



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
“DR. EDUARDO LICEAGA”**

**RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA CAUSANTE DE INFECCION ASOCIADA A LA
ATENCIÓN EN SALUD EN EL SERVICIO DE PEDIATRIA DEL HOSPITAL
GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA: DRA. LILIANA KARINA ÁLVAREZ SALAZAR

**TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN ESPINOSA SOTERO
INFECTOLOGA PEDIATRA ADJUNTA AL CURSO DE PEDIATRÍA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR EDUARDO LICEAGA”**

MÉXICO CIUDAD DE MÉXICO NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

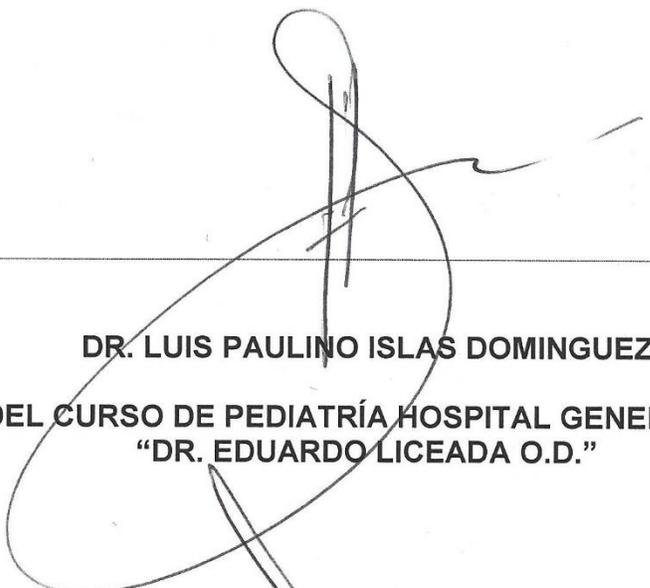


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



DR. LUIS PAULINO ISLAS DOMINGUEZ

**TITULAR DEL CURSO DE PEDIATRÍA HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
"DR. EDUARDO LICEADA O.D."**



DRA. MARIA DEL CARMEN ESPINOSA SOTERO

**TUTOR DE TESIS, MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE INFECTOLOGÍA
PEDIATRICA EN HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO
LICEAGA O.D."**



DRA. MARÍA TERESA CHAVARRIA JIMENEZ

**COORDINADORA DE ENSEÑANZA DE LA UNIDAD DE PEDIATRÍA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA O.D."**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ponerme en este camino, por darme la fuerza y guiarme con cada uno de mis pacientitos.

A mi mami, por siempre apoyarme en cada una de las decisiones que he tomado, por no dejarme caer y siempre estar al pendiente de mí, cuidarme y ayudarme en todo momento, muchas gracias mamita.

A mi papi, que a pesar de la distancia me procura, por brindarme las palabras de aliento en los momentos difíciles, gracias papi.

A mi hermanito, mi compañero de vida, aunque eres más pequeño eres mi ejemplo a seguir, te amo.

A mis tías, gracias por cuidarme, preocuparse por mí y siempre brindarme su apoyo.

A Yonathan, por mostrarme este bonito camino y recorrerlo juntos, por guiarme y apoyarme.

A la Dra. Carmen Espinosa, por ser mi guía, gracias por tener la confianza en mí para compartir este trabajo, por ayudarme a culminar este sueño.

A mi guardia, Arturo, Eduardo, Rodrigo, Ana y Azyadeth quienes hicieron que cada una de las guardias fueran tan agradables, por ser no solo compañeros si no amigos, por ser un buen equipo.

A Pau, en quien encontré a una gran amiga y ser un apoyo en esos momentos difíciles.

A todos mis compañeros de residencia que se convirtieron en una gran familia.

Y sobre todo gracias a esos pacientitos que depositaron su vida en mis manos, que me dejaron grandes enseñanzas, más allá de cuestiones médicas, fueron lecciones de vida.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

INDICE

INTRODUCCION.....	4
ANTECEDENTES.....	4
CARATERISTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	5
EPIDEMIOLOGIA.....	5
FACTORES DE RIESGO Y FACTORES PRONÓSTICO.....	9
FACTORES DE VIRULENCIA.....	10
MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	10
TRATAMIENTO.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	15
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
HIPOTESIS.....	15
OBJETIVOS GENERALES.....	15
MATERIAL Y METODOS.....	15
TIPO DE ESTUDIO.....	15
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	16
CRITERIOS.....	16
VARIABLES.....	16
METODOLOGÍA.....	17
RESULTADOS.....	19
CONCLUSIONES.....	21
BIBIOGRAFIA	22

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN
RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y CLONALIDAD DE PSEUDOMONAS
AERUGINOSA CAUSANTE DE INFECCIÓN ASOCIADA A LA ATENCIÓN EN
SALUD EN EL SERVICIO DE PEDIATRÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE
MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C. ⁽¹⁾

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos nosocomiales más relevantes, causando con frecuencia infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos y en estado crítico, debido a su naturaleza ubicua, capacidad de colonizar y sobrevivir en depósitos de hospital, y notable resistencia a los antibióticos y la virulencia intrínseca. La versatilidad de *P. aeruginosa* para combinar mutación impulsada y mecanismos de resistencia adquiridos ha dado lugar a la aparición de cepas que son resistentes a casi todos los antimicrobianos, comprometiendo drásticamente las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por estos patógenos. Especialmente en relación con las crecientes descripciones de brotes en varios hospitales de varios países, de las cepas productoras de metalo-beta-lactamasas (MBL), con VIM-2 que es la variante dominante MBL en España y en todo el mundo. Además, la mayoría de estos brotes son causados por un número muy limitado de genotipos de *P. aeruginosa*, denominados clones internacionales de alto riesgo. Por lo tanto, el desciframiento de los determinantes genéticos que impulsan el éxito de estos clones es crucial para el establecimiento de estrategias de control y tratamiento. ⁽²⁾

ANTECEDENTES

P. aeruginosa fue aislada en cultivo puro de heridas cutáneas por primera vez en 1882 por Gessard. ⁽³⁾ Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de los pigmentos piocianina, de color azul, y

pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración.

(4) Es una bacteria Gram-negativa perteneciente al grupo γ de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias. Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón.

(5)

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo aerobio, no fermentador, catalasa positiva, oxidasa positiva, móvil, no produce esporas y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. (6,7)

EPIDEMIOLOGÍA

P. aeruginosa es un agente patógeno nosocomial, de amplia distribución mundial. Representa el 11-13.8% de todas las infecciones asociadas a la atención en salud. En las Unidades de Cuidados Intensivos es responsable de un porcentaje aún más alto de infecciones, con tasas de 13.2-22.6%⁽⁸⁾. Este microorganismo se ha identificado como la segunda causa más común de neumonía adquirida en la comunidad, neumonía asociada con la atención médica y neumonía asociada a ventilación mecánica⁽⁹⁾. En las Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricas, *P. aeruginosa* es la causa más frecuente de neumonía intrahospitalaria. Es un patógeno importante en los pacientes quemados, cuya frecuencia de colonización

aumenta significativamente durante la primera semana de internamiento ⁽⁸⁾. También es responsable de un 6% de los casos de infecciones de la herida quirúrgica y de hasta el 16.3% de las infecciones del tracto urinario en las Unidades de Cuidados Intensivos. Se han reportado bacteriemias por *P. aeruginosa* en el 4-6% de los casos, con tasas más altas (14-20%) en los pacientes quemados, internados en la Unidad de Cuidados Intensivos. Es un patógeno importante en personas con inmunodeficiencias primarias y adquiridas. Los receptores de trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea tienen tasas aumentadas de bacteriemia por *P. aeruginosa* en comparación con la población general hospitalaria, al igual que los pacientes con infección por el VIH (tasas 10 veces más altas) ⁽⁹⁾. *P. aeruginosa* es una causa importante de infección en los casos de interrupciones de la barrera cutánea, como en los pacientes quemados y en aquellos con necrólisis epidérmica tóxica. Además, esta bacteria suele aislarse de pacientes con lesiones de pie diabético y cumple un papel importante en las personas con Fibrosis Quística, en las cuales son frecuentes las infecciones crónicas y recurrentes del tracto pulmonar. ⁽⁹⁾

Las infecciones nosocomiales son un importante problema de salud; los niños ingresados a en la Unidad de cuidados intensivos, son especialmente vulnerables a infecciones nosocomiales debido a su inmunocrompromiso y a la alta prevalencia de uso de dispositivos invasivos durante su estabilización. La prevalencia de infecciones nosocomiales en pacientes de UCIP es aproximadamente 3-23.6%; dichas infecciones contribuyen a la mortalidad, la morbilidad y costos. ⁽¹⁰⁾

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria medioambiental ubicua y sigue siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad en las infecciones nosocomiales por patógenos gram-negativos; se considera una de las infecciones más graves adquiridas en el hospital, con una mortalidad que va desde 20- 50%.⁽¹¹⁾

P. aeruginosa es resistente a una amplia gama de agentes antimicrobianos debido a la resistencia intrínseca y la rápida adquisición de resistencia adicional, que a menudo hace que estas infecciones sean difíciles de tratar. ⁽¹¹⁾

Los antibióticos carbapenémicos generalmente se consideran los fármacos de primera línea para el tratamiento de casos graves de infecciones por *P. aeruginosa*;

sin embargo las cepas resistentes a carbapenem han aumentado constantemente en los últimos años, considerando una amenaza para la salud pública.⁽¹¹⁾

Las metalobetalactamasas son determinantes de resistencia para aumentar la relevancia clínica de las bacterias gram negativas. La difusión mundial de los genes adquiridos de metalobetalactamasas y la aparición de nuevas variantes se está convirtiendo en una amenaza emergente para la salud pública, ya que por lo general se realiza por elementos genéticos móviles que difunden rápidamente. El aumento de las tasas de mortalidad se ha documentado en los pacientes infectados por *P. aeruginosa* productores de MBL, las tasas han sido exacerbadas por terapia empírica inadecuada; por lo tanto la detección temprana y la identificación de los organismos productores de MBL es de crucial importancia para la prevención de la diseminación nosocomial a través de un tratamiento adecuado, así como la aplicación de medidas de control de las infecciones.⁽¹²⁾

La epidemiología de la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa* ha sido ampliamente reportada en todos los continentes. En Estados Unidos, un estudio caso-control fue conducido entre aislamientos resistentes a imipenem y confirmó que la administración de este antibiótico es un factor de riesgo principal que favorece la aparición de cepas con sensibilidad disminuida al mismo.⁽¹³⁾ Una comparación de riesgos de la emergencia de resistencia que evaluó cuatro agentes antipseudomónicos verificó que la resistencia emergió en el 10.2% de los pacientes y determinó que el tratamiento con imipenem favorecía la aparición de resistencia frente a cualquiera de los antibióticos evaluados ($p < 0.02$).⁽¹⁴⁾ Un análisis realizado en aislamientos recuperados de piscinas y bañeras de hidromasaje indicó un 26% de resistencia a imipenem y que el 96% de estas cepas fueron multirresistentes.⁽¹⁵⁾ En México, en un hospital de nivel II, aislamientos de pacientes hospitalizados mostraron una alta resistencia a amikacina (62.9%) e imipenem (54.2%), disminuyendo a 19.2% con respecto a piperacilina/tazobactam.⁽¹⁶⁾

En Brasil un estudio en un hospital privado se reportó alta resistencia a ceftazidima (90.7%) e imipenem (82.7%) y que entre las cepas resistentes a estos dos antibióticos el 56.4% fueron productoras de metalo- β -lactamasas, detectándose además el gen *bla*_{SPM-1} en el 73.4% de los aislamientos.⁽¹⁷⁾

En Cuba en aislados de pacientes pediátricos hospitalizados con FQ se encontró una baja resistencia a ceftazidima (12.9%), siendo menor al 8% para el caso de las fluoroquinolonas. ⁽¹⁸⁾

En Chile un estudio en aislados de pacientes pediátricos y adultos hospitalizados se reportó una resistencia incrementada a ciprofloxacino (68.4%) y levofloxacino (78.9%), encontrándose cepas resistentes a todos los antibióticos probados. ⁽¹⁹⁾

En Perú se describieron microorganismos aislados de pacientes internados en un hospital universitario con una resistencia elevada a ceftazidima (71%), aztreonam (62%) e imipenem (47%). Meropenem fue el único de los antibióticos probados que presentó una resistencia menor al 30%. ⁽²⁰⁾

En Venezuela un análisis en cepas aisladas de pacientes hospitalizados y comunitarios evidenció un 100% de resistencia a imipenem y Meropenem. Todas las cepas fueron positivas para la producción de metalo- β - lactamasas y se determinó la presencia del gen *bla*_{VIM-like} en todas ellas. ⁽²¹⁾

En Argentina en un estudio hospitalario de 10 años se informó una elevada resistencia a Meropenem (50%) y algo menor a imipenem (30.4%), señalándose que la resistencia se debía a mecanismos de impermeabilidad e hiperexpresión de bombas de eflujo. ⁽²²⁾

En el Reino Unido un estudio en 25 laboratorios centinelas con aislados de pacientes internados y comunitarios verificó bajos niveles de resistencia a imipenem (8.1%) y Meropenem (4.2%), aunque tasas mayores de resistencia fueron reportadas en pacientes con fluoroquinolonas ($p < 0.01$). ⁽²³⁾

En Francia en un hospital universitario se evaluaron cepas nosocomiales y hospitalarias y se observó una resistencia moderada a imipenem (15.6%), ceftazidima (14.2%) y piperacilina/tazobactam (14.8%). Durante el período de estudio, sin embargo, hubo una disminución de la resistencia a los antibióticos examinados entre las cepas de origen comunitario. ⁽²⁴⁾

FACTORES DE RIESGO Y FACTORES PRONÓSTICO

Las infecciones por cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL han demostrado que se asocian con tasas de mortalidad más altas que las infecciones con cepas de *P. aeruginosa* MBL negativas; y una mayor incidencia de enfermedad invasiva. ⁽²⁵⁾

La exposición a cualquier antibiótico anti-*pseudomonas* como monoterapia es el principal factor de riesgo para el desarrollo de resistencias, ya que predispone al paciente a la colonización por *P. aeruginosa* con resistencia intrínseca. ⁽²⁶⁾

Los factores de riesgo asociados con infecciones de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL incluyen el uso reciente de betalactámicos o fluoroquinolonas, insuficiencia renal, catéteres urinarios permanentes, enfermedades neurológicas, quimioterapia antineoplásica, la terapia con corticosteroides y/o estancia en la Unidad de cuidados intensivos. ⁽²⁵⁾

Otros factores descritos son la hospitalización, exposición a terapia antimicrobiana y estados de inmunocompromiso. El clínico debe estar alerta, pues los cultivos para *P. aeruginosa* emergen con resistencia después de periodos de tratamiento por 6-10 días, o administrados por segunda ocasión. ⁽²⁷⁾ Por si fuera poco, otros predictores de mortalidad intrahospitalaria agravan el pronóstico para infecciones causadas *P. aeruginosa* multi-drogo-resistente son: género masculino, presencia de fiebre, edad, diabetes mellitus, cáncer, falla cardiaca, hemodiálisis, leucocitosis, coagulación intravascular diseminada (CID) y choque. ⁽²⁸⁾

Los factores pronósticos que se han referenciado y se han asociado con mortalidad mediante la utilización de análisis univariantes han sido los siguientes: utilización inadecuada de antibióticos, tratamiento en monoterapia, enfermedad de base rápidamente fatal o enfermedad de riesgo, foco primario de la bacteriemia en infección respiratoria o infección de la piel o de foco desconocido, presencia de shock o sepsis grave, CID, evolución hacia falla multiorgánica, cirugía previa, presencia de metástasis sépticas, leucopenia y neutropenia. ⁽²⁹⁾

FACTORES DE VIRULENCIA

P. aeruginosa produce una amplia variedad de factores de virulencia, por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descripta como multifactorial. Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias (*pili*), la matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y la formación de biopelículas. Algunos factores estudiados son el alginato (producido por un subgrupo de cepas), los polímeros de polisacáridos que facilitan la adherencia a la superficie epitelial pulmonar y funcionan como una barrera para los fagocitos y para los antibióticos, inhibe la unión de los anticuerpos y atenúa la respuesta del hospedero.⁽³⁰⁾ 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.⁽³¹⁾ El sistema de secreción de tipo III es el responsable por la secreción de las toxinas exoS, exoT, exoU y exoY; las tres primeras vinculadas a la virulencia. Exo S y Exo T desorganizan el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquean la fagocitosis y causan la muerte celular, en tanto ExoU favorece la inflamación excesiva, incrementa el daño tisular y también causa la muerte celular.⁽³²⁾ Las biopelículas son comunidades bacterianas intrincadas, altamente organizadas, encajadas en una matriz compuesta de exopolisacáridos, ADN y proteínas que están unidas a una superficie dificultando la acción antimicrobiana.⁽³³⁾

MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Desde la introducción de antibióticos en la terapia clínica, las bacterias han desarrollado estrategias de resistencia cada vez más sofisticadas. Esto ha dado lugar a la aparición y propagación de los llamados 'superbacterias', resistentes a prácticamente todos los fármacos antimicrobianos disponibles en el mercado. La bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, que puede infectar un amplio rango de hospedadores animales y vegetales, se ha convertido en una superbacteria. Este patógeno oportunista es una causa principal de infecciones nosocomiales.⁽³⁴⁾

Los dos tipos de resistencia adquirida implican la transferencia horizontal de los elementos genéticos y la resistencia mutacional. Elementos de ADN, incluyendo

plásmidos, transposones, integrones, profagos e islas de resistencia, pueden albergar genes de resistencia a antibióticos y pueden ser adquiridos por conjugación, transformación o transducción. Esto puede aumentar la resistencia a los antibióticos e incluso resistencia a múltiples fármacos, debido a que los plásmidos que pueden contener múltiples casetes de resistencia. Dicha transferencia horizontal afecta principalmente a aminoglucósidos y resistencia a β -lactamasas en *P. aeruginosa*, pero se ha observado para varias otras clases de antibióticos. Además de la cromosómica inducible AmpC β -lactamasa, algunas cepas de *P. aeruginosa* adquieren nuevos plásmidos que codifican betalactamasas que confieren resistencia a las penicilinas y cefalosporinas. De gran preocupación es la proliferación de plásmido mediada por betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que se describieron originalmente en las enterobacterias, y metalo-betalactamasas (MBLs) que inactivan los carbapenémicos.

Una segunda forma de resistencia adquirida es la resistencia mutacional. La frecuencia de mutación espontánea varía entre los antibióticos con frecuencias de resistencia que van desde 10^{-6} a 10^{-9} para los antibióticos individuales. La tasa de mutación puede aumentar aún más en ciertas condiciones tales como en presencia de agentes que dañan el ADN o durante el crecimiento en un biofilm⁽³⁴⁾

P. aeruginosa produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como β -lactamasas de amplio espectro, metalo- β -lactamasas (MBL), alteración de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación de ADN-girasas y bombas de expulsión activa.⁽¹⁾ La resistencia específica a carbapenémicos es atribuida a la falta de permeabilidad en la porina (OprD), a un incremento en la expresión de las bombas de expulsión activa (MexAB-OprD) y a la producción de metaloenzimas.⁽¹⁾ La resistencia a carbapenémicos se ha incrementado recientemente debido a la diseminación de metalobetalactamasas pertenecientes a la clase B de Ambler, capaces de hidrolizar estos compuestos además de las penicilinas y cefalosporinas; estas enzimas requieren zinc para su actividad catalítica y su actividad es inhibida por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético.⁽⁴⁾

En un estudio multicéntrico llevado a cabo en hospitales españoles, la frecuencia de aislados clínicos de *P aeruginosa* resistentes a imipenem o a meropenem es del 18.9% y la presencia de metalobetalactamasas en estos aislados se da con una frecuencia del 0.4%.⁽⁴⁾

Las Metalobetalactamasas descritas hasta la fecha en *Pseudomonas spp.* Se agrupan en 4 grupo moleculares: IMP, VIM, GIM, SPM; los genes causantes de la producción de MBL se encuentran formando parte de un integrón, que puede estar localizado en un plásmido movilizable o insertado en el cromosoma.⁽⁴⁾

En el caso de la porina OprD es el canal de entrada de los carbapenémicos de uso clínico en *P. aeruginosa*; las mutaciones del gen oprD son bastante frecuentes y se relacionan de forma directa con la resistencia a carbapenemicos en esta especie.⁽⁴⁾

Multirresistencia se considera que es un indicador clave de cepas bacterianas problemáticas debido a que quebranta regímenes de tratamiento empíricos, retrasando así la administración de la terapia antibiótica apropiada, y reduce las opciones de tratamiento que son apropiados. Ambos factores contribuyen al aumento de la mortalidad de los pacientes, y limitan la propagación de cepas multirresistentes se considera que es una prioridad el control de infecciones.⁽⁸⁾

Está surgiendo evidencia para indicar que determinados clones adquieren genes de resistencia similares en múltiples ocasiones, y que la evolución afina estas asociaciones para mantener o aumentar la aptitud bacteriana.⁽⁸⁾

Los términos 'cepa' y 'clon' se utilizan ampliamente, pero su significado puede ser abierto a la interpretación. Por lo tanto, "cepa" no debe confundirse con "aislar" porque los aislamientos que no se distinguen por tipificación pueden ser considerados como descendientes de la misma cepa, mientras que las "cepas " deben ser distinguibles entre sí por distintos métodos. Determinar si desea utilizar el término "cepa" o "clon" es aún más difícil, sobre todo teniendo en cuenta que el uso lógico de la palabra "clon" es describir aislados que descienden directamente de un original; la palabra se utiliza comúnmente como una alternativa a la "cepa". Sin embargo, se propuso que 'clon' puede ser usado para describir los aislamientos que, a pesar de que pueden haber sido cultivadas de forma independiente a partir de diferentes fuentes en diferentes lugares y tal vez en diferentes momentos,

todavía tienen muchas similitudes fenotípicas idénticos y genotípicas que la explicación más probable es un origen común; esto se aplica comúnmente a las bacterias multirresistentes que se encuentran en varias ubicaciones. ⁽⁸⁾

Entre los métodos más comunes que se utilizan actualmente para el genotipado de las bacterias son secuencias multilocus (MLST), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), otros métodos de PCR fingerprinting, análisis variable del número de repeticiones de múltiples locus tándem (MVLA). MLST, que utiliza variación de la secuencia en un número de genes (rearrreglo de genes) para definir tipos, es excelente para los estudios evolutivos y para comparar aislados fácilmente, pero puede carecer de la discriminación necesaria para el análisis de brote. ⁽⁸⁾

PFGE, después de restricción del ADN genómico con una adecuada enzima de corte, proporciona una excelente discriminación y se ha utilizado ampliamente para la tipificación de una serie de especies bacterianas, pero no es tan "portátil" como son métodos tales como MLST y MVLA, que describen aislados numéricamente. ⁽⁸⁾

Los métodos de huellas digitales de PCR son métodos de tipificación populares, también, pero, con la excepción de AFLP, a menudo se considera no muy reproducible entre los laboratorios. Un método rep-PCR automatizada, sin embargo, cada día se usa, y puede proporcionar una discriminación similar a la de PFGE. MVLA, un método basado en PCR que consiste en determinar el número de unidades que se repiten en múltiples loci con repetición de secuencia corta, está ganando rápidamente popularidad para las investigaciones epidemiológicas, y también es portátil; su poder discriminatorio varía con el loci elegido, proporcionando el potencial para adaptar la tipificación en una resolución apropiada. La capacidad de este método para proporcionar mayor resolución que PFGE ha sido explotado en una serie de estudios. ⁽⁸⁾

TRATAMIENTO

El tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* resistente debe incluir antimicrobianos seleccionados según el antibiograma. La producción de metalo- β -

lactamasas, que inactivan muchos antibióticos β -lactámicos (excepto el aztreonam), supone un gran problema en el manejo de las infecciones por este microorganismo. La colistina, una molécula descubierta hace más de 50 años, que fue retirada debido a su alta incidencia de nefrotoxicidad, está siendo objeto de un gran interés. La colistina tiene un mecanismo de acción relacionado con la alteración de la membrana citoplasmática, por lo que se producen pocas resistencias cruzadas con otros agentes antipseudomónicos; además, este compuesto tiene una baja capacidad de selección rápida de mutantes resistentes. La colistina presenta una actividad bactericida dependiente de la concentración, y en la actualidad se está utilizando tanto por vía parenteral o inhalada con bajas tasas de nefrotoxicidad. Se ha sugerido recientemente en el caso de cepas multirresistentes que el aumento de las dosis habituales de colistina se asocia con una mayor erradicación microbiológica, y deberá tenerse en cuenta el aumento de nefrotoxicidad que ello conlleva.⁽³⁵⁾

El tratamiento convencional de infecciones por *P. aeruginosa* tradicionalmente suele incluir una combinación de antibióticos, incluyendo con frecuencia un β -lactámico (como piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, meropenem, imipenem o aztreonam) y un aminoglucósido (amikacina, gentamicina o tobramicina)⁵⁵. Sin embargo, hay pocas evidencias sólidas de la verdadera utilidad de esta aproximación terapéutica, considerando las bacteriemias por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, el uso de tratamiento combinado no se asocia a una menor mortalidad (temprana o global) que la observada con un tratamiento en monoterapia si se usa un compuesto al que *P. aeruginosa* sea sensible.³⁶

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe un aumento en la incidencia de infecciones nosocomiales por bacterias multirresistentes, específicamente por Gram-negativas. Estos microorganismos generalmente están implicados en infecciones graves, por lo que actualmente suponen un gran problema de salud.

Las infecciones que producen, tienen un peor pronóstico debido a la resistencia antimicrobiana, haciendo difícil su tratamiento, con altas tasas de mortalidad.

JUSTIFICACIÓN

En el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, *P. aeruginosa* es responsable de un número importante de infecciones nosocomiales en los pacientes pediátricos, además de producir un incremento significativo en la mortalidad.

El conocimiento del perfil de resistencia antimicrobiana y el principal mecanismo de patogenicidad en *P. aeruginosa*, sería de utilidad para definir el tratamiento antimicrobiano empírico más adecuado en las infecciones causadas por esta bacteria en los pacientes pediátricos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el perfil de resistencia antimicrobiana, el principal mecanismo de patogenicidad de *P. aeruginosa* causante de infección asociada a la atención en salud en Pediatría del Hospital General de México?

HIPÓTESIS

Si se detecta el perfil de resistencia antimicrobiana, el principal mecanismo de patogenicidad de *P. aeruginosa* causante de infección nosocomial en el Servicio de Pediatría del Hospital General de México, entonces serán aislamientos multirresistentes por producción de metalo- β -lactamasas.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa*.

Determinar si las cepas son productoras de metalo- β -lactamasas.

MATERIAL Y METODOS

TIPO DE ESTUDIO

Observacional, analítico, prospectivo, prolectivo y transversal.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Obtenido por conveniencia

Censo de los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos de hemocultivos, cultivos de líquido cefalorraquídeo, cultivos de secreción bronquial, urocultivos y cultivos de líquidos de herida asociados a infección asociada a la atención en salud en pacientes pediátricos, del 1 de Diciembre al 30 de Noviembre de 2016.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Cultivos positivos para *P. aeruginosa* (Sangre, LCR, secreción bronquial, urocultivo y líquido de secreción de herida), de pacientes con datos compatibles con infección asociada a la atención en salud (NOM-045, RHOVE).

Cultivos de pacientes hospitalizados en la Unidad de Pediatría del HGM.

Pacientes con más de 72 horas de estancia hospitalaria.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Cultivos positivos para *P. aeruginosa* de pacientes de otras áreas.

Cultivos positivos de pacientes clínicamente asintomáticos o que correspondan con colonización.

Cultivos positivos para otras bacterias.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Cultivos contaminados con otras bacterias.

Muestras perdidas.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

Variable independiente: Nuestra variable independiente será los cultivos positivos para *P. aeruginosa*.

Variable dependiente: Susceptibilidad antimicrobiana, mecanismos de resistencia y clonalidad bacteriana.

VARIABLE	DETERMINACIÓN	TIPO
Susceptibilidad Antimicrobiana	Sistema Vitek II y XL Laboratorio de Microbiología HGM	Nominal (Dicotómica)
Mecanismo de Resistencia	Producción de metalo-beta-lactamasa (E-Test y PCR)	Nominal (Dicotómica)

METODOLOGÍA

a) Selección de la muestra

La colección de las cepas se realizara a través del laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, que correspondan con los criterios de inclusión, provenientes del servicio de Pediatría 505. Se colectaran las muestras positivas consecutivas del 1ro de Enero al 30 de Junio de 2016. De cada caso se llenara un cuestionario sobre: genero, fuente de aislamiento, servicio hospitalario dentro de la unidad de Pediatría, diagnóstico del paciente, antibióticos previos al aislamiento y fecha de aislamiento.

b) Identificación primaria

La identificación primaria y el análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos, se realizaran en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital General de México, mediante métodos automatizados estandarizados (Sistema Vitek 2 y Vitek XL) y un panel de antibióticos definido. Este Laboratorio forma parte de la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana de México y cuenta con control de calidad interno y externo certificado.

c) Identificación bioquímica y molecular

Las cepas colectadas se enviarán a través de una red interna al laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínicas de la Unidad en Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se llevara a cabo este trabajo de tesis. Las cepas serán re-identificadas por el sistema comercial API 20 NE.

d) Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Se analizarán 13 antimicrobianos establecidos en el CLSI 2013 para *P. aeruginosa* mediante microdilución con el sistema SENSITRE II, que incluirá: amikacina (AMK), cepamina (FEP), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), Ciprofloxacino (CIP), Gentamicina (GEN), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), trobramicina (TOB), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), levofloxacino (LVX), ofloxacino (OFX) y ceftriaxona (CRO).

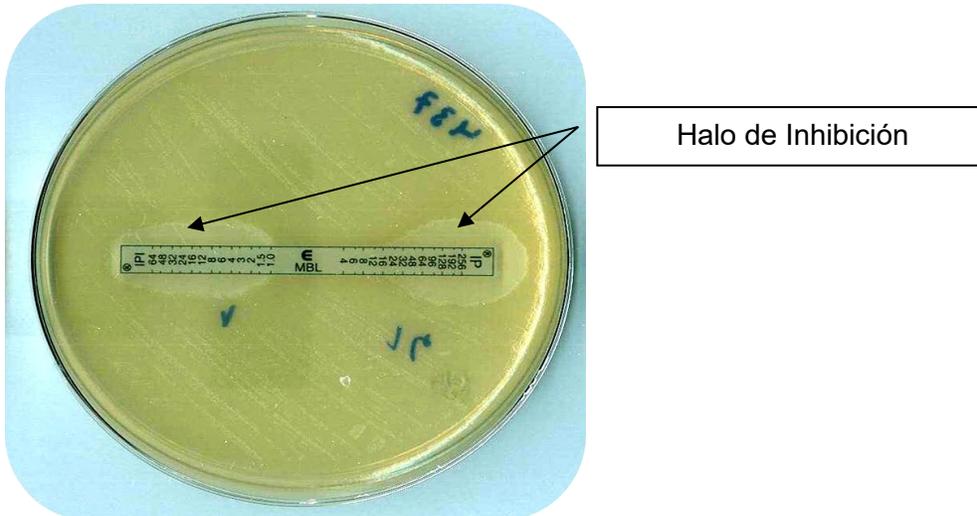
e) Detección fenotípica de la producción de MBLs

A todas las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (MEM y/o IPM) se les determinará el fenotipo de producción de MBLs, mediante la prueba de E-Test.

f) Prueba de E-Test para determinar el tipo de MBLs

Las cepas resistentes a IPM o MEM se sembrarán en gelosa MacConkey a 37°C 24 horas, se tomarán 2-3 colonias para ajustar la densidad bacteriana a 0.5 del nefelómetro de Mac Farland en solución salina estéril, para luego sembrar en forma masiva en medio Müeller-Hinton. Después se colocará la tira E-Test-IPM que tiene un gradiente de la concentración del antibiótico de 4-256 µg/mL de IPM (IP) en un extremo y del otro extremo la misma concentración del antibiótico más EDTA (IPI), como quelante de los iones zinc en una concentración de 1-64 µg/mL. Como control positivo se usará *P. aeruginosa* productora de IMP-15 y como control negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853. El fundamento de E-Test consiste en quelar al zinc de la MBL mediante la EDTA adicionado en el extremo marcado como "IPI", mientras que

del extremo marcado como "IP" solo contiene IPM y este sirve para conocer la CIM basal IMP. Un cociente entre IP/IPi, mayor o igual a 8 y se interpretara como producción de MBLs. como se muestra en la siguiente figura.



El análisis estadístico se llevara a cabo mediante el programa SPSS, con el cual se obtendrán las χ^2 .

RESULTADOS

Se analizaron un total de 15 aislamientos con *Pseudomonas aeruginosa* del 01 de Enero del 2016 al 30 de Junio del 2016. Dichos aislamientos fueron de 10 pacientes con patología diversa y 3 de ellos fueron defunciones.

Los servicios hospitalarios dentro del Servicio de Pediatría en donde se presentaron los aislamientos fueron: 9 cultivos de UTIP, 3 urgencias, 1 hemato-oncología y 2 Cirugía pediátrica.

La fuente de aislamiento donde se encontró *P aeruginosa*: 2 cultivos de LCR, 2 hemocultivos, 3 cultivos de herida, 7 cultivos bronquiales y 1 urocultivo.

En relación a los aislamientos por mes, se presentaron en un rango de 1-5 cultivos, con mayor presentación en el mes de Enero y Marzo.

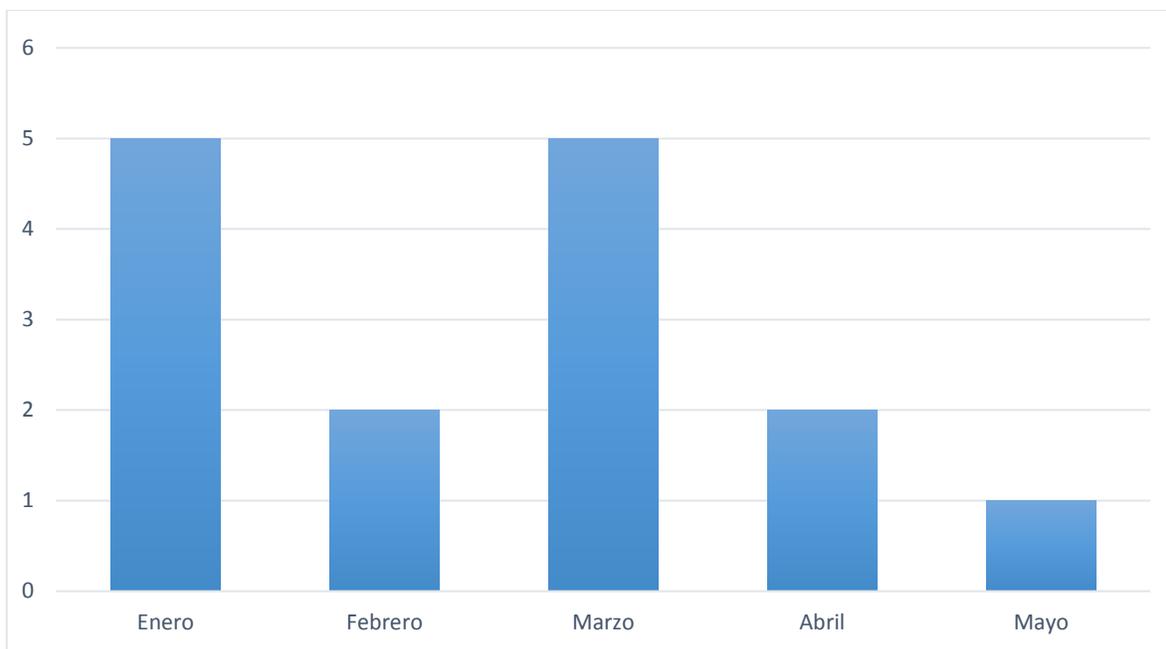


Tabla. Casos de Infecciones asociadas a atención de la salud por *P aeruginosa*

Posterior al análisis de susceptibilidad antimicrobiana se encontró:

Familia de Antibióticos	Antibiótico	Resistencia		Susceptible	
		Núm.	%	Núm.	%
Aminoglucósidos	Gentamicina	3	20	12	80
	Tobramicina	7	47	8	53
Cefalosporinas	Ceftriaxona	15	100	0	0
	Cefotaxima	8	53	7	47
	Ceftazidima	7	47	8	53
	Cefepime	5	33	10	67
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	7	47	8	53

	Levofloxacino	5	33	10	67
	Moxifloxacino	6	40	9	60
Inhibidores de Ac fólico	TMP/SMX	14	93	1	7
Carbapenémicos	Imipenem	11	73	4	27
	Meropenem	12	80	3	20
Polimixinas	Colistina	0	0	15	100

A todas las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (MEM y/o IPM) se les determinó el fenotipo de producción de MBLs, mediante la prueba de E-Test.

CONCLUSIONES

Se observó una disminución en la frecuencia de Infecciones asociadas a atención de la salud por *P. aeruginosa* durante el último bimestre de 2016.

Los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron MDR.

El mayor número de IAAS se presentó en la UTIP con un 60%.

El 93% de los aislamientos de *P. aeruginosa*, fueron productores de MBL, 53% de AmpC y 20 % BLEE.

La Mortalidad asociada a las IAAS por *P. aeruginosa* fue baja 30%

BIBLIOGRAFÍA

1. Ochoa SA, et al. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2013; 70(2):138-150
2. Viedma E, et al. Genome Sequence of VIM-2-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175, an Epidemic High-Risk Clone. *Genome Announc.* 1(2):e00112-13. doi:10.1128/genomeA.00112-13.
3. Wilson R, Dowling RB. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* 1998; 53 (3): 213-9.
4. Cruz Rodríguez M, et. al Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonasaeruginosa* productores de la metalobetalactamasa VIM-2 en Cantabria, España. *EnfermInfeccMicrobiolClin.* 2010; 28(2):99–10.
5. Hardalo, C. & S. C. Edberg 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.
6. Ferreira H, Lala ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. *Rev Panam Infectol* 2010; 12 (2): 44-50.
7. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009; 73(4): 338-44.
8. Neil Woodford, Jane F. Turton & David M. Livermore. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35 (2011) 736–755
9. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 2007; 67:351-68.
10. I Jordan García et al. Trends in nosocomial infections and multidrug-resistant microorganisms in Spanish pediatric intensive care units. *EnfermInfeccMicrobiolClin.* 2015
11. Zhang Y, Chen XL, Huang AW, Liu SL, Liu WJ, Zhang N, Lu XZ. Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Mar 23; 5:e27. doi: 10.1038/emi.2016.22.

12. A Lucena, L Dalla Costa, K Da Silva Nogueira, A Matos, A Gales, S Raboni. Comparison of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, Volume 32, Issue 10, December 2014, Pages 625-630
13. Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis* 1997; 25 (5): 1094-8.
14. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 (6): 1379-83.
15. Lutz JK, Lee J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8 (2): 554-64.
16. Murillo J, Sosa LS, López GL. Patrón de resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en el hospital general de Culiacán. *Arch Salud Sin* 2009; 3 (2): 6-11.
17. Gonçalves DCPS, Lima ABM, Leão LSNO, Filho JRC, Pimenta FC, Vieira JDG. Detecção de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42 (4): 411-4.
20. Pérez MF, Batlle MC, Verdera J, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quísticas. *Rev Cubana Med Trop* 2006; 58 (3): 207-11.
18. Pérez MF, Batlle MC, Verdera J, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quísticas. *Rev Cubana Med Trop* 2006; 58 (3): 207-11.
19. Zambrano A, Herrera A. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Rev Chil Infect* 2004; 21 (2): 117-24.
20. Luján DA, Ibarra JO, Mamani E. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. *Rev Biomed* 2008; 19 (3): 156-60.

21. Salazar P, Araque M, Mosqueda N. Análisis fenotípico y detección del gen *blaVIM* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas aisladas en Mérida, Venezuela. *Rev Fac Farm* 2010; 52 (1): 12-7.
22. Orecchini LA, López T, Littvik A. Resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* en un periodo de 10 años en el Hospital Rawson. *Rev Fac Cienc Méd* 2010; 67 (4): 135-40.
23. Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M and the *Pseudomonas* Study Group. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47 (6): 789-99.
24. Minchella A, Molinari L, Alonso S, Bouziges N, Sotto A, Lavigne JP. Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre.
25. Ørjan Samuelsen, et al. Molecular Epidemiology of Metallo-beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Norway and Sweden Shows Import of International Clones and Local Clonal Expansion. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Jan. 2010, p. 346–352 Vol. 54, American Society for Microbiology.
26. El Amari EB, Chamot E, Auckenthaler R, Pechère JC, Van Delden C. Influence of previous exposure to antibiotic therapy on the susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(11):1859-64.
27. Reinhardt A, Köhler T, Wood P, Rohner P, Dumas JL, Ricou B, et al. Development and persistence of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a longitudinal observation in mechanically ventilated patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr; 51(4):1341-50.
28. Wang CY, Jerng JS, Chen KY, Lee LN, Yu CJ, Hsueh PR, et al. Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Jan; 12(1):63-68.
29. F. Alvarez-Lerma et al. Factores de riesgo y factores pronósticos de las bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes ingresados en servicios de cuidados intensivos. *Medicina Clínica*. vol. 117. Núm. 19. 2001; 721-726.

30. Damron FH, Goldberg JB. Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2012; 84 (4): 595-607.
31. Wolf P, Esässer-Beile U. *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-agent. *Int J Med Microbiol* 2009; 299 (3): 161-76.
32. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci* 2012; 13 (8): 831-42.
33. Balasubramanian D, Scneper L, Kumari H, Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas* virulence. *Nucleic Acids Res* 2013; 41 (1): 1-20
34. Elena B.M. Breidenstein, César de la Fuente-Núñez, Robert E.W. Hancock *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, August 2011, Vol. 19, No. 8
35. Falagas ME, Kasiakou SK, Tsiodras S, Michalopoulos A. The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: A review of the recent literature. *Clin Med Res*. 2006; 4:138–46.
36. Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Effect of adequate single-drug versus combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. A post hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis*. 2013.