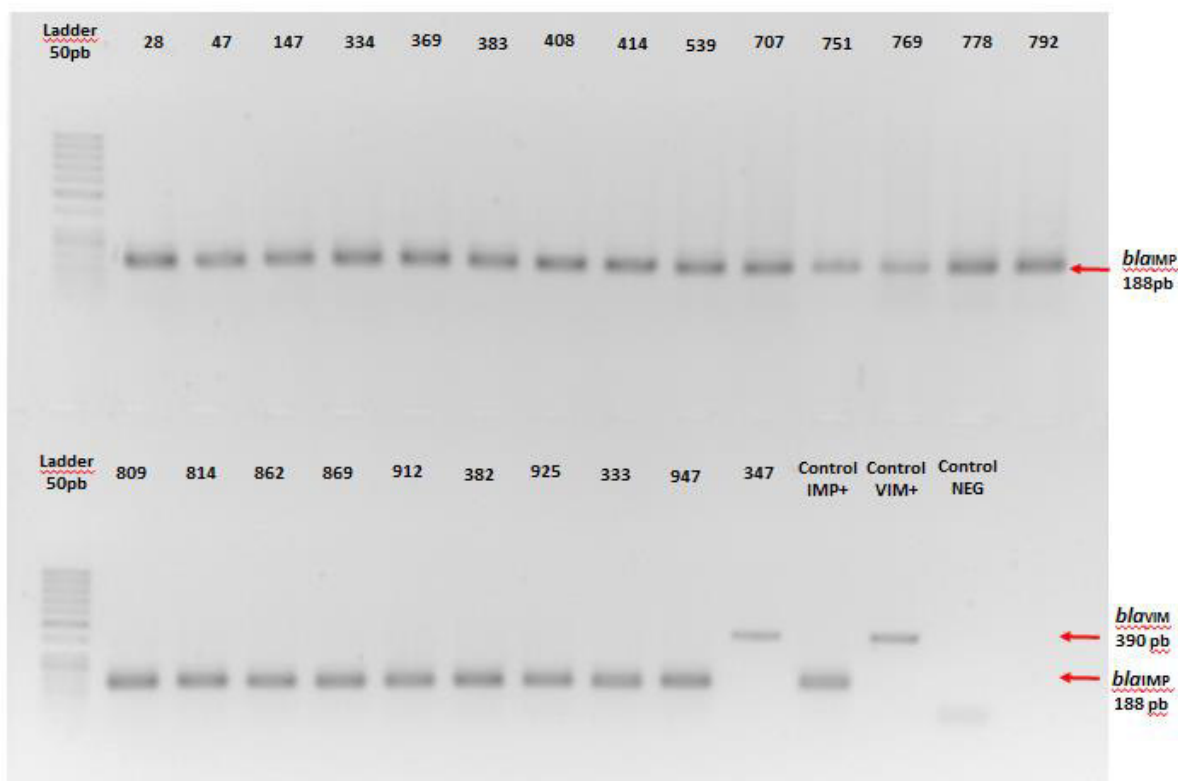


Figura 6. Electroforesis de la PCR multiplex para MBL de los 24 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para MBL. Control positivo IMP. Control positivo VIM. Ladder: Marcador de peso molecular de 50pb.

De los aislamientos de *P. aeruginosa* productora de MBL, el mayor número de aislamientos fué de la unidad hospitalaria de Medicina 18/24 (75.01%), seguida de la UCI 3/24 (12.51%) y luego con 1/24 (4.16%) de las unidades hospitalarias de cirugía, neumología y ortopedia-traumatología (ver Figura 7).

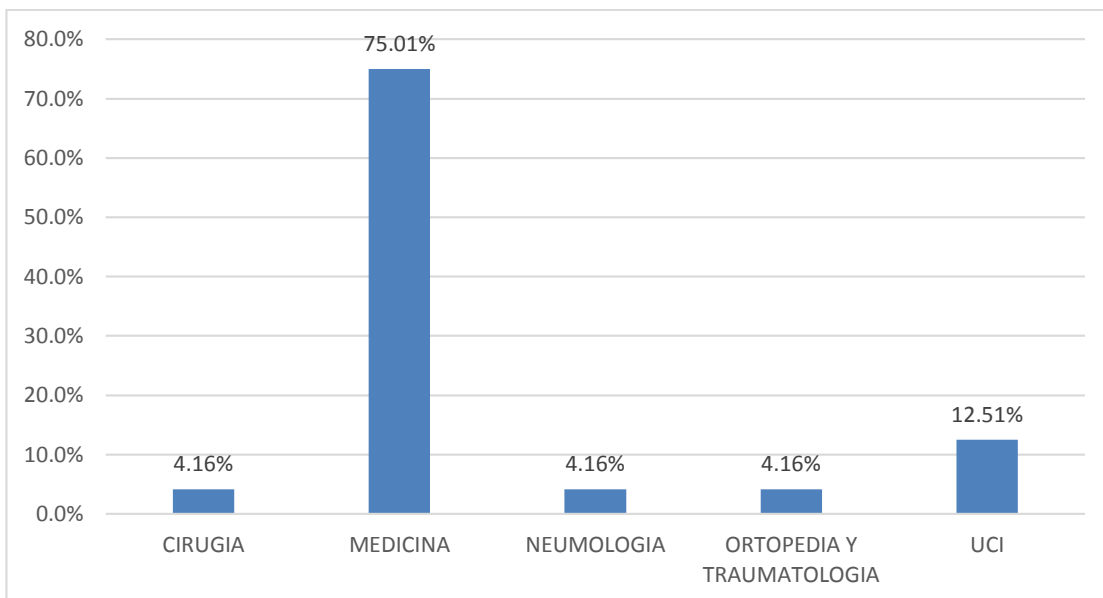


Figura 7. Distribución porcentual de los 24 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para MBL por unidades hospitalarias.

Los aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para MBL según tipo de muestra fueron: secreción respiratoria 13/24 (54.16%), herida 7/24 (29.17%), orina 3/24 (12.50) y hemocultivo 1/24 (4.17%) (ver Figura 8).

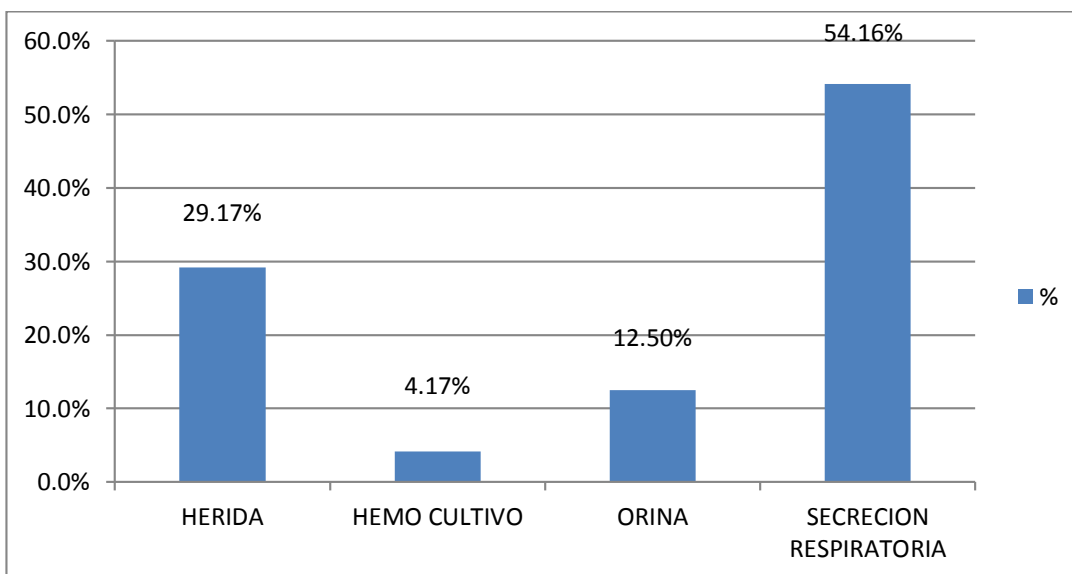


Figura 8. Distribución porcentual de los 24 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para MBL según el tipo de muestra.

De los 52/76 (68.42%) aislamientos negativos para genes de MBL por PCR, 1/76 (1.92%) resultó positivo por el método fenotípico. De acuerdo con esto, la sensibilidad de la prueba fenotípica fue del 100% y la especificidad del 98%.

Los 24 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para genes de MBL presentaron una resistencia marcada del 100% para meropenem, imipinem y ceftazidime. El 95.8% de los aislamientos fueron resistentes a cefepime, el 87.5 % a gentamicina y ciprofloxacina, el 83.3% para amikacina, el 33.3% a piperacilina-tazobactam, 12.5% fue resistente a aztreonam y el 100% fue sensible a Colistina (ver Tabla 6).

Tabla 6. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos en 24 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para MBL.

Antibiótico	Sensible %	Intermedio%	Resistente %
Meropenem	0	0	100
Imipinem	0	0	100
Ceftazidima	0	0	100
Cefepime	4.2	0	95.8
Gentamicina	4.2	8.3	87.5
Ciprofloxacina	8.3	4.2	87.5
Amikacina	12.5	4.2	83.3
Piperacilina/Tazobactan	25	41.7	33.3
Aztreonam	70.8	16.7	12.5
Colistina	100	0	0

Los datos epidemiológicos y el perfil de susceptibilidad de los 24 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* productores de MBL, se muestran en la Tabla 7.

Tabla N°7. Aislamientos de *P. aeruginosa* MBL positivo. Datos epidemiológicos y perfil de susceptibilidad.

N°	CEPA	SEXO	EDAD	UUHH	TIPO MUESTRA	GENO TIPO	FENOTI PO	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA (mm.) CLSI 2014.																							
								MRP	I	IMP	I	AZT	I	CO	I	PTZ	I	CAZ	I	CFP	I	AK	I	GE	I	CIP	I				
1	28	M	69	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	27	S	15	S	15	I	6	R	6	R	11	R	6	R	6	R				
2	47	M	26	MEDICINA	H	IMP	+	6	R	6	R	27	S	15	S	15	I	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
3	147	M	85	MEDICINA	H	IMP	+	6	R	11	R	26	S	17	S	14	I	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
4	334	M	82	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	27	S	16	S	11	R	6	R	6	R	14	R	6	R	16	I				
5	369	F	82	MEDICINA	O	IMP	+	6	R	6	R	23	S	15	S	13	R	6	R	6	R	17	S	6	R	6	R				
6	383	M	97	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	23	S	15	S	11	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R				
7	408	M	64	MEDICINA	H	IMP	+	6	R	14	R	28	S	15	S	27	S	6	R	8	R	23	S	10	R	30	S				
8	414	M	52	MEDICINA	SR	IMP	+	11	R	13	R	26	S	14	S	24	S	6	R	6	R	24	S	8	R	26	S				
9	539	M	89	UCI	SR	IMP	+	6	R	6	R	30	S	15	S	13	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
10	707	M	64	MEDICINA	H	IMP	+	6	R	6	R	30	S	15	S	15	I	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
11	751	M	75	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	14	R	15	S	12	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R				
12	769	M	56	UCI	SR	IMP	+	6	R	6	R	12	R	16	S	14	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
13	778	M	87	UCI	SR	IMP	+	6	R	6	R	15	R	15	S	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
14	792	M	66	MEDICINA	H	IMP	+	6	R	6	R	19	I	16	S	15	I	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
15	809	M	72	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	20	I	16	S	18	I	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
16	814	F	59	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	19	I	18	S	13	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
17	862	M	54	MEDICINA	H	IMP	+	6	R	7	R	26	S	14	S	25	S	6	R	10	R	12	R	13	I	6	R				
18	869	M	32	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	23	S	14	S	25	S	7	R	10	R	6	R	6	R	6	R				
19	912	F	55	MEDICINA	H	IMP	+	6	R	6	R	22	S	14	S	20	I	6	R	6	R	14	R	15	S	6	R				
20	382 H	M	37	MEDICINA	HEMO	IMP	+	6	R	6	R	18	I	16	S	16	I	6	R	6	R	10	R	8	R	6	R				
21	925	M	76	MEDICINA	SR	IMP	+	6	R	6	R	22	S	16	S	20	I	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R				
22	333	M	20	EUMOLOGI	SR	IMP	+	6	R	6	R	27	S	17	S	17	I	6	R	8	R	14	R	6	R	14	R				
23	947	M	90	TRA-ORT	O	IMP	+	7	R	6	R	24	S	14	S	25	S	6	R	13	R	12	R	12	R	6	R				
24	347	M	63	MEDICINA	O	VIM	+	14	R	10	R	23	S	16	S	21	S	14	R	18	S	15	I	13	I	15	R				

UUHH: Unidad hospitalaria; **UCI:** unidad de cuidados intensivos; **TRA-ORT:** Traumatología y ortopedia

Tipo de muestra: SR: Secreción respiratoria; H:herida; O:orina; HEMO:Hemocultivo.

Antibióticos: MRP:Meropenem; IMI: Imipinem; AZT: Aztreonam; CO: Colistina; PTZ: Pipecilina-Tazobactam; CAZ: Ceftazidime; CFP: Cefepime;

AK: Amikacina; GE: gentamicina; CIP: Ciprofloxacina.

I: Interpretación. **S:**Sensible, **I:**Intermedio, **R:**Resistente.

4.2. Discusión.

En este estudio se detectó la presencia de enzimas tipo MBL en aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de muestras clínicas de pacientes hospitalizados, utilizando el método fenotípico del *test* de sinergia de doble disco con la recomendación del INEI-ANLIS “Dr Carlos G. Malbran” en la colocación de discos de carbapenemes (Arakawa et al., 2000; Ministerio de Salud, 2014). Este método es de fácil realización en el laboratorio de microbiología y para la confirmación de la presencia de enzimas MBL se utilizó la prueba molecular genotípica de reacción en cadena de la polimerasa, en búsqueda de los genes codificantes de enzimas MBL.

De las 76 cepas seleccionadas por el criterio de inclusión (no sensible a imipinem y/o meropenem y resistente a ceftazidime), en la prueba fenotípica de sinergia con doble disco con EDTA, basada en la propiedad que las MBL son inhibidas por quelantes metálicos, (Arakawa et al., 2000; Radice et al., 2011) se encontró que el 32.9% (25/76) de aislamientos fueron positivos para la detección de carbapenemasas tipo MBL. Esta prueba tiene una alta especificidad y sensibilidad en la detección fenotípica de MBL en *P. aeruginosa* con reportes de sensibilidad de 96% y especificidad del 95%. (Yong et al., 2002, Perozo Mena et al., 2013). La modificación del *test* de sinergia según recomendación del Instituto Malbran, permitió hacer una fácil visualización de las sinergias entre los discos de imipinem, meropenem y EDTA, alcanzando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98% (Navarro et al., 2011).

Por otro lado, a todos los aislamientos (76) se les realizó la prueba molecular por PCR como método de confirmación para la detección de genes codificantes de MBL para las familias de genes de mayor importancia clínica *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, y *bla_{NDM}* por su frecuencia y diseminación en el mundo (Navarro et al., 2011). Se encontró que el 31.58% (24/76) portaban los genes codificantes de MBL. Esta frecuencia es mayor si la comparamos con el 15.7% reportado por Gonzales et al., 2013 en seis hospitales en Lima durante el año 2011. Así mismo, la frecuencia hallada en el HMC supera al 18.8% reportado

por Ríos Sanca, en el 2013 (Ríos Sanca, 2013) y el 21.7% reportado por Gonzales en el Instituto de Salud del Niño en el mismo año (Gonzales Escalante, www.insn.gob.pe, 2013). La variación de la frecuencia de genes codificantes de MBL es variable en los diferentes hospitales de Lima, debido a la epidemiología en cada hospital (Pagniez et al., 2006). Actualmente existen muy pocos estudios multicéntricos en nuestro país que permitan determinar la real frecuencia de este mecanismo de resistencia en el Perú.

Del 31.58% (24/76) de los aislamientos de *P. aeruginosa* con genes codificantes de MBL, la frecuencia del gen *bla_{IMP}* que codifica la enzima tipo IMP en los aislamientos de *P. aeruginosa* estudiados, fué de 95.83% (23/24) y de 4.17% (1/24) para el gen *bla_{VIM}*. No se detectó la presencia del gen *bla_{NDM}*. Estos datos concuerdan con los reportados por Gonzales quien reportó una frecuencia del 92% para genes *bla_{IMP}* y 8% para *bla_{VIM}*, Rios Sanca, solo reportó la presencia de genes *bla_{IMP}* no detectando genes *bla_{VIM}*, ni genes *bla_{NDM}*. Estos datos nos indican que en los hospitales de Lima circula con mayor frecuencia cepas de *P. aeruginosa* con genes codificantes de MBL tipo IMP y en menor frecuencia VIM, siendo estos últimos en porcentajes menores al 8%. Hasta la fecha, en nuestro país no hay reportes de la presencia de genes que codifican MBL de tipo NDM en *P. aeruginosa*, sin embargo se reportó en Junio del 2014 el primer caso de la enterobacteria *Proteus mirabilis* resistente a carbapenemasas de tipo NDM (Ministerio de Salud, 2014). La frecuencia de carbapenemasa MBL de la familia IMP por *P. aeruginosa* en el hospital pudo haber sido seleccionada por el uso de carbapenemes, fenómeno descrito previamente como un factor principal para que esta bacteria adquiriera la habilidad de producir nuevos mecanismos de resistencia. Según los reportes publicados en otros países como Venezuela, Torres Castillo (2005) demostró que de 100 cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenemes, el 40% presentaban resistencia a carbapenemes y de ellos el 25% portaban los genes de MBL de la familia VIM. En Brasil, los estudios realizados indican que el gen prevalente de MBL en diferentes regiones del país es SPM-1 (Magalhaes et al., 2005). En Argentina, Pagniez et al., (2006), y Cejas et al., (2008); reportaron una incidencia de MBL de 11% y 14% respectivamente, las enzimas reportadas fueron de tipo VIM en el

trabajo de Pagniez et al., y de tipo IMP en el caso de Cejas et al. En Chile, Perez et al, reportaron una incidencia de MBL en 18.6% del tipo VIM (2008).

La discordancia encontrada en los métodos fenotípico y genotípico utilizados, presentó un falso positivo en el *test* de sinergia con EDTA. Esta discordancia ha sido reportada tanto para *P. aeruginosa* como en *Acinetobacter baumannii* en la detección de MBL (Navarro et al., 2011). Sin embargo es una prueba que por su alta sensibilidad, especificidad y fácil procedimiento puede ser implementada en los laboratorios de microbiología ante la sospecha de aislamientos productores de MBL.

El 68.42% (52/76) de aislamientos de *P. aeruginosa* fueron negativos para la detección de genes *bla_{AMP}*, *bla_{VIM}*, y *bla_{NDM}*, esto puede deberse a la acción de otros mecanismos de resistencia a carbapenemes diferentes a MBL no pudiendo ser detectadas por los métodos fenotípicos y genotípicos utilizados en este trabajo y que han sido reportados en *P. aeruginosa*, tal es el caso de las carbapenemasas clase A o D. Sin embargo cabe destacar que la frecuencia de aislamientos de otros tipos de carbapenemasas en *P. aeruginosa* diferentes a MBL es baja, por lo que no se ve comprometida la especificidad de los métodos empleados (Perozo et al., 2013). Otro punto a considerar es la presencia de otros mecanismos de resistencia que presenta *P. aeruginosa* a los carbapenemes, diferentes a la acción hidrolítica de carbapenemasas, es decir debido a la sobreexpresión de bombas de eflujo dando resistencia a meropenem, cambios en la permeabilidad de la membrana mediante la pérdida de la porina OprD dando resistencia a imipinem, por la presencia de β lactamasas de espectro extendido tipo GES o por la sobreexpresión de la β -lactamasas AmpC (Pagniez et al., 2006).

De los 24 aislamientos de *P. aeruginosa* MBL positivo, el mayor número de aislamientos fué de la unidad hospitalaria de Medicina 18/24 (75.01%), seguida de la UCI 3/24 (12.51%) y luego con 1/24 (4.16%) de las unidades hospitalarias de cirugía, neumología y ortopedia-traumatología. Estos resultados difieren a los reportados por Cejas et al (2008) quienes reportan

una frecuencia de 77.8% de aislamientos de *P. aeruginosa* en UCI del Hospital "Eva Perón".

Una de las características de las MBL es la hidrólisis a todos los β -lactámicos excepto el aztreonam (Gutkind et al., 2013), por lo que se utiliza como indicativo de posible presencia de MBL. En el presente estudio, los aislamientos que presentaron los genes codificantes de MBL fueron el 70.83% (17/24) sensibles al aztreonam, por lo que se comprueba ser un buen indicador de la presencia de enzimas MBL, además de sugerir que los aislamientos solo presentan el mecanismo de resistencia a carbapenemes por enzimas MBL. El resto de aislamientos fueron resistentes o intermedios en la susceptibilidad a este antibiótico, esto nos estaría indicando que dichos aislamientos estarían presentando además otros mecanismos de resistencia que involucra al aztreonam, pudiendo ser la expresión de β -lactamasas de espectro extendido o la sobreexpresión de las bombas de eflujo. Por lo tanto, la resistencia al aztreonam en *P. aeruginosa* no descarta la presencia de MBL y la sensibilidad al mismo resulta un buen predictor de la presencia de este tipo de MBL (Pagniez et al., 2006; Nicolau & Oliver, 2010).

En cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos, de los 24 aislamientos de *P. aeruginosa* MBL positivas, se encontró que hubo una resistencia del 100% a meropenem, imipinem, ceftazidime por la hidrólisis de las MBL sobre carbapenemes y cefalosporinas. Además todos los aislamientos productores de MBL fueron MDR, por presentar resistencia a tres familias de antibióticos diferentes, siendo el 95% resistentes a cefepime, el 87.5% gentamicina y ciprofloxacina, el 83.3% amikacina. Los genes *bla* que codifican MBL pueden coexistir con otros genes que codifican resistencia a aminoglucósidos y estar localizados en los casetes génicos dentro de integrones en transposones o plásmidos. (Estepa, 2014, Rojas Larios, 2009; Nicolau & Oliver, 2010; Radice et al., 2011; Ministerio de Salud, 2014). La resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa* podría deberse a la hiperexpresión de bombas de expulsión activa MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM presentes en *P. aeruginosa* (Navarro et al., 2011).

Por otro lado se encontró una sensibilidad del 100% a la colistina, este es un antibiótico de última línea utilizado en el tratamiento de infecciones multirresistentes incluyendo infecciones de *P. aeruginosa* MDR. (Lloria, 2009). Sin embargo hay que tener en cuenta que se ha reportado resistencia a colistina en cepas de *E. coli* y *Salmonella*, en infecciones invasivas de pacientes hospitalizados, capaces de diseminar a otras bacterias su mecanismo de resistencia, pudiendo incluir a *P. aeruginosa*; esto ha originando que la OPS/OMS emitieran la alerta epidemiológica de enterobacterias con resistencia transferible a colistina, publicada el 10 de junio 2016 (OPS/OMS, 2016).

De los resultados obtenidos, se ha determinado la existencia de enzimas MBL en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en pacientes hospitalizados del HMC, encontrándose un 75.5% de aislamientos en la unidad hospitalaria de Medicina, siendo el 54.17% de la muestras de secreciones respiratorias. Estos datos van a permitir poner en conocimiento a todo el personal involucrado en el tratamiento de pacientes hospitalizados del HMC, la existencia de genes que hidrolizan carbapenemes y que son altamente transmisibles a otras bacterias, pudiendo generar una emergencia por bacterias MDR en el hospital. Los datos obtenidos permitirá corregir los protocolos a seguir en el programa de control de infecciones nosocomiales así como fortalecer la vigilancia epidemiológica de bacterias multirresistentes, para prevenir la diseminación en el hospital, además de un uso adecuado de los carbapenemes.

V.- CONCLUSIONES

El 31.58% de los aislamientos de *P. aeruginosa* del HMC colectadas de pacientes hospitalizados de enero a setiembre 2016 “no sensibles” a imipinem, meropenem y resistentes a ceftazidime presentan enzimas carbapenemasas tipo MBL.

Los genes *bla*_{IMP} fueron los más prevalentes con un 95.83% (23/24) de todos los aislamientos de *P. aeruginosa* productora de MBL, mientras que el 4.17% (1/24) fue el gen *bla*_{VIM}. No se detectó la presencia de genes codificantes *bla*_{NDM}.

El 100% de los aislados de *P. aeruginosa* productoras de MBL fueron resistentes a meropenem, imipinem y ceftazidime. Porcentajes superiores al 83.3% fueron resistentes a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina. El 100% fué Multidrogorresistentes.

La unidad hospitalaria con mayor prevalencia de *P. aeruginosa* productoras de MBL, es la de medicina con un 75.01% de los aislamientos, seguida de la unidad de cuidados intensivos con un 12.51%.

El tipo de muestra de la que se aisló con mayor frecuencia *Pseudomonas aeruginosa* con genes codificantes de MBL, fueron las secreciones respiratorias en un 54.16% de los aislamientos, seguidas de las muestras de heridas con 29.17%.

VI.- RECOMENDACIONES

Se recomienda que todos los aislamientos no susceptibles a imipenem, meropenem y resistentes a ceftazidime sean evaluados de forma rutinaria para determinar la posible presencia de enzimas MBL, utilizando los métodos fenotípicos que muestran alta sensibilidad y especificidad, como se ha demostrado en este trabajo. La detección rápida y oportuna de *P. aeruginosa* productora de MBL es necesaria para que los comités de prevención y control de infecciones nosocomiales y de uso de antimicrobianos, puedan establecer las medidas de control y aislamiento necesarias para los pacientes y así evitar la diseminación de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes a otros pacientes.

La implementación del mapa microbiológico proporciona el conocimiento de la epidemiología y de los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos propios de cada hospital, proporcionando la información necesaria para una terapia adecuada en pacientes con infecciones por bacterias multirresistentes incluyendo *P. aeruginosa*.

Identificar si los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* productoras de MBL encontradas, corresponden a un mismo patrón clonal y así determinar la transferencia de la resistencia de tipo horizontal.

Investigar en aislamientos de *P. aeruginosa* MDR, la presencia de genes que codifican otras carbapenemasas diferentes de MBL, como es las de clase A (KPC, SME, GES) y clase D (OXA), también reportadas en *P. aeruginosa*.

VII.- REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

1. Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H ... Goto, M. (2000). Convenient Test for screening Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (1),40-43.
2. Cejas, D., Almuzara, M., Santella, G., Tuduri, A., Palombarani, S., Figueroa, S...Radice, M. (2008). Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(4), 238-245.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S24 (2014). Performance standars for antimicrobial susceptibility testing; Twenty fourth informational supplement. *Disk diffusion and MIC testing*. Wayne, PA:CLSI.
4. Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. M. (2011). Metallo- β -Lactamasas: A last frontier for Beta-Lactams? *Lancet Infectious Diseases*, 11(5), 381-393.
5. Cuesta, D., Vallejo, M., Guerra, K., Cardenas , J., Hoyos, C., Loaiza, E., y Villegas, M. (2012). Infección Intrahospitalaria por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: estudio de casos y controles. *MEDICINA U:P:B*, 31(2), 135-142.
6. De Gante-Martinez, E., & De Gibes-Nuñez, J. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* y la Implicación de los Mecanismos de Resistencia. *Sociedad Médica del Hospital General de Culiacán "Dr. Bernardo J. Gastélum"*, 5(3), 80-85.
7. Diaz Jimenez, V. (2008). Un reto y una preocupacion actual: *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, XX(86), 37-39.

8. Díaz Tello, J. A. (Octubre de 2008). *Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en Pseudomonas aeruginosa resistentes a los carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008* .(Tesis Magister en Microbiología) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
9. Ellington, M. J., Kistler, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamasas. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 321-322.
10. Estepa, V. (Junio de 2014). *Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de Pseudomonas aeruginosa de diferentes orígenes*. Tesis Doctoral, Universidad de la Rioja, Logroña, España.
11. Gales, A. C., Jones, R. N., Turnidge, J., Rennie, R., & Ramphal, R. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: Patteins, and Molecular Typing in the Global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clinical Infectious Diseases*, 15(32) Suppl 2, 146-155.
12. Garcia Apac, C. (2012). Resistencia Antibiótica en el Perú y America Latina. *Acta Medica Peruana*, 29(2), 99-103.
13. García, C., Astocondor, L., & Banda, C. (2012). Enterobacterias productoras de β lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Medica Peruana*, 29(3), 163-169.
14. Gomez Alvarez, C. A., Leal Castro, A., Pérez de Gonzalez, M., & Navarrete Jiménez, M. (2005). Mecanismos de Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: Entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, 53(1), 27-34.
15. Gonzales Escalante, E. (2012). Metallo- β -lactamasas: ¿el fin de los β -lactámicos? *Revista Peruana de Epidemiología*, 16(3), 8pp.

16. Gonzales Escalante, E. (2013). Detección y Caracterización molecular de metalobetalactamasas. Obtenido de www.insn.gob.pe: http://www.insn.gob.pe/investigaciones/sites/default/files/Informe%20Final%20TO-02-2011.pdf.
17. Gonzales Escalante, E., Vicente Taboada, W., Champi Merino, R., Soto Pastrana, J., Flores Paredes, W., Lovera Garcia, M., Leon Sandoval, S. (2013). Metallo- β -Lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 30(2), 241-245.
18. Gutkind, G. O., Di Conza, J., Power, P., & Radice, M. (2013). β -lactamase-mediated Resistance: A Biochemical, Epidemiological and Genetic Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 19(2) 164-208.
19. Instituto Nacional de Salud (INS). (2002). Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de Disco de Difusión. Serie de Normas Técnicas N°30. Lima, Perú.
20. Instituto Nacional de Salud. (INS) (2001). Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. Serie de Normas Técnicas N°28. Lima, Perú.
21. Jain, A., Hopkins, K. L., Turton, J., Doumith, M., Hill, R., Loy, R., Woodford, N. (2014). NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 1777-1784.
22. Jimeno, A., Alcalde, M. M., & Blázquez, A. (2010). Detección de un brote epidémico por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa. *Revista Clínica Española*, 211(4), 187—191.
23. Kathleen, L., Kathleen, F., Giger, O., Cooper, H., Cutler, C., Inmermam, M., & Kim, Y. (2015). The First New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) *Pseudomonas aeruginosa* outbreak identified in the United States in an acute care hospital. *American Journal of Infection Control*, 43,18-73.

24. Levy Hara, G., Gould, I., Endimiani, A., Ramon Pardo, P., Daikos, G., Po-Ren, H., Savio, E. (2012). Manejo y prevención de las Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas. Obtenido de cocemi.com.uy:
<http://www.cocemi.com.uy/docs/KPC%20multisociedades2012.pdf>
25. Livermore, D. M. (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst Nightmare. *Clinical Infectious Diseases*, 34(1), 634-640.
26. Lucero, C. (Agosto de 2014). Fenotipos inusuales de mecanismos de resistencia críticos no incluidos en las recomendaciones actuales: ¿cuándo creer en ellos?. Mesa Redonda presentado en el XV Jornadas Argentinas de Microbiología: JAM 2014, 14-16 Agosto. Cordova, Argentina. Obtenido de http://www.aam.org.ar/otras_publicaciones.php
27. Luján Roca, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso . *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), 465-474.
28. Lloria, M. (2009). Infectología Crítica a distancia. *Manejo de las Infecciones por Organismos Multirresistentes*. Buenos Aires: CicSati2009.
29. Magalhaes, V., Lins, A., & Magalhaes, M. (2005). Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 123-125.
30. Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Bambeke, F., (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(6), 560-578.
31. Ministerio de Salud. (Agosto de 2014). Boletín Epidemiológico (Lima). Enterobacterias resistentes a carbapenems, un desafío para la atención hospitalaria Lima, Perú. 23 (34), 667-668.
32. Ministerio de Salud. (2014). Protocolo para la detección de Kpc en enterobacterias. Lima, Perú.

33. Morejon Garcia, M. (2012). Carbapenemasas, una amenaza actual. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, 11(4), 2613-2618.
34. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Tenover, M. C. (2010). *Microbiología Médica* (7ma ed). Barcelona, España: Mosby Inc .
35. Navarro, F., Calvo, J., Canton, R., Fernandez-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7), 524-534.
36. Nicolau, C., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(Supl 1),19-28.
37. Nuñez, L., Soto, A., Calmet, E., Castillo, M., & Casalindo, E. (2001). Evaluacion clínica y de laboratorio de las infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa* en el hospital Arzobispo Loayza. *Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*,1(4) s/p.
38. Ochoa, S., Lopez Montiel, F., Escalona, G., Cruz Cordova, A., Davila, L., Lopez Martinez, B., Xicohttencatl Cortes, J. (2013). Características patogenicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemicos, asociados con la formacion de biopelículas. *Boletín Medico Hospital Infantil de Mexico*, 70(2), 138-150.
39. OPS/OMS. (22 de Noviembre 2011). Primer hallazgo de carbapenemasas de tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM) en Latinoamérica. Alerta Epidemiológica. Washington, Estados Unidos. Recuperado http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24472&Itemid=270
40. OPS/OMS. (10 de Junio de 2016). Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas. Alerta Epidemiológica. Washington, Estados Unidos.

Recuperado <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2016/06/Enterobacterias-con-resistencia-transferible-a-colistina.pdf>

41. Pagniez, G., Radice, M., Cuirolo, A., Rodríguez, O., Rodríguez, H., Vay, C., Gutkind, G. (2006). Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 33-37.
42. Pasteran, F. (2014). Alerta Epidemiologica: Diseminación de Carbapenemasas. Buenos Aires, Argentina. Recuperado . http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/diseminacion_de_carbapenemasas.pdf
43. Pasteran, F., Albornoz, E., Faccone, D., Gomez, S., Valenzuela, C., Morales, M., Corso, A. (2012). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1795-1797.
44. Perez, A., Garcia, P., Poggi, H., Braun, S., Castillo, C., Roman, J. C., Gonzales R, G. (2008). Presencia de metalo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipinem. *Revista Médica de Chile*, 136, 423-432.
45. Perozo Mena, A., Castellano Gonzales, M., Tutaya Chavez, K., Ling Toledo, E., & Arraiz, E. (2013). Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera*, 41(2), 115-126.
46. Radice, M., Marin, M., Giovanakis, M., Vay, C., Almuzara, M., Limansky, A...Gutkind, G. (2011). Criterios de ensayo, interpretacion e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibioticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clinica:recomendaciones de la subcomision de antimicrobianos de la SADEBAC- AAM. *Revista Argentina de Microbiologia*, 43, 136-156.

47. Ríos Sanca, P. A. (2013). *Frecuencia de los genes bla IMP, bla VIM y bla NDM productores de metalo- β -Lactamasas en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa no sensibles a Carbapenems en Lima-Peru.* (Tesis para optar licenciatura en Tecnología Médica) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Peru.
48. Rojas Larios, F. (Febrero de 2009). *Identificación de genes responsables de resistencia a carbapenémicos en cepas nosocomiales de Pseudomonas aeruginosa aisladas de algunos hospitales de Mexico.* (Tesis de Maestro en Ciencias Médicas) Universidad de Colima, Mexico.
49. Saavedra, S., Duarte, C., Gonzales, M., & Realpe, M. (2014). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica*, 34(Supl1), 217-223.
50. Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa: A review of their pathogenesis and prevalence clinical setting and the environment.* *Infection Epidemiology and Medicine*, 2(1), 25-32.
51. Toleman, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., & Walsh, T. R. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), 673-679.
52. Torres Castillo, L. C. (2005). *La era de las carbapenemasas*, presentado en XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr. Vidal Rodríguez Lemoine" Sociedad Venezolana de Microbiología, 9-11 Noviembre, Cumaná Venezuela.
53. Vasil, M. L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology.* *The Journal of Pediatrics*, 108(5), 800-805.
54. Vilar Compete, D., Jacquemin, B., Diaz-Gonzales, A., Velasquez, C., & Volkow, P. (2003). Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de

atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. *Salud Pública de México*, 45(5), 371-378.

55. Villamil Gomez, W., Villareal, C., & Botia, I. (2011). Brote por *Pseudomonas* en una unidad de diálisis peritoneal de Sucre. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 6(2), 17-23.
56. Weiner, L., Webb, A., Limbago, B., Dudeck, M., Patel, J., Kallen, A., Edwards, J., Sievert, D. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 37(11), 1288-1301.
57. Yong, D., kyungwon, L., Hwa Yum, J., Bong Shin, H., Rossolini, G., & Chong, Y. (2002). Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp* an *Acinetobacter spp*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3798-3801.