



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CMNSXXI
SILVESTRE FRENK FREUD.**

**TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN
INFECTOLOGIA.**

**Caracterización clínica, fenotípica y genotípica de *Pseudomonas
aeruginosa* aisladas en
Hemocultivos en un hospital pediátrico de tercer nivel.**

Presenta:

Dr. Dassaev Izelo Flores

Tutor:

Dra. María Guadalupe Miranda Novales*

***Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria IMSS.**

Cotutor:

Dra María del Rosario Morales Espinosa**

****Laboratorio de genómica Bacteriana Facultad de Medicina UNAM.**

COMITÉ TUTOR (Colaboradores)

Dra. en C. Gabriela Delgado Sapien. UNAM**

Biólogo José Luis Méndez Sánchez. UNAM**

****Laboratorio de genómica Bacteriana Facultad de Medicina UNAM.**

Mexico D.F. Febrero del 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	Página
1.RESUMEN	1
3.ANTECEDENTES	2
4.JUSTIFICACIÓN	9
5.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
6.OBJETIVO	10
7. MATERIAL Y MÉTODOS.	11
Lugar de estudio	11
Diseño del estudio	11
Universo de estudio	11
Criterios de inclusión	11
Criterios de eliminación	11
Definición de variables	12
Descripción general del estudio	15
Tamaño de muestra	16
Análisis estadístico	16
Aspectos éticos	17
Recursos humanos y financieros	18
8.- RESULTADOS	19
9.- DISCUSIÓN	27
10.- CONCLUSIÓN	30
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	31
12.- ANEXO 1. Primers para identificar islas genómicas y genes de virulencia.	35
13.- ANEXO 2. Métodos de cultivo de identificación	36
14.- ANEXO 3. Identificación de islas genómicas y genes de virulencia	37

Pseudomonas aeruginosa

Resumen. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno con alta morbi-mortalidad. Su caracterización fenotípica y genotípica permite reconocer sus mecanismos de virulencia, patogenicidad y resistencia, y su caracterización clínica su comportamiento y desenlace en pacientes pediátricos. **Planteamiento del problema:** En la práctica diaria hospitalaria se presentan aislamientos con distintos perfiles de resistencia antimicrobiana, algunos con multiresistencia, por lo que nos planteamos la siguiente interrogante; ¿Cuáles son las características genotípicas y fenotípicas de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de hemocultivos y cuál es el comportamiento clínico de la infección? **Objetivo:** Caracterizar genotípica y fenotípicamente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de hemocultivos y describir el comportamiento clínico. **Material y métodos. Diseño del estudio:** Transversal descriptivo. **Criterios de inclusión.** Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes con sepsis. **Criterios de eliminación:** Expediente incompleto que impida recabar la información para el comportamiento clínico. Se realizó caracterización genotípica a través de electroforesis en gel por campos pulsados y la detección de islas genómicas y genes de virulencia mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa tiempo final), se identificaron fenotípicamente con base al perfil de susceptibilidad y se describió el comportamiento clínico. **Análisis estadístico:** Se empleó estadística descriptiva con cálculo de frecuencias simples y porcentajes. El estudio se clasificó como sin riesgo, ya que se emplearon cepas previamente aisladas e información previamente registrada en el expediente clínico. **Resultados:** Se estudiaron 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI de octubre 2011 a mayo 2014. Se incluyó una cepa por paciente. El 65% de los pacientes eran de sexo masculino, la mediana para la edad fue de 5 años 5 meses. El 52% de los pacientes tenían diagnóstico hemato-oncológico y la sepsis relacionada a colonización de catéter se encontró en un 55% y los pacientes con evento de neutropenia y fiebre en 41%. El 33% de los pacientes presentaron datos de sepsis, 43% sepsis grave y el 24% choque séptico, la letalidad se reportó en 15%. Las cepas fueron sensibles a ciprofloxacino en 98%, piperacilina tazobactam en 96%, cefepime en 94%, meropenem 84%, imipenem 71% gentamicina 96% y amikacina 90%, solo una cepa resultó ser Pandrogoresistente. Se identificaron 7 clonas mediante la electroforesis en gel por campos pulsados las cuales no presentaban relación, inclusive en aquellas aisladas en pacientes con infecciones nosocomiales. Con respecto a los genes de virulencia, 100% de las cepas contienen los genes de virulencia *toxA*, *toxR*, *algR*, *lasB*, *lecA*, *plcH*, *phzA1* y *pil-A*. La frecuencia de islas genómicas fue baja, en ninguna cepa se encontraron todas las islas y el número mayor de islas fue de 5 en solo una cepa. La isla PAPI-2 se encuentra en el 100% de las cepas estudiadas, la isla PAPI-1 en el 49% y PAPI-1 en el 47% de las cepas las cuales están asociadas con mayor virulencia los pacientes que fallecieron no presentaron un mayor número de islas genómicas aunque están presentes en todas las cepas la isla PAPI-2 y PAPI-1. **Conclusión:** Encontramos que las *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes pediátricos que cursaron con sepsis, presentan con mayor frecuencia las islas genómicas PAPI-2 y PAPI-1 y PAPI-1. Estas cepas no tienen perfil de multiresistencia y la mayoría son sensibles a antimicrobianos de primera línea, no hay clonas predominantes en nuestra unidad hospitalaria a pesar de que más de la mitad son de origen nosocomial, identificadas principalmente en sepsis relacionada a catéter. La mayoría de las defunciones se presentaron en pacientes con neutropenia.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, islas genómicas, electroforesis en gel por campos pulsados, resistencia antimicrobiana.

Antecedentes.

Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son microorganismos ubicuos que se encuentran en la tierra, en la materia orgánica en descomposición, en la vegetación, en el agua, y también en el ambiente hospitalario. Son capaces de utilizar un amplio rango de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos y vivir bajo diversas condiciones ambientales, las sencillas necesidades de crecimiento y la versatilidad nutricional hacen posible su amplia distribución ambiental. Su plasticidad genética es amplia, crecen rápidamente y pueden metabolizar una amplia variedad de substratos incluyendo compuestos orgánicos tóxicos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, algunas especies pueden utilizar carbohidratos, alcoholes y aminoácidos como fuente de carbono. Son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos.¹

Pseudomonas pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*.² *Pseudomonas aeruginosa* fue aislada por primera vez de muestras ambientales en 1887 por Schroeter. Debido a sus colonias pigmentadas la denominación de la especie deriva de la palabra aeruginoso (*aeruginous*), que significa el color del cobre oxidado, reflejando su característico color azul verdoso.³ Es una bacteria cosmopolita; produce infecciones de tipo nosocomial en pacientes con algún grado de inmunocompromiso y en quienes padecen fibrosis quística en los cuales produce infecciones crónicas.⁴ Son bacilos Gram-negativos aerobios, formadores de esporas, presenta una medida de 1.5 a 5 micras de largo y un diámetro de 0.5 a 1.0 micras, son móviles debido a la presencia de flagelos polares permitiéndoles responder a estímulos químicos y localizar substratos en bajas condiciones habitualmente se dispone en pares. Es oxidasa y catalasa positiva, la mayoría de especies del género no crecen bajo condiciones ácidas (pH 4.5 o menor). Crecen en Agar Mac Conkey como no fermentadores de lactosa, poseen un metabolismo aeróbico estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaeróbicas utilizando el nitrato o la arginina como aceptores finales de electrones. Cuando crecen en medio líquido se puede observar la formación de una película superficial. Pueden degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito o nitrógeno gas. Tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37 C° pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente y en temperatura máxima de 42 C°. Producen morfologías coloniales distintivas y pigmentadas, algunas cepas forman una

Pseudomonas aeruginosa

cápsula polisacárida que hace que las colonias sean mucosas, a menudo presentan un brillo metálico y olor a paja.⁵ Son también fluorescentes, debido a la producción de pigmentos, cuando crecen en un medio con limitación de hierro, entre los que se encuentran la pioverdina principal sideróforo, otros como la piocianina, la piorrubina, la oxoclorofila y la clororafina.⁶

No es frecuente encontrar a estos microorganismos como parte de la biota bacteriana de individuos sanos, el tracto gastrointestinal es el lugar que se coloniza con más frecuencia. Las tasas de colonización son elevadas en individuos con inmunocompromiso u hospitalizados, particularmente aquellos con estancias prolongadas, o que han recibido terapia antimicrobiana, lo cual los pone en riesgo de colonizarse por cepas multirresistentes, especialmente aquellos que por su gravedad se ubican en las unidades de cuidados intensivos.^{7,8} Como patógeno nosocomial se encuentra a neumonías asociadas a ventilación mecánica, infecciones urinarias asociadas a sondas y bacteriemias asociadas a catéteres intravasculares. Es difícil de erradicar ya que presenta una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, que las hace responsables de una elevada morbi-mortalidad.⁹⁻¹¹

Pseudomonas aeruginosa se caracteriza por colonizar múltiples tejidos, gracias a la existencia de adhesinas y fimbrias, además algunos tipos de lipopolisacáridos, flagelos, proteínas de membrana externa y alginato; las superficies inertes contribuyen a la adhesión de este microorganismo. Los factores que juegan un papel determinante en su patogenicidad incluyen adhesinas, exotoxinas, proteasas, hemolisinas y el sistema de secreción tipo III. A pesar de esta enorme colección de factores de virulencia rara vez infecta personas inmunocompetentes o tejidos que no estén dañados. Esto que parece contradictorio, refleja la poca capacidad de esta bacteria de colonizar o dañar epitelios intactos y explica por qué la pérdida de la integridad epitelial, especialmente con un declive de la función inmunológica, es normalmente un pre-requisito para las infecciones por patógenos oportunistas.¹²⁻¹³

Pseudomonas aeruginosa produce gran variedad de toxinas, muchas de las cuales pueden causar choque, inducir muerte en las células e incluso hidrolizar proteínas estructurales de los tejidos. La toxina más potente es la exotoxina A, que inhibe la síntesis proteica, está implicada en la dermatonecrosis que tiene lugar en las quemaduras o en el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas, posee además actividad inmunodepresora. La destrucción tisular puede ser

Pseudomonas aeruginosa

atribuída a las elastasas que hidrolizan elastina, laminina, fibrinógeno, colágeno, transferrina e incluso las inmunoglobulinas y algunos componentes del sistema del complemento. La proteasa alcalina obtiene como substratos ciertos componentes del complemento, la fibrina, el fibrinógeno, y el interferón gamma.¹³ Las exoenzimas S y T producen daños en las células epiteliales con el objetivo de facilitar la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis. Aunque la patogénesis suele ser multifactorial, el sistema de secreción tipo III, es el mayor determinante de virulencia, funciona transportando toxinas directamente desde la bacteria adherida a la célula. En las infecciones respiratorias este sistema de secreción se asocia a un incremento de riesgo de mortalidad de hasta 6 veces¹⁴⁻¹⁵. Transporta 4 toxinas (exoS, exoT, exoU y ExoY) implicadas en la inhibición de la fagocitosis, la promoción de destrucción tisular y el retardo de la curación de heridas. El sistema de secreción tipo II se expresa en respuesta a diversas señales ambientales incluyendo bajas concentraciones de Ca, algunos componentes presentes en el suero y el contacto con las superficies celulares.¹⁶⁻¹⁷

La formación de una biopelícula permite a estos microorganismos colonizar superficies como instrumentos médicos, dispositivos plásticos, y lentes de contacto entre otros, además contribuye a la infección crónica de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística. Los microorganismos que crecen rodeados de biopelículas presentan elevada resistencia a los antibióticos, a los mecanismos de eliminación mediados por el complemento, a la fagocitosis y biocidas. Esto hace que las infecciones donde se han formado biopelículas sean difíciles de tratar.¹⁸ Cuenta además con distintos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, como la disminución de la entrada de medicamentos mediante la alteración de porinas o bombas de expulsión, la destrucción o modificación de drogas, como la producción de metalobetalactamasas, o la modificación de los sitios blanco, como la mutación de la ADN-girasa y topoisomerasa o lipolisacáridos.¹⁹

Se han asociado varios factores de virulencia y patogenicidad que son codificados en el material genético de *Pseudomonas aeruginosa* tanto para la resistencia a antibióticos, como para lesión y daño tisular, como *LasB* (que codifica para elastasa), *ToxA* (exotoxina A), *PilA* (tipo Fimbria, precursor del pili tipo Li), *plcH* (precursor de fosfolipasa A hemolítica) *PhzA1* (biosíntesis de proteínas fenacina), *toxR* (regulador transcripcional) y *LecA* (lecitina).²⁰ Es conocido que dentro de las especies de *Pseudomonas aeruginosa* el tamaño del genoma varía de entre 5 y 5.5 Mpb. Esta

Pseudomonas aeruginosa

diferencia en el tamaño del genoma se debe a los genomas accesorios los cuales consisten en elementos extracromosomales como plásmidos y bloques de ADN insertados dentro de los cromosomas en varios loci. La composición individual de los genomas accesorios, genera diversidad en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, y se han adquirido mediante la transferencia horizontal de genes de diferentes fuentes incluyendo otras especies y géneros. Las islas genómicas se consideran genomas accesorios insertados en el material genético de *Pseudomonas aeruginosa* y dispuestos en diferentes regiones dentro de los cromosomas dependiendo de la función que codifican y la ventaja que confiere. En relación con el estilo de vida específico de una bacteria existen variedades de islas genómicas; estas contribuyen a la diversificación y adaptación del microorganismo, que tienen impacto en la plasticidad y evolución, con la diseminación, la resistencia a antibióticos, la virulencia de genes, y la formación de rutas metabólicas. Las islas genómicas juegan un papel en la evolución en el espectro de la patogenicidad y el ambiente bacteriano. Se han descrito muchas variedades de islas genómicas, como las PAGI 1, PAGI 2, PAGI 3, PAGI 4, PAPI 1, pKLC 102 y PAPI-2^{21,22}.

En un estudio realizado en México se caracterizaron genotípicamente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI, en su mayoría obtenidas de cultivo de secreción bronquial de pacientes en la Unidad de Terapia Intensiva, con diagnóstico de neumonía asociada a ventilación mecánica. El 100% de las cepas presentaban los genes de virulencia como *ToxA*, *ToxR*, *AlgR*, *LecA*, *plcA*, *plcH*, *phzA1* y el gen *pillA* en 98%. La presencia de islas genómicas se demostró en 99% del genoma de las cepas, 34% presentaban PAGI-1, 2, 3, 4, PAPI-1, 2, y el elemento pKLC102, el 18% presentaba seis islas PAGI-2, 3, 4, PAPI-1, 2, y pKLC102, el 12% cinco islas PAPI-1, 2, PAGI-2, y pKLC102, y en ocasiones PAGI-4 o PAGI-3. El 14% con cuatro islas PAGI-2, y pKLC102, 10% tres islas PAPI-2 y pKLC102 en combinación con PAGI-4, o PAGI-2; 7% presentaban PAGI-2 y pKLC102 y 4% una sola isla. Finalmente la isla PAPI-2 y el elemento pKLC102 fueron las islas más frecuentemente detectadas en el 87%, seguidos de PAPI-1 en el 81%, PAGI-2 en 78%, PAGI-4 en 70%, PAGI-3 en 53% y PAGI-1 en 51%. Los genes marcadores de islas genómicas de las cepas resultaron variables mostrando diversidad en el contenido genómico, y se concluyó que no había una cepa prevalente de *Pseudomonas aeruginosa* afectando a los pacientes. Además la localización de las islas genómicas en las cepas aisladas resultó en diferentes loci a los descritos en estudios previos, lo que indica que

Pseudomonas aeruginosa

no muestran un patrón similar de inserción. La susceptibilidad a antimicrobianos resultó diversa, el 73% fueron resistentes a 18 antimicrobianos, por lo que se consideró que la multirresistencia fue elevada. Solo 15 cepas fueron sensibles a una amplia gama de antimicrobianos. Se atribuyó que la alta incidencia de islas genómicas presentes en la colección de cepas estudiadas podría asociarse con la presencia de multirresistencia en las cepas de pacientes aislados, sin predominar una clona en particular.²³

La variación genética de una población bacteriana va a determinar su potencial evolutivo, sus cortos periodos de generación, además del enorme tamaño de sus poblaciones hace que los cambios evolutivos sean muy rápidos. La dinámica de aparición, de selección de mutantes, la importancia relativa de la mutación y de la recombinación en estas poblaciones son efectos esenciales para comprender los cambios epidemiológicos en ellas.²⁴⁻²⁵

Es importante conocer el papel de la recombinación genética en las poblaciones bacterianas ya que la transferencia horizontal de genes tiene una enorme relevancia para la epidemiología de las infecciones causadas por bacterias patógenas, por lo que consideramos que es importante describir las características genotípicas y fenotípicas de este versátil microorganismo.

Respecto a la descripción de las características clínicas de los eventos de bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*; existen pocos estudios en pacientes pediátricos. Grisaru y cols. en el año 2000 reportaron una incidencia anual de bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa* de 3.8/1000 pacientes, con mayor frecuencia en el sexo masculino (63%), la mediana para la edad fue de 3 años, (rango de 1 día de vida a 18 años). Resulto más frecuente en pacientes con enfermedades hemato-oncológicas (50%), sometidos a cirugía cardíaca, estancias prolongadas en UCI, malformaciones gastrointestinales (37%) y prematuros (8%). El 51% de pacientes tenían exposición previa a antibióticos. El 11% presentaba como sitio inicial de infección la piel, el 19% neumonía y el 13% estaban relacionadas a colonización del catéter venoso central. En el 53% no tenían evidencia del origen de la infección. En el 63% se consideró como infección nosocomial y el 36% de los pacientes tenían neutropenia. La mortalidad asociada se reportó en 20%, mayor en pacientes menores de un año (36%). La exposición a antibióticos 1 mes previo se asoció con una elevada frecuencia de letalidad en comparación con los no expuestos ($p= 0.02$).²⁶

Pseudomonas aeruginosa

Otro estudio realizado con información obtenida durante 10 años, por Yang y cols. En el 2011, documentó una incidencia media de 0.09 episodios/1 000 pacientes admitidos-día en un año, la mediana de edad se reportó en 6.5 años; el 64% fueron masculinos. 95% de los casos tenían enfermedades subyacentes, de las cuales, 63% eran enfermedades oncológicas y hematológicas. El 58% presentaban neutropenia menor a 500/uL. El 64.5% presentaban un sitio de infección, resultando más frecuente el pulmonar (22.6%), seguido de infecciones de piel y tejidos blandos (16.1%) y bacteriemias relacionadas a colonización de catéter (11.3%). No se encontró sitio primario en 35.5% de los niños. El perfil de resistencia fue: 24.2% a aztreonam, 16.1% a imipenem, 14.1% a aminoglucósidos y 12.9% a ureidopenicilinas y 11.3% a cefepime y ceftazidima. Solo 11.3% de los aislamientos se consideraron multirresistentes. Los factores de riesgo asociados a casos de bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa* fueron el uso de cefalosporinas de amplio espectro un mes previo (OR 6.0; IC 95%, 1.2-31.1), estancia en unidades de cuidados intensivos (OR 6.8; IC95%, 1.3 35.8) y estancia hospitalaria prolongada (>30 días) (OR 5.3; IC95% 1.0-27.2). La letalidad fue de 14.5%, elevándose hasta 57.6% en infección por cepas multirresistentes, en comparación con 9.1% para las no multirresistentes. El 14.5% de los pacientes con eventos de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* fueron inicialmente tratados con antibióticos inapropiados.²⁷

En otro estudio realizado por Zhang en 2012 en un periodo de 5 años; los eventos de bacteriemias documentadas por *Pseudomonas aeruginosa* representaron el 2.64%, con el mayor número de casos en menores de 1 año (42%), el 68% de los niños presentaban condiciones subyacentes, reportándose al igual que en los estudios previos, enfermedades hemato-oncológicas (48%). Los que no presentaban condiciones subyacentes se reportaron en un 32%, además el 58% se debió a infección nosocomial. Se documentaron más eventos de estado de choque y crisis convulsivas en aquellos niños con condiciones subyacentes, sin embargo, la letalidad fue similar (60% para aquellos con condiciones subyacentes y 52% para los sanos). Las defunciones se presentaron en aquellos con estado de choque (56%), hemorragia gastrointestinal (56%) y cuenta de leucocitos menores de $2000 \times 10^9/l$ ($p < 0.05$). Hubo menos defunciones en pacientes que recibieron inicialmente antibióticos con cobertura para *Pseudomonas aeruginosa* 14/15 (93%) respecto a aquellos que no lo recibieron 6/16 (38%) $p = 0.002$.²⁸

Pseudomonas aeruginosa

A pesar de que los eventos de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resultan poco frecuentes en niños, un porcentaje considerable culminan en desenlaces fatales, especialmente en pacientes con condiciones subyacentes, aunado a un tratamiento inicial inapropiado.²⁹ El caracterizar clínica y genéticamente a las *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos nos ayudaría a entender parte de su comportamiento clínico en nuestra población.

JUSTIFICACIÓN.

- Las infecciones debidas a *Pseudomonas aeruginosa* se asocian a una mayor letalidad en pacientes con enfermedades subyacentes, implicando alta morbimortalidad, incremento en la duración de la estancia hospitalaria y necesidad de recursos adicionales para el tratamiento de las infecciones nosocomiales.
- Hasta el momento desconocemos la relación clonal de las cepas aisladas en nuestra unidad hospitalaria, así como su caracterización fenotípica, genotípica y su comportamiento clínico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la práctica diaria hospitalaria nos enfrentamos a sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* con distintos perfiles de resistencia antimicrobiana, y con morbimortalidad considerable, por lo que nos planteamos la siguiente interrogante.

- ¿Cuáles son las características genotípicas, fenotípicas y el comportamiento clínico de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de hemocultivos en nuestra unidad hospitalaria?

OBJETIVO.

- Caracterizar fenotípicamente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de nuestra unidad hospitalaria mediante su perfil de resistencia.
- Caracterizar genotípicamente a las cepas; determinando si existen clonas mediante la tipificación por medio de electroforesis en gel por campos pulsados.
- Determinar genes de virulencia e islas de patogenicidad mediante Reacción en cadena de Polimerasa.
- Describir el comportamiento clínico con las características demográficas de los pacientes, enfermedad subyacente, origen de la infección, si corresponde a infecciones nosocomial, bacteriemias secundarias, y bacteriemias relacionadas a colonización de catéter, sepsis grave, choque séptico y letalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Lugar de realización del estudio:

El estudio se realizó en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, unidad de tercer nivel de atención que recibe pacientes provenientes de los Hospitales Generales de Zona del sur del Distrito Federal y de los estados de Guerrero, Querétaro, Chiapas, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Oaxaca y Veracruz.

Universo de estudio.

- 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes del Hospital de Pediatría del CMN-SXXI, colectadas durante el periodo de octubre del 2011 a mayo del 2014.

Tipo de estudio.

- Transversal descriptivo.

CRITERIOS INCLUSIÓN.

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes, conservadas en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- Expediente incompleto de los pacientes en quienes se aisló cepas de *Pseudomonas aeruginosa*
- Cepas de *Pseudomonas* identificadas inicialmente como especie *aeruginosa* y que por otro método semi-automatizado resultase otra especie.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable Escala de Medición.
Fenotipo.	Perfil de susceptibilidad de un microorganismo.	Perfil de susceptibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aislada de hemocultivos mediante sistema automatizado Vitek2, que incluye los siguientes antimicrobianos: piperacilina, piperacilina/tazobactam, cefepime, imipenem, meropenem, amikacina, gentamicina, ciprofloxacino.	Cualitativa nominal. Sensible, intermedio, resistente.
Genotipo -Relación clonal	Bacterias que tienen características genotípicas idénticas en relación con las cepas que les da origen.	Se clasificarán en clonas idénticas, relacionadas, posiblemente relacionadas y no relacionadas, de acuerdo al patrón genómico del ADN cromosómico obtenido por electroforesis en gel por campos pulsados y la diferencia en el número de bandas de acuerdo a la clasificación de Tenover. ³⁰	Cualitativa ordinal.
-Islas genómicas	Genomas accesorios insertos en el material genético de las <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y dispuestos en diferentes regiones dentro de los cromosomas dependiendo de la función que codifican y la ventaja que confiere	Se identificarán las islas genómicas PAGI 1, PAGI 2, PAGI 3, PAGI 4, PAPI 1, <i>pKLC</i> 102 y PAPI-2 mediante PCR de acuerdo al estudio de Morales-Espinosa y cols. ²³	Cualitativa nominal

Pseudomonas aeruginosa

Variables	Definición conceptual	Definición operacional.	Tipo de variable Escala de Medición.
Edad del paciente	Edad cronológica al momento de la infección	Edad cronológica al momento de la infección.	Cuantitativa continúa. Días, meses, años.
Sexo	Definido como género al nacimiento considerando las características fenotípicas.	Se clasificará en femenino y masculino	Cualitativa Nominal
Enfermedad subyacente	Enfermedad principal que motiva el ingreso del paciente y los signos y síntomas que presenta al momento del diagnóstico de bacteremia.	Se establecerá conforme a la clasificación del CIE-10	Cualitativa Nominal.
Bacteremia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en sangre detectada mediante aislamiento en cultivo	Aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en al menos un hemocultivo	Cualitativa Nominal
Infección nosocomial	Infección que no estaba presente ni en periodo de incubación y que se presenta después de 48 h de ingreso del paciente	Infección que no estaba presente ni en periodo de incubación y que se presenta después de 48 h de ingreso del paciente	Cualitativa nominal.
Infección por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sitio anatómico donde se localiza inicialmente la infección que da origen a la bacteremia	Sitio anatómico donde se localiza inicialmente la infección que da origen a la bacteremia: piel y tejidos blandos, pulmón, tracto urinario.	Cualitativa nominal
Bacteremia relacionada a dispositivo intravascular	Se define con al menos un hemocultivo de sangre periférica positivo y uno de los siguientes criterios: -Un cultivo de la punta de catéter positivo, semicuantitativo (>15 unidades formadoras de colonias [ufc] / catéter) o un hemocultivo positivo de sangre obtenido del lumen del catéter, con crecimiento del mismo microorganismo en sangre periférica.	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en hemocultivo tomado a través de catéter intravascular y periférico, con un tiempo de diferencia de 2h entre el desarrollo en el hemocultivo del catéter intravascular con relación al periférico. Un cultivo de la punta de catéter positivo, semicuantitativo (>15 unidades formadoras de colonias [ufc] / catéter	Cualitativa nominal.

Pseudomonas aeruginosa

Sepsis grave	Sepsis mas uno de los siguientes: disfunción orgánica cardiovascular o síndrome de dificultad respiratoria aguda o dos o más disfunciones orgánicas.	Sepsis con disfunción cardiovascular o respiratoria, o dos o disfunciones orgánicas (hepática, hematológica, renal, neurológica) secundario a bacteriemia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cualitativa Nominal
Choque séptico	Sepsis grave con hipotensión que no responde a la administración adecuada de líquidos	Sepsis grave con hipotensión que no responde a la administración de líquidos secundario a bacteriemia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cualitativa Nominal
Letalidad	Es la proporción de personas que mueren por una enfermedad determinada	Defunción asociada a bacteriemia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Cualitativa Nominal

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.

- Del periodo de octubre 2011 a mayo 2014 se aislaron en hemocultivos y conservaron 51 cepas que fueron identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*.
- Los ensayos de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Genómica bacteriana de la Facultad de Medicina de la UNAM, a cargo de la Dra. María del Rosario Morales Espinosa de mayo a diciembre 2014. Se realizó la identificación y caracterización morfológica de las cepas, se corroboró el perfil de susceptibilidad mediante el método de dilución en caldo y la identificación de las *Pseudomonas aeruginosa* mediante sistema semi-automatizado API 20-NE.
- La relación clonal se estableció mediante el análisis de electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE). Los genes de virulencia y la identificación de las islas genómicas se realizó mediante Reacción en Cadena de Polimerasa con los Primers específicos descritos por Morales Espinosa y colaboradores.²³
- Una vez corroborada la identificación, se buscó el expediente en el archivo clínico para obtener los datos correspondientes a: edad, sexo, enfermedad subyacente, tipo de infección, gravedad, atención en unidad de cuidado intensivo y desenlace.
- El perfil de susceptibilidad a antimicrobianos se identificó mediante el sistema Vitek-2 para todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Las variables se recabaron en la hoja de recolección diseñada para el estudio.

Métodos microbiológicos. Electroforesis en gel por campos pulsados.²³⁻³⁰

Para determinar los perfiles de PFGE, se seleccionaron 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La extracción de ADN se realizó en bloques de agarosa, de acuerdo con el protocolo descrito por Morales-Espinosa y colaboradores²³. Se mezclaron 150 µl de una suspensión bacteriana con 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1.8%. El bloque generado se incubó con 1.5 ml de una solución de lisis EC [Tris-HCl 1 M (pH 8.0), NaCl 1 M, EDTA 0.5 M (pH 8.0), desoxicolato de sodio 0.5%, N-lauril-sarcosinato de sodio 12.5%, RNasa 5 mg/ml y lisozima 10 mg/ml] a 37°C y por 24 horas. Posteriormente, los bloques se incubaron en una solución ESP [Tris HCl 10 Mm (pH 7.4), EDTA 1 Mm, N-lauril- sarcosinato de sodio 0.25% y proteinasa K 0.1 mg/ml]. Finalmente, los bloques se lavaron 8 veces con una solución de TE en frío [Tris-HCl 10 Mm (pH 8.0), EDTA 1 Mm (pH 8.0)] y se mantuvieron en la misma solución a 4°C. Los bloques se trataron con 3 ml de la

Pseudomonas aeruginosa

enzima de restricción *SpeI* (30 U) y se incubaron a 37°C por un noche. Los fragmentos de digestión se separaron mediante un CHEF-Mapper (Bio-Rad®), utilizando un gel de agarosa al 1% teñido con 1.0 mg/ml de bromuro de etidio. El corrimiento se realizó con TBE 0.5% (Tris-borato-EDTA) a 10°C y con pulsos de 2-50 s por 36 horas a 6 V/cm². El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó utilizando un marcador de peso molecular Lambda Ladder PFGE (Biolabs). Para expresar en el dendograma la similitud entre las cepas, se estimó el coeficiente de similitud de Jaccard y el agrupamiento, mediante el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average). Los patrones de PFGE generados se interpretaron con base en los lineamientos de Tenover y colaboradores³⁰ los aislamientos son considerados como genéticamente indistinguibles o idénticos si sus patrones de restricción tienen el mismo número de bandas, y las bandas correspondientes son del mismo tamaño aparente. Se consideran relacionados si sus patrones muestran 2 a 3 bandas diferentes consistentes con un evento genético. Y se considera posiblemente relacionados si sus patrones muestran de 4 a 6 bandas consistentes con 2 eventos genéticos. Finalmente no se consideran relacionados si sus patrones muestran 7 o más diferentes bandas consistentes con 3 o más eventos genéticos independientes.³⁰

Determinación de genes de virulencia; se seleccionaron siete estructuras y genes de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* para amplificar por PCR con los Primers específicos para cada gen (*ToxA*, *LasB*, *lecA*, *algR*, *plcH*, *phzA1*, *ToxR* y *pilA*).

Las Islas genómicas se identificaron mediante técnica de amplificación de PCR. Mediante la técnica descrita por Finnan se utilizaron para la detección de PAPI-1 los segmentos orf3, orf18, y orf 42, para PAPI-2 los genes c22 y c105, y para PAPI-3 sg8 y sg100. Para la isla pKLC102 los genes CP10, CP44 y CP97 descrito por Klockgether. Se seleccionaron genes representantes de la porción derecha, izquierda o media descrito por Qiu para amplificar segmentos de DNA de PAPI-1(976F, PAPI-1R, 4542F+*intF* y *sojR*+4541F) y los primers *intF*+*sojR* para la forma circular de PAPI-1. Para PAPI-2 los genes *XerC* (PAPI-2 1F/1R), RS07-Rs08 (PAPI-2 2F2R) y *exoU* (PAPI-2 3F3R). Se emplearán las secuencias y métodos descritos por Morales-Espinosa²³.(anexo 2)

Pseudomonas aeruginosa

TAMAÑO DE MUESTRA.

Se incluyeron 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con aislamiento en hemocultivo conservadas de octubre del 2011 a mayo del 2014. De acuerdo a lo descrito en el estudio de Morales-Espinosa, la frecuencia de los genes de virulencia y las islas de patogenicidad es elevado. Para establecer la relación clonal no se requiere un número mínimo de cepas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

-Se empleo estadística descriptiva con cálculo de frecuencias simples y porcentajes.

ASPECTOS ÉTICOS.

Este estudio se realizó dentro de las normas establecidas en la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos consignados en el título IV del Reglamento en Materia de investigación para la salud, en el artículo 17 del título segundo, donde se establece que el presente estudio corresponde a una investigación sin riesgo, ya que se emplearon técnicas y métodos de investigación documental y no se realizó intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participaron en el estudio. Toda la información se colecto a partir de los expedientes clínicos y resguardo de forma confidencial. El estudio fue aprobado por el Comité Local de Investigación con el Número R-2014-3603-44

Pseudomonas aeruginosa

RECURSOS.

Humanos. Participaron en el estudio las tutoras de tesis, el tesista, y el personal del Laboratorio de Genómica Bacteriana de la Facultad de Medicina de la UNAM, M en C. Gabriela Delgado como asesor y revisor de los ensayos de biología molecular y resultados de los mismos, así como el Biólogo José Luis Méndez, asesor del residente de infectología en el laboratorio de Genómica Bacteriana.

Financieros. En apoyo con el programa DGAPA-UNAM para la realización del proyecto y la compra de insumos necesarios.

RESULTADOS.

De octubre de 2011 a mayo de 2014, se colectaron 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes pediátricos de distintos servicios. Para los estudios de laboratorio solo se incluyó una cepa por paciente. Después de corroborar la identificación, se obtuvo la información de los expedientes clínicos en el archivo. Los pacientes se atendieron en los servicios que integran al Hospital; 11 pacientes en el piso de Escolares, 12 pacientes en Preescolares, 6 en lactantes y 22 pacientes en terapia intensiva ya sea neonatal o pediátrica.

Características clínicas.

De los 51 pacientes, el 65% (33) correspondieron al sexo femenino y el 35% (18) al sexo masculino, el paciente de menor edad tenía 1 mes y el de mayor edad 14 años 8 meses, la mediana de edad de 5 años 8 meses. La mediana para el peso fue de 30 kilos 500 gramos (750 gramos a 68 kilogramos). Todos los pacientes tenían una enfermedad o condición subyacente. La mitad de los pacientes tenían una enfermedad hemato-oncológica (52%): siete pacientes tenían leucemia linfoblástica aguda, siete Linfoma no-Hodgkin y diez pacientes tumores sólidos, un paciente síndrome hemofagocítico, un paciente con histiocitosis y un paciente con anemia aplásica. (Cuadro 1). El 24% (12) de los pacientes eran prematuros. Cinco pacientes presentaban una alteración gastrointestinal (síndrome de intestino corto o atresia de vías biliares), tres pacientes con cardiopatías congénitas, y un paciente con inmunodeficiencia primaria que correspondió a Wiscott Aldrich. Finalmente cuatro pacientes tenían diversos diagnósticos como Síndrome de Dandy Walker, Malformación de Chiari y diabetes insípida nefrótica. (Cuadro 1).

El diagnóstico de infección más frecuente fue sepsis relacionada a colonización de catéter en 28 casos (55%). En 21 pacientes, la bacteriemia se presentó durante un evento de fiebre y neutropenia posquimioterapia (41%). Dos pacientes presentaron bacteriemia secundaria, uno con neumonía nosocomial y otro con sepsis abdominal. (Cuadro 2).

El comportamiento de la infección fue de mayor gravedad en los pacientes que tenían una enfermedad hemato-oncológica, todos con evento de fiebre y neutropenia, ya que el 41% (11) cursaron con sepsis grave y el 37% (10) con choque séptico, falleciendo seis pacientes. De los 12 pacientes prematuros, el 92% (11) presentaron sepsis relacionada a catéter y uno bacteriemia

Pseudomonas aeruginosa

secundaria a neumonía nosocomial, el 59% cursaron con sepsis grave, pero solo un paciente falleció. Respecto a los pacientes con comorbilidad gastrointestinal, dos pacientes cursaron con sepsis grave, uno con choque séptico, un paciente falleció. Los 8 pacientes que fallecieron representaron el 15% del total de pacientes estudiados. (Cuadro 3).

ENSAYOS DE LABORATORIO.

SUSCEPTIBILIDAD DE ANTIMICROBIANOS.

De los resultados obtenidos en sistema automatizado Vitek-2 para las 51 cepas estas tuvieron buena actividad in vitro para los fármacos de primera línea, resultando ser sensibles en 98% a ciprofloxacino, 96% a piperacilina/tazobactam y gentamicina, 94% a cefepime, 92% a moxifloxacino y tobramicina, 90% a amikacina, 84% a meropenem, 71% a imipenem y 67% a aztreonam. Solo una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue pandrogoresistente. (Gráfico 1).

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS.

Se realizó electroforesis en gel de campos pulsados de las 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. (Gráfico 2). De acuerdo a los resultados obtenidos y con base en la clasificación de Tenover, se encontraron cinco clonas idénticas, cada una de ellas con dos cepas. Adicionalmente hubo otras dos clonas que tenían tres cepas cada una. Esto son de un total de 16 cepas que estuvieron de alguna manera relacionadas, sin embargo, ninguna de las clonas tenía similitud genética. A cada una de las clonas se les asignó arbitrariamente una letra, iniciando con la A.

La clona A, se identificó en tres pacientes en noviembre 2011, enero y octubre 2012, (c-1994, c-1996, c-1219), las primeras dos tienen relación temporal y la tercera se encontró casi un año después. Las tres se aislaron de pacientes con diagnóstico de cáncer, fiebre y neutropenia y no presentaban dispositivos intravasculares.

En agosto y octubre del 2012, se encontró la clona B (c-1209, c-1217), la primera identificada se documentó en un paciente con neutropenia febril, y la segunda en un paciente con bacteriemia relacionada a colonización de catéter, ambos pacientes fueron atendidos en distintos servicios.

Pseudomonas aeruginosa

La clona C fue identificada entre mayo del 2012 y enero 2013 (C-1202, C-1222), no tienen relación temporal, ambos pacientes se hospitalizaron en la unidad de cuidados intensivos neonatales y correspondieron a bacteriemias relacionadas a colonización de catéter.

La clona D se identificó en febrero 2013 y mayo 2014, está integrada por dos cepas (C-1226, C-1244), no tienen relación temporal, ambas correspondieron a infecciones nosocomiales de distintos servicios (UTIP y Preescolares).

La clona E aislada en julio y agosto 2013 (C-1234, C-1235), tuvo relación temporal, correspondió a dos pacientes con bacteriemia relacionada a colonización de catéter, sin embargo los servicios en los que se atendieron fueron distintos (Lactantes y Escolares).

La clona F aislada en agosto del 2013 (C1236, 1238), se relaciona con temporalidad y lugar de hospitalización, ambos pacientes en el servicio de Lactantes y el diagnóstico de infección fue bacteriemia relacionadas a colonización de catéter.

La clona G aislada en los meses de junio y septiembre del 2012 (C1205, C-1211, y C-1212), tienen relación temporal y son de adquisición nosocomial. El primer paciente tuvo diagnóstico de sepsis abdominal, los otros dos pacientes presentaron bacteriemia relacionada a colonización de catéter, los cuales fueron atendidos en preescolares y terapia Intensiva.

FRECUENCIA DE ISLAS GENÓMICAS Y GENES DE VIRULENCIA.

Se realizó la determinación de genes de virulencia e islas de patogenicidad de las 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de reacción en cadena de polimerasa. (Cuadro 4).

El 100% de las cepas contienen los genes de virulencia *toxA*, *toxR*, *algR*, *lasB*, *lecA*, *plcH*, *yphzA1*. El gen *pil-A* se encontró en el 46.6%, inclusive realizando su identificación de manera amplificada (*spilB/tRNAThr*, *pilA*, *probe*, *oprL*, *lipAe*.)

Respecto a las islas de patogenicidad, se obtuvo de manera consistente en el 100% de las cepas la isla PAPI-2, la isla PAPI-1 en el 49%, la isla PAPI-3 en 47%, la isla *pKLC 102* en el 21.5% y PAPI-2 solo en el 1.6%. La isla PAPI 3 y 4 no se identificaron en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Ninguna cepa integró el 100% de islas genómicas. El número mayor de islas genómicas que se

Pseudomonas aeruginosa

encontró en las cepas fue de cinco en una cepa, y todas las cepas presentaron al menos una isla genómica.

Respecto a los pacientes que fallecieron, no presentaban un mayor número de islas genómicas y la defunción parece estar más en relación de la condición subyacente que de la característica genotípica o fenotípica de la cepa condicionante de infección. Las islas predominantes en todos los pacientes que fallecieron fueron la PAPI-2 y PAPI-1. (Cuadro 4).

Cuadro 1. Características de los pacientes con aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en hemocultivo

Variable	Porcentaje	
Edad		
Máxima	14 años 8 meses	
Mínima	1 mes	
Mediana	5 años 5 meses	
Sexo		
Masculino	33	65%
Femenino	18	35%
Peso		
Mínimo	750 g	
Máximo	68 kg	
Mediana	13.5 kg	
Enfermedad de base/ Condición subyacente		
Hemato-oncológica	27	52%
Leucemia aguda	7	
Linfoma no Hodgkin	7	
Tumor sólido	10	
Síndrome hemofagocítico	1	
Histiocitosis	1	
Anemia aplásica	1	
Prematurez	12	24%
Gastrointestinal	5	10%
Cardiopatía congénita	3	6%
Inmunodeficiencia primaria	1	2%
Otros*	3	6%

*Síndrome de Dandy Walker, malformación de Chiari, diabetes insípida nefrogena.

Cuadro 2. Sitio primario y tipo de infección de los pacientes con aislamiento en hemocultivos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Variable	Número	Porcentaje
Diagnóstico de infección.		
Fiebre y neutropenia	21	41%
Sepsis relacionada a catéter.	28	55%
Sepsis secundaria.+	2	4%
Tipo de infección.		
Nosocomial	30	59%
Sepsis endógena	21	41%

+ Neumonía nosocomial, sepsis abdominal.

Cuadro 3. Desenlace de los pacientes con hemocultivo positivo por *Pseudomonas aeruginosa* con relación a la condición de sepsis, sepsis grave y choque séptico.

Enfermedad principal/ Condición subyacente	Sitio primario de infección			Sepsis	Sepsis grave	Choque séptico	Defunción
	Sepsis relacionada a catéter	Fiebre y Neutropenia	Sepsis secundaria +				
Hemato-oncológico (27)	6	21		6	11	10	6
Prematuros (12)	11		1	4	7	1	1
Gastrointestinal (5)	4		1	2	2	1	1
Cardiopatía (3)	3			2	1	0	0
Inmunodeficiencia primaria (1)	1			0	1	0	0
Otros (3)*	3			3	0	0	0
TOTAL	28 (55%)	21 (41%)	2 (4%)	17 (33%)	22 (43%)	12 (24%)	8 (15%)

*Síndrome de Dandy Walker, malformación de Chiari, diabetes insípida nefrogénica

+ Neumonía nosocomial, Sepsis abdominal.

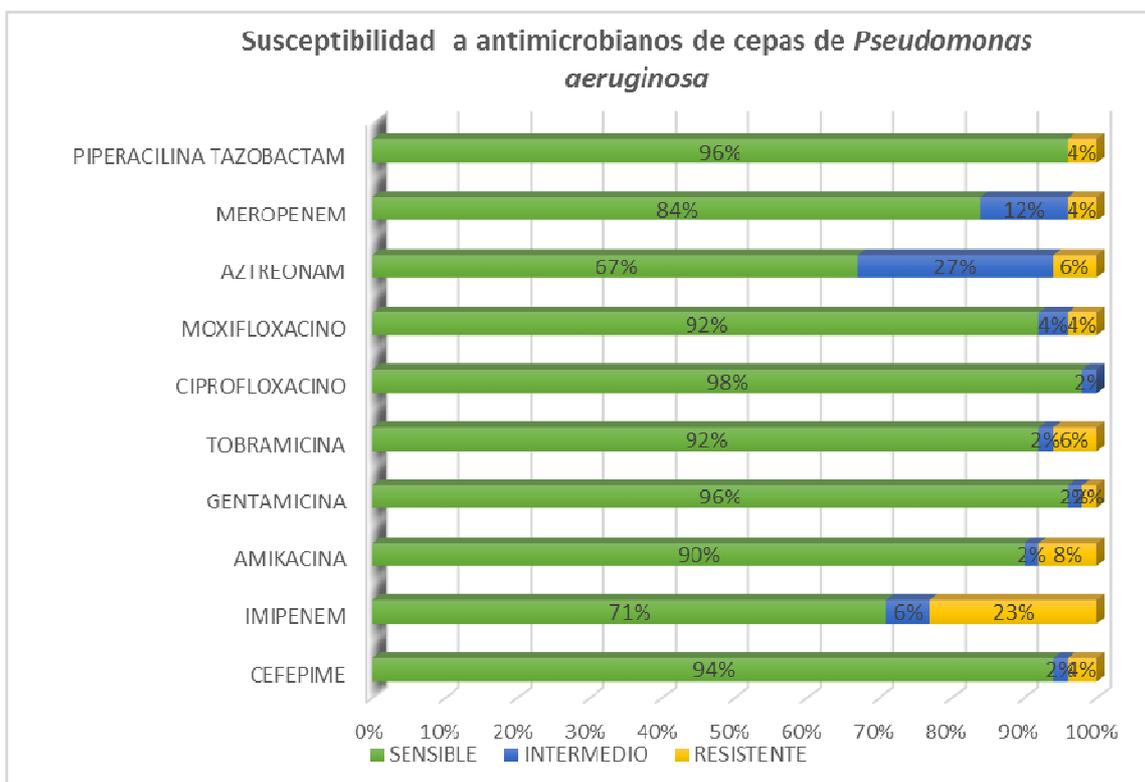
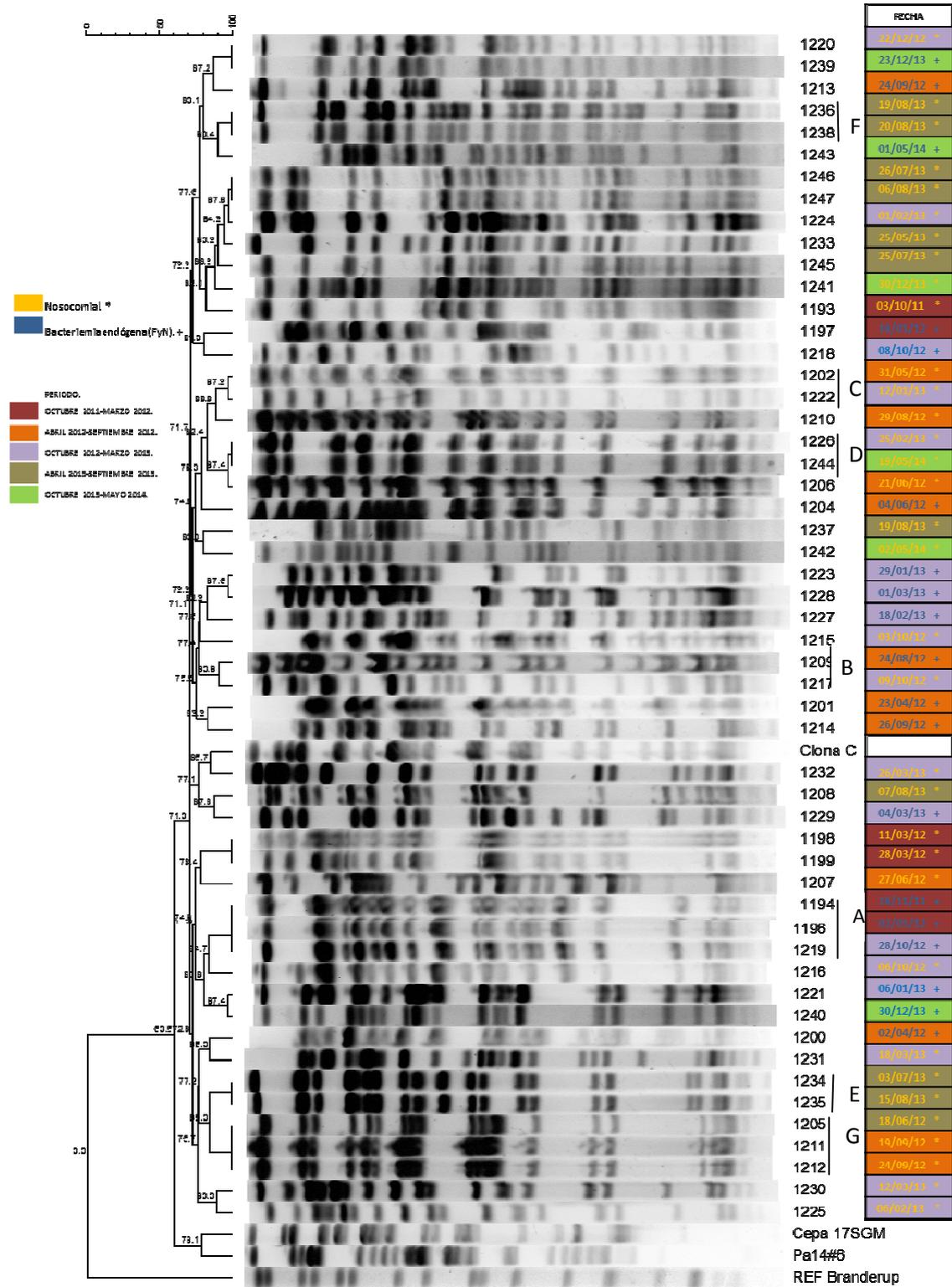


Gráfico 1. Perfil de susceptibilidad de antimicrobianos de 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes pediátricos obtenido por el sistema Vitek-2.

Pseudomonas aeruginosa

Dendrograma de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos del periodo octubre 2011-mayo 2014. (gráfico2)



Cuadro 3. Porcentaje de genes de virulencia e islas genómicas en 51 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Gen/islas genómicas.	Tamaño del producto del PCR.	Porcentaje de identificación.
Genes de virulencia		
<i>toxA</i>	454pb	100%
<i>lasB</i>	433pb	100%
<i>Leca</i>	215pb	100%
<i>algR</i>	437pb	100%
<i>plcH</i>	447pb	100%
<i>phzA1</i>	203pb	100%
<i>toxR</i>	207pb	100%
<i>Pila</i>		100%
PAGI-1		47%
orf3	958pb	
orf18	1039pb	
orf42	675pb	
PAGI-2		1.6%
c22	943pb	
c105	681pb	
PAGI-3		0.0%
sg8	732pb	
sg100	553pb	
PAGI-4		0.0%
CL22	464pb	
PAPI-1		49%
976F/PAPI-1R	2600pb	
4542F/intF	1600pb	
SojR/4541F	1600pb	
IntF/sojR	1600pb	
pKLC102		21.5%
cp10	255pb	
cp44	272pb	
cp97	337pb	
PAPI-2		100%
xerC	417pb	
PAPI-2 1F/1R		
RS07-RS08	402pb	
PAPI-2 2F/2R		
exoU	434pb	
PAPI-2 3F/3R		

Cuadro 4. Caracterización genotípica, y fenotípica de los pacientes que fallecieron y cursaron con sepsis por *Pseudomonas aeruginosa*.

No de cepa	Condición subyacente del paciente	fenotipo	Genotipo: No de islas genómicas.	Genotipo Tipo de islas genómicas.
1197	Cáncer y neutropenia.	Sensible.	4	PAGI-1, PAPI-1, PAPI-2, pKLC 102.
1210	Neutropenia. (síndrome hemofagocítico)	Sensible.	2	PAPI-1, PAPI-2.
1211	Neutropenia. (anemia Aplásica)	Extensamente drogoresistente.	2	PAPI-1, PAPI-2.
1212	Cáncer y neutropenia.	Sensible.	2	PAPI-1, PAPI-2.
1220	Cáncer y neutropenia.	Sensible.	3	PAPI-1 PAPI-2, pKLC 102
1226	Gastrointestinal.	Sensible.	1	PAPI-2.
1239	Cáncer y neutropenia.	Sensible.	2	PAPI-1, PAPI-2.
1241	Cáncer y neutropenia.	Extensamente drogoresistente.	3	PAGI-1, PAPI-1 PAPI-2.

DISCUSIÓN.

Pseudomonas aeruginosa continúa siendo uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales a nivel mundial, afecta principalmente a los pacientes con factores de riesgo. En este estudio, se encontró que predominaron las infecciones de adquisición nosocomial (59%), en relación con dispositivos intravasculares. En segundo lugar en frecuencia se presentaron las bacteriemias endógenas en pacientes con neutropenia pos quimioterapia.

De los pocos estudios realizados en paciente pediátricos que cursan con sepsis por *Pseudomonas aeruginosa*, en el descrito por Grisaru y colaboradores en el 2000,²⁶ el 50% de los pacientes tenían como condición subyacente una enfermedad hemato-oncológica, aunque a diferencia de nuestro estudio, solo en el 13% se registraron infecciones relacionadas a líneas vasculares. En su mayoría, las infecciones fueron de adquisición nosocomial. En el estudio de Yang y Yong en el 2011²⁷ se reportó también que la mayoría eran pacientes hemato-oncológicos, aunque el sitio más frecuente de origen de la bacteriemia fue el tracto respiratorio inferior (neumonía), a diferencia de nuestro estudio, donde solamente un paciente tuvo neumonía y bacteriemia secundaria. La mortalidad en nuestro estudio se reportó en 15% similar a la reportada por Grisaru quien encontró una mortalidad del 14% del total de pacientes, siendo más elevada en los pacientes menores de un año y aquellos con infección nosocomial. Yang y Yong²⁷ reportaron una mortalidad del 14.5% observándose en los casos con neumonía, presentación con choque séptico, falla renal y antibiograma con fenotipo de MDR. Otro estudio publicado en 2012 por Tamma y Turnbull,³¹ comparó la concentración mínima inhibitoria de la *Pseudomonas aeruginosa* a piperacilina/tazobactam y el desenlace de pacientes pediátricos que presentaron bacteriemia; se estudiaron aquellos pacientes con bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* con MICs $\leq 16\mu\text{g/ml}$ y aquellos con MICs de 32 a 64 $\mu\text{g/ml}$. La mortalidad fue del 9% y 24% respectivamente y aquellos pacientes con MICs ≥ 32 tenían mayor riesgo de mortalidad (RM 3.1; IC 95%, 1.26-8.16). En nuestro estudio 50 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaban MIC de 8 $\mu\text{g/ml}$ y la cepa resistente de 64 $\mu\text{g/ml}$, este paciente no falleció, seis pacientes tenían una cifra de neutrófilos absolutos menor a 500/ mm^3 pos quimioterapia, recibieron esquema empírico con piperacilina/tazobactam y fallecieron. Los otros dos pacientes que fallecieron fueron un paciente prematuro de 28 semanas de gestación, con larga estancia hospitalaria y varias comorbilidades, y un paciente con atresia de vías biliares, ambos con sepsis relacionada a colonización de catéter el

Pseudomonas aeruginosa

cual se retiró en ambos pacientes. En nuestro estudio observamos que la condición de inmunocompromiso que se presentó en mayor frecuencia relacionada con la muerte fue la neutropenia. La resistencia encontrada en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no explicaría el desenlace desfavorable en estos pacientes, y parece estar más en relación con la condición subyacente y en dos pacientes se encontró que las cepas eran extensamente drogorresistentes. A pesar de ello, los pacientes fallecen en las primeras 72 h, a pesar de tratamiento adecuado. En el estudio realizado por Song³³ también reportó una mortalidad similar (17%), y un 82% presentan enfermedad de base.

Con lo que respecta al perfil de resistencia a antimicrobianos, en el grupo de carbapenémicos se reportan porcentajes de resistencias más bajas a imipenem en el estudio de Yang²⁷ en comparación con el nuestro (13% vs 26%). En otro estudio publicado por Adam y Baxter³² reportan resistencia a meropenem del 7.8% y en nuestro estudio fue de 4% aunque intermedio es de 12%. Así mismo la resistencia a piperacilina tazobactam se reportó más alta en el estudio de Yong que la nuestra (12% vs 2%) y en el estudio de Adam y Baxter³² hasta del 10% de cepas son resistentes. En el estudio de Song³³ en China, se reportan las resistencias más elevadas meropenem en 29.2%, imipenem 35%, y 65.7% a piperacilina tazobactam. La mayoría de las cepas reportadas en nuestro estudio son sensibles a los fármacos de primera elección: piperacilina/tazobactam, cefepime, ciprofloxacino. La mayoría de los estudios se incluyen porcentajes variables de cepas multirresistentes, de las cepas de nuestros pacientes solamente una cepa fue pandrogoresistente.

Respecto a la relación clonal de las cepas, solamente se encontraron grupos de dos y tres que formaron una clona. Las clonas no tuvieron relación genética entre sí, por lo que se excluye que exista una transmisión horizontal, salvo en algunos casos. Previamente se ha establecido que el ambiente puede actuar como reservorio para diseminación y persistencia de la infección.²⁵

Al igual que el estudio previo de Morales y colaboradores en el 2012,²³ encontramos que nuestras cepas, tienen alta frecuencia de genes de todos los genes de virulencia. Con relación a la identificación de islas genómicas, los aislamientos de los pacientes pediátricos también son diferentes, con una baja frecuencia de estas islas. Ninguna cepa tuvo la presencia de todas las islas genómicas y solo una cepa presentó cinco islas genómicas.

Pseudomonas aeruginosa

En el 100% de las cepas se encontró la isla genómica PAPI-2, la isla PAPI-1 en el 49% y la isla PAPI-1 en el 47 %. La Isla PAPI-2 está integrada de forma estable y perteneciente a la Familia de islas *ExoU*. Esta isla codifica la citotoxina ExoU, una fosfolipasa potente y su acompañante *SPCU*. *ExoU* ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que es la más potente de las proteínas efectoras T3SS conocidas en *Pseudomonas aeruginosa*. La introducción de *exoU* en cepas que carecían de este gen se tradujo en un notable incremento de la virulencia en modelos murinos con neumonía aguda. Trabajos recientes han sugerido que *ExoU* perjudica las respuestas del hospedero a nivel pulmón a través de lisar selectivamente a los fagocitos, los cuales desempeñan un papel crucial durante la fase de infección temprana. Además, la secreción de *ExoU* por una cepa infectante se ha demostrado ser un marcador de alta virulencia y mala evolución clínica en la neumonía adquirida en el hospital³⁴. Respecto a la isla PAPI-1 los productos de genes resultantes pueden funcionar en la inhibición de un gran número de deshidrogenasas, además de que proporcionan un gran número de cofactores reducidos para las reacciones de desintoxicación de cationes lo que sugiere un papel de los genes de PAPI-1 en la protección de las bacterias contra el daño oxidativo³⁵. Es evidente que la presencia de estas islas genómicas hace más virulenta a una cepa. En nuestro estudio el 69% de pacientes tuvieron un curso grave de infección por *Pseudomonas aeruginosa* (sepsis grave 43% o choque séptico 24%) aunque a diferencia de los estudios donde se demostraron estas islas nuestros pacientes no cursaron con neumonía sin embargo un gran porcentaje curso con infección nosocomial.

Se ha encontrado además que la frecuencia alta de Islas genómicas en cepas *Pseudomonas aeruginosa* tiene relación con cepas con perfil de multirresistencia²³. En las cepas aisladas en nuestros pacientes pediátricos la mayoría resulta ser sensible a todos los grupos de antimicrobianos lo que podría sugerir una menor frecuencia de identificación de las islas genómicas.

Este es uno de los primeros estudios donde se describen las islas genómicas y genes de virulencia en aislamientos de pacientes pediátricos, con una infección grave por *Pseudomonas aeruginosa* que en su mayoría son cepas sensibles a antibióticos. Tiene algunas limitaciones, como la naturaleza retrospectiva y que la información fuera basada en lo anotado en los expedientes

Pseudomonas aeruginosa

clínicos. Por ello no se incluyó un análisis más preciso de la evolución y desenlace de los pacientes. Afortunadamente no hubo expedientes incompletos o que no estuvieran disponibles para su revisión.

CONCLUSIÓN.

Encontramos que las *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en hemocultivos de pacientes pediátricos que cursaron con sepsis, presentan con mayor frecuencia las islas genómicas PAPI-2 y PAPI-1 y PAPI-1 y PAPI-1. Estas cepas no tienen perfil de multirresistencia y la mayoría son sensibles a antimicrobianos de primera línea, no hay clonas predominantes en nuestra unidad hospitalaria a pesar de que más de la mitad son de origen nosocomial, identificadas principalmente en sepsis relacionada a catéter. La mayoría de las defunciones se presentaron en pacientes con neutropenia.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levi SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev. 2011;35:652–680.
- 2.- Palleroni NJ. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. Microbiology 2003;149:1-7.
- 3.- Peix A, Ramirez-Bahena MH, Velazquez E. Historical evolution and current status of taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infect Genet Evol. 2009; 9:1132-1147.
- 4.- Gaspar MC, Couet W, Olivier JC, Pais AA, Sousa JJ. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32:1231-1252.
- 5.- Gilligan PH. Capítulo 31 *Pseudomonas* y bacterias relacionadas En: Microbiología Médica. Murray PR, Kent SR, Pfauer Michael A. Editorial Elsevier, Quinta Edición, España, 2006, pp 357–367.
- 6.- Meyer JM, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, Achouak W, Palleroni NJ. Siderophore typing a powerful tool for the identification fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. Appl Environ Microbiol. 2002;68:2745-2753.
- 7.- DalBen MF, Basso M, Garcia CP, Costa SF, Toscano CM, Jarvis WR, Lobo RD, Oliveira MS, Levin AS. Colonization pressure as risk factor for colonization by multiresistant *Acinetobacter spp* and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit, Clinics (Sao Paulo). 2013;68(8):1128-33.
- 8.- Sebastian MR, Lodha R, Kapil A, Kabra SK. Oral mucosal decontamination with chlorhexidine for the prevention of ventilator-associated pneumonia in children - a randomized, controlled trial. Pediatr Crit Care Med. 2012;13:305-10.
- 9.- Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. Intensive Care Med. 2007; 33: 1155-1161.
- 10.- Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, Régnier B. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. J Hosp Infect. 2003;53:274-82.

Pseudomonas aeruginosa

- 11.- Vallés J, Mariscal D, Cortés P, Coll P, Villagrà A, Díaz E, Artigas A, Rello J. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 2004;30:1768-75.
- 12.- Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011;69:393-403
- 13.- Ledizet M, Murray TS, Puttagunta S, Slade MD, Quagliarello VJ, Kazmierczak BI. The ability of virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa* to predict clinical disease in hospitalized patients. *PLoS One.* 2012;7.
- 14.- Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW, Wiener-Kronish JP. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis.* 2001;183:1767-74.
- 15.- Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:654-65.
- 16.- Woods DE. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol.* 2004;12:437-439.
- 17.- Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:79-92.
- 18.- Høiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilms mode of growth. *Microbes Infect.* 2001;3:23-35.
- 19.- Fraimow HS, Tsigrelis C. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: Mechanisms, Epidemiology, and Management of Specific Resistant Pathogens. *Crit Care Clin.* 2011;27:163-205.

- 20.- Kiewitz C, Tummer B. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol* 2000; 182:3125-3135.
- 21.- Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol*. 2011;2:150.
- 22.- Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74:621-41.
- 23.- Morales-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Delgado-Sapién G, Sandner-Miranda L, Méndez JL, González-Valencia G, Cravioto A. Genetic and Phenotypic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Population with High Frequency of genomic island. *PLoS One*. 2012;7.
- 24.- Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Martínez-Romero E. Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. *Salud Pública Mex* 2009;51:439-446.
- 25.- Corona-Nakamura AL, Miranda-Navales MG, Leños-Miranda B, Portillo-Gómez L, Hernández-Chávez A, Anthon-Rendón J, Aguilar-Benavides S. Epidemiology study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res*. 2001;32:238-42.
- 26.-Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Keller N, Berger H, Passwell JH, Barzilai A. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children: analysis of trends in prevalence, antibiotic resistance and prognostic factors. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:959-63.
- 27.- Yang MA, Lee J, Choi EH, Lee HJ. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children over ten consecutive years: analysis of clinical characteristics, risk factors of multi-drug resistance and clinical outcomes. *J Korean Med Sci*. 2011;26:612–8.
- 28.- Zhang Q, Smith JC, Zhu Q, Guo Z, MacDonald NE. A five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children hospitalized at a single center in southern China. *Int J Infect Dis*. 2012;16:628-32.
29. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al.: Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1–12.

Pseudomonas aeruginosa

30.- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9.

31.- Tamma PD, Turnbull AE, Milstone AM, Hsu AJ, Carroll KC, Cosgrove SE. Does the piperacillin minimum inhibitory concentration for *Pseudomonas aeruginosa* influence clinical outcomes of children with pseudomonal bacteremia?. *Clin Infect Dis.* 2012 Sep;55(6):799-806.

32.- Adam HJ, Baxter MR, Davidson RJ, Rubinstein E, Fanella S, Karlowsky JA, Lagacé-Wiens PR, Hoban DJ, Zhanel GG. Comparison of pathogens and their antimicrobial resistance patterns in paediatric, adult and elderly patients in Canadian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68 :131-7.

33.- Wang LJ, Song WL, Sun Y, Liu CF, Zhang ZJ. Clinical characteristics and drug resistance in children infected with *Pseudomonas aeruginosa* in the pediatric intensive care unit. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2013 Feb;15(2):117-20.

34 Harrison EM, Carter ME, Luck S, Ou HY, He X, Deng Z, O'Callaghan C, Kadioglu A, Rajakumar K. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect Immun.* 2010 Apr;78(4):1437-46.

35.- Liang X, Pham XQ, Olson MV, Lory S. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2001 Feb;183(3):843-53.

ANEXO 1.

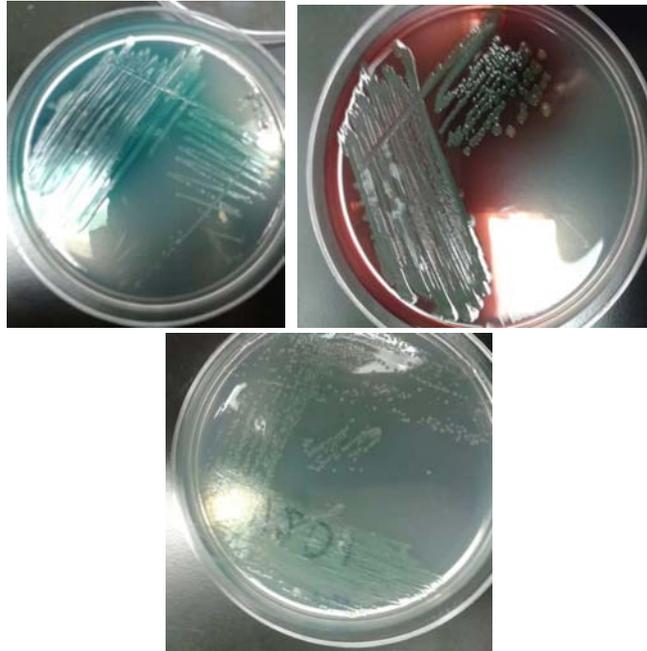
**PRIMERS PARA IDENTIFICAR GENES DE VIRULENCIA E ISLAS DE PATOGENICIDAD DE
*Pseudomonas aeruginosa*²³**

Gen/GEIs*	Secuencia de Primers directo (5'-3')	Secuencia de Primers inverso (5'-3')	Temp	Tamaño del producto de PCR.
Virulence gene				
ToxA	TCAGGGCGCACGAGCAACGAGA	GACAGCCGCGCCGCCAGGTAGAGG	66.1°C	454pb
LasB	ACTGTCGCGGCGCATTTCGTCAT	CATCGCGTGCCGTCGCCAGTAGG	65°C	433pb
Leca	CGATGTCATTACCATCGTCG	TGATTGCACCCTGGACATTA	65°C	215pb
AlgR	AGGGCAACTGGACGGCTATC	TGTGGTCGGCAATGAAGAAGA	63°C	437pb
PlcH	CGACGAGGGCGACGGTCTATGA	CCGGGACGGCTCTTGGGCTCGTA	66°C	447pb
phzA1	AACCACTCTGGGTCGAGTG	GTGGGAATACCGTCACGTTT	65°C	203pb
ToxR	ATGGCATCTATGCGAGGAAC	GCAGGGGAATGAAGTTCTTG	65°C	207pb
PilA				
pilB/trNA ^{Thr}	TCCAGCAGCATCTTGTGACGAA	CGAATGAGCTGCTTACCAGACAGCT	55°C	1-4-kb
pilA probe	TGATCGAACTGATGATCGTGGTTGCGATCATCGG		58°C	-
OprL	AGGGCGGCGATGCTTCC	CGACGCGACGGTTCTGAG	61.1°C	420pb
LipA				
LipA	CAAGCCGGCAAGGTGGAAGTCG	CGGATCTCGCGCAGGCAGTCG	65.1°C	456pb
PAGI-1				
orf3	TGGTGCTGACCAGCGACAAG	TCCATCGACTCGGTGCGTAG	60°C	958pb
orf18	ATTCCTCCACTGCCGTTACAACG	CCTTGCTCATCTGGAACAGGTAGC	60°C	1039pb
orf42	CGGAGAACCATCTCTCGCACAC	GGCTAAGACGTTTCGACTGATTCC	60°C	675pb
PAGI-2				
c22	CCTTCGTCCATTACCTGTGGAAC	AACTTGCGAGCCAACTCACG	62.4°C	943pb
c105	GATTGATGCTCAACGACGATGG	GCTGTTCCGCCTTCAGTTCC	59°C	681pb
PAGI-3				
sg8	TACAGAGTGCCCGAGTGATG	GTGCTTCCTGAGAGACAGACG	62°C	732pb
sg100	GCAATCTGTACGTCCTGCACG	AGCACGGCTTGTCGCTGTTT	62°C	553pb
PAGI-4				
CL22	CATGATCCGGCACACTGAGGTC	ATGATGGCGAGCGCTACAAGGTTT	60.6°C	464pb
PAPI-1				
976F/PAPI-1R	GCCTGACGGTGTCTGTTAT	GCTGCCTCTCTACGAACA	58°C	2600pb
4542F/intF	GTGGTGATGACCTCCAACCT	AGCTACATCGAGGCCGACTA	58°C	1600pb
SojR/4541F	CGAGCACAGAAATGTCCTGA	GACAAGACCAGCCACAACCT	58°C	1600pb
IntF/sojR	AGCTACATCGAGGCCGACTA	CGAGCACAGAAATGTCCTGA	58°C	1600pb
pKLC102				
cp10	CGGACCACTAGATAGCCAGG	GGACGCCATTGAGTATGCGC	61°C	255pb
cp44	GGGTCCGCAAACTTTCCGC	GCTTGAGGTTGGGCAATCG	61°C	272pb
cp97	GGATATCTACGTACCCCGGC	CTTTTTACCCGCAAGTGGCGG	61°C	337pb
PAPI-2				
xerC	TGTTCCGCTCGGGTGCCTTCATC	CACGCATCACTCCCGCTGGTTC	66°C	417pb
PAPI-2 1F/1R				
RS07-RS08	GCGCAGGTCCAGAATGTGTGAGG	TCCCCGCCCGCAGAGTCA	66°C	402pb
PAPI-2 2F/2R				
exoU	GCGGCGCAACGACAACCTGAT	GAAAAGCCACCCCGCTGTGT	66°C	434pb
PAPI-2 3F/3R				

Pseudomonas aeruginosa

(Anexo 2) Pruebas de identificación.

1.- Cajas de cultivo PIA para la identificación de pigmentos de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas en este estudio.

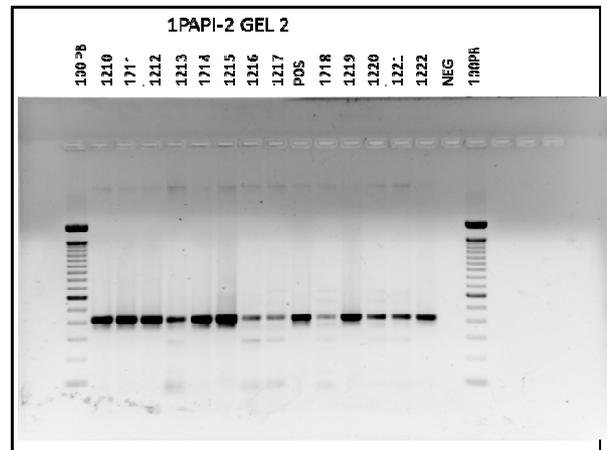
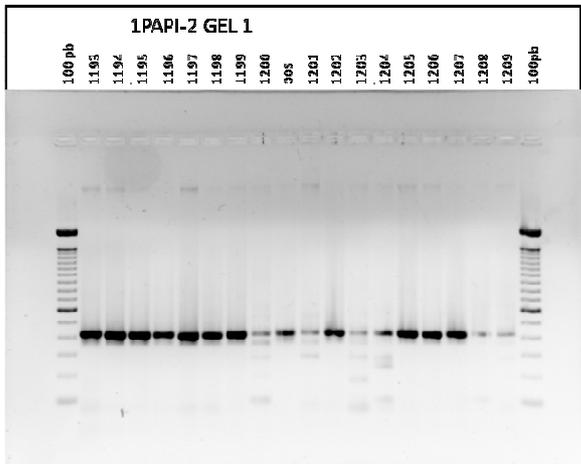


API 20-NE utilizado para corroborar la identificación de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.



Anexo 3 .-

Identificación de islas genómicas por PCR de acuerdo al peso molecular. Ejemplo gen 1 PAPI-2.



Identificación de genes de virulencia por PCR de acuerdo a peso molecular. Ejemplo gen *pLCH*.

