



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS  
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE  
PACIENTES CON INFECCIÓN POR  
*Pseudomonas aeruginosa*  
PANRESISTENTE Y SENSIBLE  
PRODUCTORA DE BIOPELÍCULA**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
SUBESPECIALIDAD EN

**INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA

**DRA. ANA ESTELA GAMIÑO ARROYO**

TUTOR

DRA. ALEJANDRA NAVA

ASESOR

DRA. MARGARITA NAVA FRÍAS.

DRA. NORMA VELÁZQUEZ GUADARRAMA.



MÉXICO, D. F.

FEBERO 2011



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS  
CLÍNICAS DE PACIENTES CON INFECCIÓN POR *Pseudomonas  
aeruginosa* PANRESISTENTE Y SENSIBLE PRODUCTORA DE  
BIOPELÍCULA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO SUBESPECIALISTA EN  
**INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA

**Dra. ANA ESTELA GAMIÑO ARROYO**

TUTOR DE TESIS

---

Dra. Alejandra Nava Ruíz  
Médico Adscrito al Departamento de Infectología Pediátrica

ASESOR DE TESIS

ASESOR DE TESIS

---

Dra. Margarita Nava Frías  
Médico Adscrito al Departamento de  
Infectología Pediátrica

---

Dra. Norma Velázquez Guadarrama  
Investigador del Laboratorio de  
Bacteriología Intestinal

MÉXICO, D. F.

Febrero 2011

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS  
CLÍNICAS DE PACIENTES CON INFECCIÓN POR *Pseudomonas  
aeruginosa* PANRESISTENTE Y SENSIBLE PRODUCTORA DE  
BIOPELÍCULA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO SUBESPECIALISTA EN  
**INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA

**Dra. ANA ESTELA GAMIÑO ARROYO**

COLABORADORES

M. C. Sara Ariadna Ochoa Pérez  
Dr. Juan Xicohtencatl Cortés.

Investigadores del Laboratorio de Bacteriología Intestinal

## DEDICATORIA

*A mis padres,*

*Por su entrega incondicional, a ellos les debo todo lo que soy.*

*Padre un pequeño homenaje a tu vida.*

*Siempre estás presente en mi corazón.*

*A mis hermanos,*

*Por todo lo que hemos vivido y compartido juntos.*

*Sus ánimos y consejos para seguir adelante.*

*A mi Willys,*

*Por todas sus bendiciones y sabios consejos.*

*A mis familiares,*

*Por todo su apoyo y ánimos para seguir adelante.*

*A mis amigos,*

*Por compartir generosamente su amistad, haciendo que las alegrías se multipliquen y las adversidades se disipen.*

## AGRADECIMIENTOS

*Estoy profundamente agradecida a todas aquellas personas que se han cruzado en mi vida, y me han llenado con su presencia, experiencia, sabiduría y han contribuido a que llegue hasta este momento.*

*A mis asesores y colaboradores para la realización de este trabajo y sus consejos.*

*A mis Maestros Pediatras Infectólogos por sus enseñanzas, por su gran labor y ejemplo.*

*Con especial gratitud a los Niños, quienes tanto me han enseñado.*

## I. ÍNDICE GENERAL

1. Marco Teórico.....	1
1.1 Epidemiología.....	1
1.2 Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.3 Identificación.....	2
1.4 Colonización.....	3
1.5 Patogénesis.....	4
1.6 Factores de virulencia.....	4
1.7 Importancia de la biopelícula en la producción de infección.....	7
1.7.1 Estructura de la biopelícula.....	8
1.7.2 Proceso de formación de biopelícula.....	8
1.7.3 Regulación de la formación de biopelícula.....	10
1.7.4 El papel de la biopelícula en el proceso de infección y la respuesta inmune.....	10
1.7.5 El papel de la biopelícula en el proceso de la infección y la respuesta a antibióticos.....	11
1.8 Mecanismos de resistencia.....	12
1.8.1 Resistencia intrínseca.....	13
A) Bombas de salida.....	13
B) Enzimas.....	14
1.8.2 Resistencia adquirida.....	14
1.8.3 Resistencia genética.....	14
A) Resistencia a $\beta$ -lactámicos.....	14
B) Resistencia a aminoglucósidos.....	15
C) Resistencia a quinolonas.....	16
1.9 regulación genica.....	16
1.10 Sistema <i>Quórum Sensing</i> .....	17
2. Antecedentes.....	19
3 Justificación.....	21
4. Planteamiento del problema.....	21
5. Objetivos.....	22
6. Diseño del estudio.....	22
7. Material y métodos.....	23

8. Análisis estadístico.....	27
9. Resultados.....	28
9. Discusión.....	36
10. Conclusiones.....	39
11. Bibliografía.....	40



# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA

La evolución de la resistencia antimicrobiana ha llegado a convertirse en un problema mundial de salud.<sup>1</sup> Se estima que el 70% de las bacterias patógenas causantes de infecciones nosocomiales son resistentes a uno o más antibióticos llegando a ser difíciles de tratar.<sup>2</sup> Y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es el bacilo Gram negativo más frecuente encontrado en infecciones nosocomiales. El programa para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana “SENTRY”, describe que la mayor prevalencia mundial es para Latinoamérica y la región del Pacífico de Asia. En México se reporta a este patógeno como la segunda causa de infecciones nosocomiales.<sup>3</sup> Produce diversos cuadros clínicos, es responsable de neumonía nosocomial en un 16%, infección urinaria nosocomial en un 12%, infección relacionada a cirugía en un 8%, y bacteriemias en un 10%. Siendo los pacientes inmunocomprometidos como oncológicos, y trasplantados susceptibles a infecciones por este germen. En este grupo de pacientes *P. aeruginosa* es responsable de neumonía y sepsis con muerte atribuible en un 30%. Además *P. aeruginosa* es uno de los más comunes patógenos responsables de neumonía asociada a ventilador en pacientes intubados, con muerte atribuible en un 38%. En quemados se asocia con un 50% de muertes, y en SIDA, la bacteremia se asocia en un 50% de muertes.<sup>4</sup> En fibrosis quística los pacientes son característicamente susceptibles a infección crónica por *P. aeruginosa*, la cual es responsable de morbilidad y muerte.<sup>5</sup> La capacidad de *P. aeruginosa* para producir diferentes infecciones está relacionada a una diversidad de factores de virulencia.<sup>6</sup>

## 1.2 Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

### ***Taxonomía***

Dominio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Clase: Gamma Proteobacteria  
Orden: Pseudomonadales  
Familia: Pseudomonadaceae  
Género: *Pseudomonas*  
Especie: ***P. aeruginosa***

Etimológicamente, *Pseudomonas* significa falsa unidad, del griego *pseudo*, que significa falso, y *monas*, que significa unidad simple, el nombre fue usado inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes. *Aeruginosa* es el nombre latino para el “óxido de cobre”, esto describe el pigmento azul verdoso bacteriano, observado en los cultivos de laboratorio de esta bacteria.

*P. aeruginosa* es un bacilo aeróbico obligado, no fermentador, no productor de esporas, pero puede crecer anaeróbicamente en la presencia de nitratos o arginina. Debido a que puede utilizar diversas fuentes de carbono (carbohidratos simples y complejos, alcoholes, y aminoácidos) puede crecer y sobrevivir en casi cualquier ambiente con cantidades mínimas de compuestos orgánicos. Vive primariamente en agua, tierra, plantas, animales y sobre superficie de frutas y verduras, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Sin embargo, a pesar de sus abundantes oportunidades de extenderse, *P. aeruginosa* raramente causa infecciones adquiridas en la comunidad. Causa enfermedad más comúnmente en pacientes inmunocomprometidos como pacientes con quemaduras, fibrosis quística, cáncer, inmunodeficiencias, con terapia inmunosupresora, y malnutrición.

Dentro del género *Pseudomonas* se encuentra algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre, pero *P. aeruginosa* es la especie más importante clínicamente del género.<sup>7</sup>

### **1.3 Identificación de *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* es móvil, tiene un flagelo y numerosos pili o fimbrias, su tamaño varía de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  x 1.5 a 3  $\mu\text{m}$ , es oxidasa positivo, catalasa positivo. Crece óptimamente a 37 °C, pero no a 4 °C. En agar MacConkey, se identifican como no fermentadores de lactosa. No fermentan carbohidratos pero si monosacáridos como glucosa y xilosa. En agar sangre pueden producir beta-hemólisis. Más del 90% de *P. aeruginosa* produce pigmentos como piocianina (azul), fluoresceína (verde-amarillento fluorescente), y ocasionalmente produce piorrubina (rojo oscuro) o piomelanina (negro). King, Ward, y Raney desarrollaron "Agar Pseudomonas P" ("medio King A") para mejorar la

producción de piocianina y piorrubina; y " Agar Pseudomonas F" ("medio King B") para la fluoresceína. Estos pigmentos se observan en el agar, rodeando las colonias. La morfología colonial es muy variada aparecen esparcidas, con un brillo metálico, otras pequeñas, coliformes, frecuentemente producen una apariencia gelatinosa, denominada mucoide, particularmente en áreas de mayor crecimiento. *P. aeruginosa* es capaz de crecer en una gran variedad de medios, desde mínimos a complejos, y puede metabolizar diversas fuentes de carbono. Crece mejor en condiciones aeróbicas, pero también crece anaeróbicamente en la presencia de nitratos. Un medio selectivo comúnmente utilizado es el agar cetrimida el cual contiene un detergente que inhibe el crecimiento de muchos otros microorganismos. En las pruebas bioquímicas en agar triple azúcar y hierro, tiene una reacción alcalina, y en citrato de Simmons y L-arginina dehidrolasa da una reacción positivo. Da reacción negativa para L-lisina decarboxilasa y L-ornitina decarboxilasa y no produce ácido sulfhídrico.<sup>7</sup>

#### **1.4 Colonización**

*P. aeruginosa* puede colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes debido a que es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer. Es aislada raramente como biota normal en pacientes sanos. Siendo el tracto gastrointestinal el sitio más frecuente de colonización, del 5 al 30%, y el intestino el sitio más frecuente de localización transitoria después de la ingestión, se pueden obtener aislamientos de esta bacteria de entre el 2 y el 8% en las heces de personas sanas. Otros sitios que pueden ser colonizados son: orofaringe, mucosa nasal, axila, tracto respiratorio, peritoneo, y en pacientes con larga estancia hospitalaria, con tubo endotraqueal o traqueostomía, que tengan poco aclaramiento mucociliar, y que hayan recibido antibióticos de amplio espectro o quimioterapia. A pesar de su capacidad de colonizar piel y superficies mucosas, raramente coloniza de manera persistente, no produce factores tóxicos y no es capaz de invadir piel o mucosa normal.<sup>8</sup>

*P. aeruginosa* es patógeno en situaciones en las cuales las defensas inmunológicas del huésped están abatidas, por lo que se le denomina oportunista. Se considera que la bacteria entra al hospital a través de cualquier fomite (ropa, calzado, tracto respiratorio de pacientes o personal). En pacientes

inmunosuprimidos el consumo de alimentos con *Pseudomonas* puede resultar en colonización gastrointestinal y potencialmente enfermedad invasiva. Se ha descrito que conforme aumenta el tiempo de hospitalización, mayor riesgo de colonización por *Pseudomonas*.<sup>9-10</sup>

### **1.5 Patogénesis**

*P. aeruginosa* representa un problema importante de salud en centros hospitalarios. La patogénesis se describe como multifactorial. Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan daño tisular extenso y adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune.<sup>6</sup>

### **1.6 Factores de virulencia**

*P. aeruginosa* posee una gran variedad de factores de virulencia, incluyendo toxinas y numerosas enzimas extracelulares que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos (Tabla 1).<sup>6-7</sup>

Entre las toxinas que intervienen en la infección por *P. aeruginosa* encontramos a endotoxinas y exotoxinas. La endotoxina no es tan potente como otras producidas por bacilos Gram negativos, y puede ocasionar diarrea. Dentro de las enzimas extracelulares encontramos: lecitinasa, colagenasa, lipasa, elastasa (LasA y LasB), caseinasa, gelatinasa, fibrinolisisina, hemolisina, fosfolipasa C, exoenzima S y exotoxina A.<sup>6</sup>

Las enzimas proteolíticas pueden ser responsables de necrosis localizada de la piel o pulmón así como úlcera corneal. La exotoxina A inhibe la síntesis de proteínas, y disminuye la actividad de los macrófagos. La fosfolipasa C degrada fosfolípidos, abundantes en las membranas celulares. La hemólisis puede ser ocasionada por la labilidad de fosfolipasa C al calor. La exoenzima S, se produce en enfermedad invasiva en pacientes quemados.<sup>11</sup> Las proteasas pueden degradar proteínas plasmáticas como complemento y factores de coagulación. La solubilización y destrucción de lecitina (surfactante) está relacionada con la formación de atelectasias en infecciones pulmonares.<sup>7</sup>

Localización o clase	Factor de virulencia	Efecto
Superficie celular	Alginato	Antifagocítica Resistencia a la opsonización
	Lipopolisacáridos	Endotóxica Antifagocítica Evita anticuerpos preformados
	Pili	Formación de biopelícula, adherencia a tejido huésped
	Flagelo	Movilidad, Formación de biopelícula, adherencia a tejido huésped y componentes de mucina.
	Factores de secreción tipo III	Proteínas PcrG, PcrV, PcrH, PopB y PopD para efectores tipo III.
Fuera de la membrana	Receptores sideróforos	Provee hierro para crecimiento y desarrollo bacteriano
	Bombas de secreción	Remueve antibióticos
Secreción tipo III	ExoS, ExoT, ExoU, ExoY	Células intoxicadas (ExoS/ExoT), citotóxico (ExoU), ruptura de citoesqueleto de actina.
Proteasas	Proteasas LasA, elastasas LasB, proteasa alcalina, proteasa IV	Degrada efectores inmunológicos (anticuerpos, complemento), degrada proteínas de la matriz.
Adquisición de hierro	Pioverdina	Utilización del hierro del huésped para utilidad de la bacteria.
Toxinas secretadas	Exotoxina A, leucocidina, fosfolipasas, hemolisinas, ramnolípidos	Inhiben la síntesis de proteínas, destruye los leucocitos, hemólisis de eritrocitos, degrada glucolípidos de la superficie celular del huésped.
Factores oxidativos	Piocianina	Produce especies reactivas de oxígeno: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . La inflamación altera la función celular. Formación de biopelículas. Regulación de la secreción de factores de virulencia.

**Tabla 1. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*, localización y efecto determinado.** (Mandell, G. L. Bennett, J. E. y Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth Edition. Ed. Saunders, Philadelphia, Churchill Livingstone. Vol. 2. pp 2587-2615).

Las estructuras de las superficies como pili y fimbrias están involucradas en la adhesión a las células epiteliales de superficies mucosas, y se une preferentemente a mucina.<sup>7</sup> El glicocálix, capa extracelular, permite a las bacterias unirse y formar microcolonias, lo cual disminuye la fagocitosis y actividad antígeno anticuerpo. La patogenicidad de *P. aeruginosa* también depende de su habilidad para resistir la fagocitosis. En pacientes con fibrosis quística la opsonización está reducida debido al cambio molecular en la porción Fc de la IgG. Este déficit se magnifica con la infección por *P. aeruginosa*, debido a que las proteasas bacterianas pueden fragmentar IgG, y por lo tanto la opsonización.<sup>12-13</sup>

*P. aeruginosa* produce durante la infección dos elastasas: LasA y LasB, probablemente causan daño directo al tejido pulmonar e interfiere con el aclaramiento de las secreciones. *Berger y cols.* demostraron la degradación proteolítica de los receptores C3b, lo cual puede contribuir a la incapacidad de los pacientes con fibrosis quística para erradicar *P. aeruginosa*. Debido a que todas las células tienen receptores C3b como macrófagos, monocitos, linfocitos B y T, la actividad proteolítica disminuye la fagocitosis.<sup>14</sup>

El lipopolisacárido (LPS) es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, el cual permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos.<sup>15</sup> La permeabilidad de la membrana externa depende principalmente de las porinas que son proteínas formadoras de poros con una baja especificidad, y de los sistemas de transporte específicos. La baja permeabilidad de las porinas de la membrana externa de *P. aeruginosa* tiene un papel importante en el alto nivel de resistencia natural a los antibióticos de esta bacteria.<sup>6</sup> El lipopolisacárido presenta dos componentes distintos: la banda A y la banda B. La banda A es un polímero de D-ramnosa que producen la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, mientras que la banda B tiene una estructura variable y determina el serotipo de las cepas. Cuando *P. aeruginosa* se adhiere a una superficie, las células se diferencian para formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que llegan a constituir una película.<sup>16</sup>

Los transportadores o las bombas de expulsión están involucrados en la resistencia a antibióticos. En su mayoría se agrupan en dos familias, según su estructura, una de ellas está formada por los sistemas llamados bombas de expulsión activo, y la otra se denomina MFS, por sus siglas en inglés (major facilitator superfamily). Los sistemas bombas de expulsión activo están formados por tres proteínas: un intercambiador droga-protón, presente en la membrana interna, una proteína de membrana externa que parece formar un canal y una proteína periplásmica que une a las dos proteínas membranales. El sistema de bombas de expulsión activo que más contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* es el sistema AcrAB/MexAB que es capaz de transportar una amplia variedad de antibióticos como: quinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprima y  $\beta$ -lactámicos, así como solventes orgánicos, y el autoinductor sintetizado por la enzima LasI.<sup>17</sup>

El alginato es un exopolisacárido, compuesto por ácido D-manurónico y ácido L-glucorónido. La producción de alginato es regulada e inducible. Se ha determinado que la causa más frecuente de la conversión de las cepas de *P. aeruginosa* a mucoide en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística es la mutación en el gene que codifica para la proteína MucA, que es un factor anti-sigma. Una vez que se establece una infección pulmonar por cepas mucoides de *P. aeruginosa*, los pacientes se consideran están en la etapa terminal de la enfermedad, lo cual se debe a que estas cepas no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y, hasta el momento, no existe un tratamiento efectivo contra las cepas mucoides.<sup>18-19</sup>

### **1.7 Importancia de la biopelícula en la producción de infección**

Las biopelículas son ubicuas en la naturaleza y están asociadas con numerosas infecciones bacterianas crónicas o recurrentes.<sup>20</sup>

*P. aeruginosa* es una de las principales etiologías de infección relacionada con mortalidad en los enfermos críticos. Las infecciones que involucran producción de biopelícula son neumonía en fibrosis quística, neumonía en pacientes en unidad de cuidados intensivos, sepsis por colonización de catéter venoso central, infección relacionada a implantes ortopédicos, e infecciones de lentes de contacto.<sup>21</sup>

En pacientes con fibrosis quística, *P. aeruginosa* coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio, y a medida que progresa la infección se seleccionan cepas mucoides que producen grandes cantidades del alginato que desempeña actividad antifagocítica, además de producir una respuesta inflamatoria en los pacientes lo que contribuye a que el daño sea crónico. La consistencia viscosa contribuye a que las secreciones sean espesas, lo cual obstruye las pequeñas vías aéreas, produce alteración en el aclaramiento y alteración en el movimiento de los macrófagos.<sup>22</sup>

### **1.7.1 Estructura de la biopelícula**

La biopelícula es una población de bacterias que crecen adheridas a una superficie, se encuentran envueltas en una matriz de exopolisacáridos lo cual las protege de diversas sustancias como tóxicos y antibióticos.<sup>21</sup>

La estructura de la biopelícula es compleja e involucra tres componentes: la masa de bacterias la cual puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies, los espacios intercelulares o canales, y la matriz extracelular que lo rodea compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias.<sup>22</sup>

La cercanía entre las bacterias facilita la transferencia horizontal de genes, plásmidos o fagos, lo cual es importante para favorecer la diversidad genética de las comunidades microbianas naturales. A través de los canales, se intercambia oxígeno y otros sustratos con la fase acuosa, recientemente se reportó que los ramnolípidos tienen un papel importante en la formación de estos canales.<sup>21</sup>

La matriz extracelular está constituida en parte por alginato, pero éste no constituye el material más abundante. Los exopolisacáridos tienen diversas funciones actúan como un mecanismo de concentración de nutrientes, previene el acceso de ciertos agentes antimicrobianos o restringen la difusión de los componentes al interior de la biopelícula, contienen metales, aniones, cationes y toxinas que pueden ser la clave para la transferencia de estos al interior, y actúan como protectores de condiciones de stress ambiental como rayos ultravioleta, cambios de pH, shock osmótico y desecación.<sup>23</sup>

Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las planctónicas, uno de las diferencias más aparentes es su sensibilidad

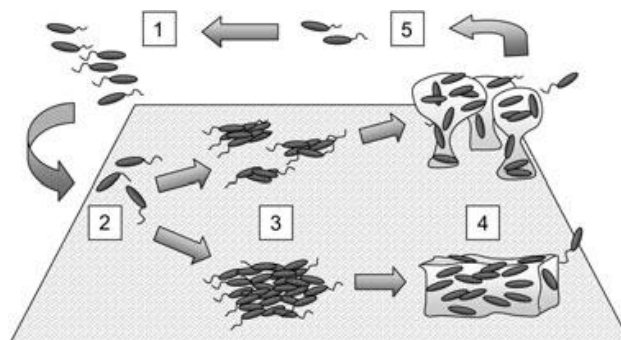


disminuida a los antibióticos y a otros agentes tóxicos, incluyendo algunos elementos de la respuesta inmune.<sup>23</sup>

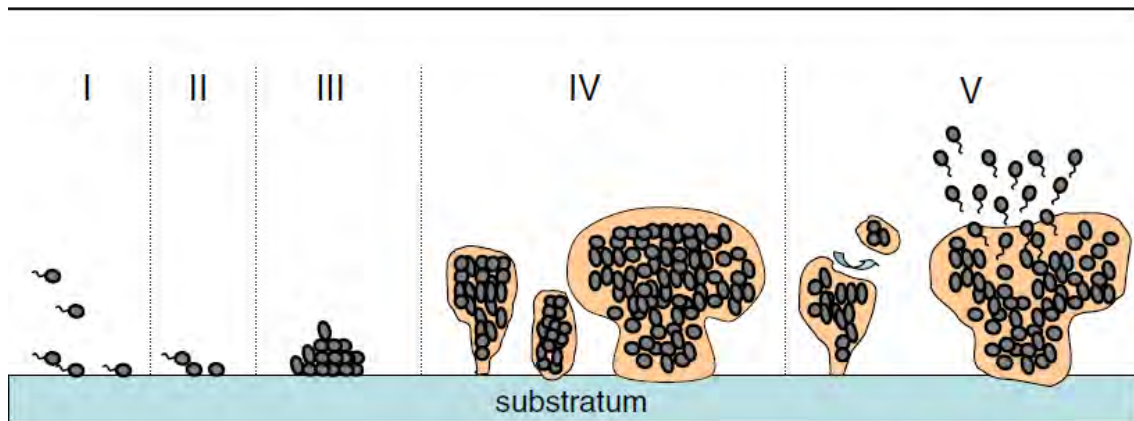
### Proceso de formación de la biopelícula

La biopelícula se forma cuando la bacteria detecta ciertas condiciones ambientales; disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes y de hierro, cambios en la osmolaridad, pH, tensión de oxígeno y temperatura, que dispara la transición de la forma planctónica a un crecimiento sobre una superficie. Las bacterias pueden colonizar una amplia variedad de superficies en ambientes abióticos como bióticos, su habilidad para persistir en la biosfera obedece en parte a su versatilidad metabólica y su plasticidad genotípica. Un factor importante es su capacidad para posicionarse en donde pueda propagarse. De los numerosos mecanismos de posicionamiento que han sido descritos en las bacterias el más comúnmente observado es el movimiento flagelar y los diferentes métodos de traslocación superficial incluyendo contracción, deslizamiento y precipitación. La unión a la superficie es acompañada por la formación de microcolonias, y finalmente se da la maduración de éstas dentro de una cápsula de exopolisacárido. Esta población de bacterias funcionan de un modo complejo y coordinado, en la cual, cada una actúa como parte integral de una comunidad. (Fig. 1 y 2).<sup>21-23</sup>

1. Adherencia a la superficie de manera reversible.
2. Adherencia con otras células de manera irreversible.
3. Formación de microcolonias.
4. Complejo de estructura tridimensional.
5. Dispersión y maduración dentro de una capa de exopolisacáridos.



**Fig. 1. Producción de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*.** (*Quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms Environmental Microbiology (2009) 11(2), 279–288).



**Fig. 2. Producción de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*.** (*P. aeruginosa* biofilms in CF infection Clinica Rev Allerg Immunol (2008) 35:124–134).

### 1.7.3 Regulación de la formación biopelícula

Los tamizajes genéticos revelaron que la interacción inicial con la superficie es acelerada por los organelos como pili tipo IV y los flagelos, los cuales son utilizados por la bacteria para moverse a lo largo de la superficie en dos dimensiones hasta encontrar otras bacterias formando microcolonias, sobre las cuales se desarrolla el crecimiento.

Existe evidencia que los genes transcritos en la fase planctónica son diferentes a los transcritos en la biopelícula, de acuerdo a la característica fenotípica requerida, una vez que se transcribe el gen *alg*, el cual es responsable de la producción de alginato, un exopolisacárido que inicia la estructura de la biopelícula, la síntesis del flagelo es reprimida debido a que su presencia podría desestabilizar dicha estructura.<sup>24</sup>

### 1.7.4 El papel de la biopelícula en el proceso de infección y la respuesta inmune

La importancia de la biopelícula radica en la producción y degradación de materia orgánica, la degradación de contaminantes ambientales y la infección. Después de la adherencia de las bacterias, la interacción específica entre con diversos componentes tisulares y séricos del huésped, como el tejido conectivo, el colágeno, las proteínas séricas como la fibronectina, permitiendo la colonización tisular y el establecimiento de infecciones de heridas. La colonización puede permitir que la bacteria invada las superficies mucosas alterando el flujo de calcio en las células epiteliales: liberando toxinas,

proteasas y otros exoproductos. Esta infección es raramente resuelta por el sistema inmune del huésped.

La biopelícula libera antígenos, y estimula la producción de anticuerpos, inhibe la proliferación de linfocitos T y los monocitos periféricos por inducción de prostaglandina E2, e interfiere sobre la producción de las células B y la coagulación. También parece afectar la opsonización y la fagocitosis al inhibir la quimiotaxis, induce la degradación e inhibe las actividades metabólicas dependientes de oxígeno de los leucocitos PMN, conduciendo a la muerte intracelular.<sup>21-22</sup>

#### **1.7.5 El papel de la biopelícula en el proceso de infección y la resistencia a antibióticos**

La infección por bacterias productoras de biopelícula es difícil de erradicar debido a su resistencia por diferentes mecanismos como la inactivación de antibióticos por polímeros extracelulares o modificaciones enzimáticas, la baja disponibilidad de nutrientes lo que contribuye a una baja tasa de crecimiento, los cambios fenotípicos que adquiere la población bacteriana dentro de la biopelícula y la persistencia bacteriana; solos o en combinación estos factores usados para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades.<sup>25</sup>

La biopelícula contiene en su interior una gran cantidad de agua y solutos del tamaño de los antibióticos, por lo cual estos podrían difundirse fácilmente dentro de la matriz. Sin embargo, la movilidad física de los antibióticos en la biopelícula no asegura que el antibiótico penetre dentro de este. La penetración es restringida debido a que la matriz de exopolisacárido limita la difusión de sustancias y la unión del antimicrobiano proporcionando una efectiva resistencia a las células en su interior. Además la carga negativa de los exopolisacáridos es muy efectiva en la protección celular contra antibióticos cargados positivamente como los aminoglucósidos, por restricción de la permeabilidad durante toda la unión. En las biopelículas producidas por *Pseudomonas*, se ha podido demostrar un sinergismo entre la difusión retardada del antibiótico y la degradación de este en el interior. La matriz del exopolisacárido puede actuar como una barrera retardando la difusión del

antimicrobiano lo que disminuye la concentración del antibiótico que ingresa a la biopelícula, para que en su interior enzimas como betalactamasas lo destruyan, logrando así una resistencia efectiva. Dicho sinergismo es análogo al existente entre el interior de la membrana y la resistencia a fármacos por las bombas de expulsión que transportan antimicrobianos a través de la barrera permeable. Otro factor es la disminución de la tasa de crecimiento, todos los antibióticos son efectivos en la fase de crecimiento rápido de las bacterias, algunos pueden actuar en fase estacionaria, siendo más efectivos en la fase logarítmica. La población de bacterias es heterogénea con respecto a la fase de crecimiento, desde la fase logarítmica a la estacionaria. Las zonas de no crecimiento están bien establecidas y contribuyen a la supervivencia después del ataque antibiótico. Otro mecanismo por el cual la disminución del crecimiento contribuye a la resistencia es el gradiente químico que se establece dentro. Por lo tanto el pH puede actuar negativamente contra la eficiencia de los antibióticos. Así mismo, las bacterias en respuesta y acoplamiento a fluctuaciones ambientales como cambios de temperatura oxidación, baja disponibilidad de oxígeno y daños al DNA expresan genes, los cuales se transfieren entre ellas por donación mediante la conjugación.<sup>25-26</sup>

### **1.8 Mecanismos de resistencia**

*P. aeruginosa* es resistente a la mayoría de los antibióticos debido a la presencia de la membrana externa compuesta de lipopolisacáridos, a la acción de las bombas de flujo con regulación genética cromosómica y a su habilidad de producir de biopelículas. Posee resistencia intrínseca, y puede adquirir resistencia extrínseca a través de genes de resistencia de manera horizontal. Se han descrito tres tipos de resistencia: intrínseca, adquirida y genética. La resistencia intrínseca comprende aquellos mecanismos de algunas especies independientemente de la exposición a fármacos. La resistencia adquirida involucra la inducción de resistencia inestable, sin cambio en el genotipo debido a la exposición de la cepa a condiciones de inducción que puede incluir la exposición a antibióticos. Dicha resistencia puede ser reversible. La resistencia genética involucra la adquisición de nueva información genética a través de una mutación de un gene existente o de un mecanismo de control, o por plásmidos.<sup>25-26</sup>

### 1.8.1 Resistencia intrínseca

La membrana externa constituye una barrera semipermeable a la introducción de antibióticos y a los sustratos. Debido a que la introducción de pequeñas moléculas hidrofílicas como  $\beta$ -lactámicos está disminuído debido a los canales de porinas. La membrana externa limita el movimiento de las moléculas dentro de la célula. La principal porina es la OprF, sin embargo es una limitante para la introducción de antibióticos tanto por su heterogeneidad en la formación del canal o por su arquitectura irregular. Un 25-35% de la permeabilidad de la membrana externa es debido a otras porinas no específicas. Los estudios de sobreexpresión con OprD la han eliminado, permitiendo el paso de otros antibióticos por cambio iónico de carbapenémicos  $\beta$ -lactámicos como meropenem e imipenem.

Otra porina importante es la OprB, la cual es mediada por permeabilidad no específica de monosacáridos y disacáridos. Alternativamente el ingreso de los antibióticos puede ocurrir por la doble capa por una ruta no polínica. Otras proteínas involucradas son OprC, OprE y OprD.

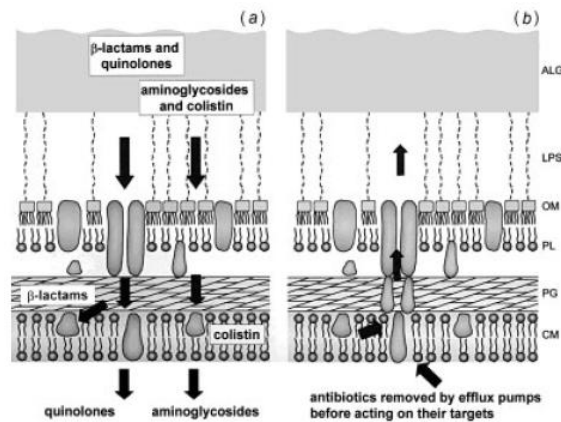
El ingreso de antibióticos policationicos como gentamicina, tobramicina, y colistina mediado por un sistema denominado ingreso auto promovido. Este sistema involucra la interacción del polication con el catión divalente en los sitios de unión sobre la superficie de lipopolisacáridos (LPS). Debido a que los policationes son más grandes que los cationes divalentes, causan una alteración en la permeabilidad de la membrana.<sup>25-26</sup>

#### A. Bombas de salida

*Poole, et al*, han demostrado, que el sistema de flujo de salida involucra tres proteínas MexA, MexB y OprM, lo cual es determinante para la resistencia intrínseca, la mutación en cualquiera de estas proteínas, provoca incremento en la susceptibilidad a quinolonas,  $\beta$ -lactámicos (excepto imipenem), tetraciclinas y cloranfenicol. Los sustratos de este sistema son alifáticos con carga positiva o negativa, en contraste con los  $\beta$ -lactámicos que tienen carga negativa y generalmente hidrofílicos, por lo que son sacados.

Las bombas de secreción comprenden tres componentes: una bomba de energía en la membrana citoplasmática, una porina en la membrana externa y un adaptador proteico que une los dos componentes membranales. Los

antibióticos que penetran a la célula son concentrados en el citoplasma, y son secretados a través de las porinas cruzando la membrana citoplasmática. <sup>25-26</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática del arreglo de los componentes de la pared celular de *P. aeruginosa*. CM membrana citoplasmática, OM membrana externa, PG peptidoglicano. LPS lipopolisacárido, ALG alginato. a) Sitio de acción de los antibióticos. b) Mecanismo de secreción de antibióticos por bombas de secreción, antes de actuar en su sitio blanco. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med 2002; 95 (Supl. 41) 22-26

## B) Enzimas

*P. aeruginosa* tiene enzimas como  $\beta$ -lactamasas entre ellas cefalosporinasas, codificadas cromosómicamente. Dicha enzima ha sido clonada y secuenciada, y se ha demostrado que es de clase C AmpC-type B-lactamasa, la cual es inducida por niveles subinhibitorios de  $\beta$ -lactámicos, especialmente por imipenem. Otras enzimas codificadas cromosómicamente son kanamicina fosfotransferasas. <sup>25-26</sup>

### 1.8.2 Resistencia adquirida

Es importante mencionar que se ha descrito un fenómeno llamado persistencia, en el cual se ha observado la reversión de la bacteria a la multisusceptibilidad *in vitro*, más no *in vivo*, dicho fenómeno es difícil de estudiar. <sup>25</sup>

### 1.8.3 Resistencia genética

#### A) $\beta$ -lactámicos

La resistencia a  $\beta$ -lactámicos es mediada por la desregulación de  $\beta$ -lactamasa cromosómica. Lo cual resulta en resistencia a los  $\beta$ -lactámicos susceptibles y aún a los  $\beta$ -lactámicos resistentes a  $\beta$ -lactamasas, con la excepción del

carbapenem zwitteriónico como imipenem, debido a que los carbapenémicos inducen betalactamasas a 0.5/MIC.<sup>25</sup>

Existe una sinergia entre la baja permeabilidad de la membrana externa y los mecanismos de resistencia secundarios como los altos niveles de  $\beta$ -lactamasas. Por lo tanto las cefalosporinas como ceftazidima, que es poco hidrolizada por las  $\beta$ -lactamasas clase C, pueden incrementar los niveles de MIC de >32 produciendo desregulación de la mutación de actividad de  $\beta$ -lactamasas. Las cefalosporinas de 4ta generación son más eficientes bajo algunas circunstancias como: la mayor permeabilidad de la membrana externa y la baja afinidad para  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo *P. aeruginosa* puede mutar, produciendo mayor MIC de dichos antibióticos debido al incremento de  $\beta$ -lactamasas, resultando en MICs sobre el rango clínico.<sup>26</sup>

Otros mecanismos descritos incluyen la pérdida de la porina principal OprF, su mutación ha incrementado la resistencia. Estudios experimentales han demostrado que la alteración en las proteínas fijadoras a penicilinas 3, puede resultar en un incremento en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos.

Se han descrito, al menos 13 plásmidos que codifican  $\beta$ -lactamasas, las cuales incluyen TEM-1, LCR-1, NPS-1, OXA-1, OXA-2, OXA-3, OXA-5, OXA-6, CARB-4, PSE-1 (el más común de *P. aeruginosa*), PSE-2, PSE-3 Y PSE-4. Así como el plásmido que codifica para carbapenemasa.

Para el imipenem y meropenem, el principal mecanismo de resistencia es la pérdida de la porina específica OprD, que ocurre en el 50% de las infecciones de *P. aeruginosa* tratadas por más de una semana con imipenem. Los ensayos con sobreexpresión de OprD han mostrado que es muy específico para carbapenémicos y no media el paso de  $\beta$ -lactámicos ni quinolonas. Además la resistencia cruzada a imipenem y quinolonas coincide con la reducción de los niveles de OprD, lo cual es probable debido a la mutación, *nfxC* que simultáneamente influye sobre un sistema de secreción.<sup>25-26</sup>

## **B) Aminoglucósidos**

Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos. La resistencia de los aislamientos clínicos oscila entre 5-12%. Los mecanismos de resistencia se han dividido en dos grupos:

1. Adquisición de plásmidos que preceden a la producción de enzimas que modifican los aminoglucósidos por acetilación, adenilación, o fosforilación. Lo cual precede a niveles de resistencia incrementados, dicho cambio provoca disminución de su entrada o interacción ribosómica reducida. Además la bacteria tiene un gene resistente a aminoglucósidos, *aphA*, sin embargo la enzima producida modifica únicamente a kanamicina que no es antipseudomónico.
2. Otro mecanismo de resistencia, es la disminución de la entrada del antibiótico *per sé*, por alteración en la entrada a través de las membranas, lo que resulta en niveles de resistencia disminuídos a todos los aminoglucósidos.<sup>25</sup>

### C) Quinolonas

Se han descrito dos mecanismos. Uno derivado de la mutación de la DNA girasa y las alteraciones en la mutación de secreción. Cuando la *P. aeruginosa* es expuesta a niveles elevados de ciprofloxacino, las mutaciones que causan un cambio en el MIC de menos de 16 veces influyen en la susceptibilidad de las quinolonas y son probablemente mutaciones en la girasa. Cuando los MICs incrementan más de 16 veces, se observa multirresistencia debido a la disminución de la permeabilidad y/o incremento del flujo. Las mutaciones de la DNA girasa ocurren principalmente en la subunidad *gyrA* afectando al aminoácido 83 u 87.<sup>25-26</sup>

### 1.9 Regulación génica

*P. aeruginosa* es una de las bacterias más estudiadas a nivel molecular y en agosto del año 2000 se concluyó la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1.<sup>27</sup>

*P. aeruginosa* tiene aproximadamente 5500 genes, de los cuales codifican diversos factores de virulencia localizados en la superficie celular o liberados al ambiente. La expresión de muchos factores de virulencia extracelulares es controlada por *quórum sensing* a través de señales difusibles producidas por la población bacteriana en respuesta a la densidad celular.<sup>28-29</sup>

Los plásmidos que se presentan en *P. aeruginosa* codifican para resistencias a



antibióticos o a metales, y su extensa distribución representa un problema clínico.<sup>25</sup>

### 1.10 Sistema *quórum sensing*

*P. aeruginosa*, cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten modificar la expresión de distintos genes en respuesta a cambios en el medio ambiente.<sup>30</sup>

*Quórum sensing* es un sistema de comunicación entre bacterias, que promueve el cambio en la expresión genética en función de la densidad celular. Este sistema regulatorio detecta cuando se ha llegado a una masa crítica de bacterias por lo que se le ha denominado *quórum sensing*.<sup>31</sup>

El mecanismo se basa en el incremento de la población bacteriana, alcanzando una gran densidad celular, entonces cada célula produce de manera constante un compuesto de bajo peso molecular, llamado autoinductor. Cuando el número de células llega a cierto umbral, y la concentración del autoinductor es suficientemente alta, este compuesto difunde entre las células bacterianas e interacciona sobre un activador transcripcional, para influenciar la transcripción génica y la producción de factores de virulencia.<sup>32-33</sup>

Los sistemas *quórum sensing* descritos para *P. aeruginosa* son: las, rhl y Pseudomonas quinolone System (PQS). Y sus autoinductores son acyl-homoserina lactona (N-3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona (C12-HSL), N-butyryl-L-homoserina lactona (C4-HSL) y 2-heptyl-3-hidroxy-4-quinolona respectivamente. Y se codifican en los genes *lasI* y *rhII*.<sup>34-36</sup>

El autoinductor con el que interacciona *RhlR* es el *N*-(butanoil)-homoserina lactona, o C4-HSL que es producido por la autoinductor sintetasa *RhII*. La proteína *RhlR* unida a C4-HSL promueve la transcripción de los genes (*rhlAB* y *rhlC*) que codifican para las enzimas ramnosiltransferasa 1 y ramnosiltransferasa 2 que participan en la producción del biosurfactante ramnolípido.<sup>35</sup>

Se ha demostrado que el sistema Las *quórum sensing* tiene un papel central en la formación de biopelículas, ya que mutantes en el gene *lasI* no producen estas estructuras, salvo en el caso en el que se adiciona el autoinductor 3-o-

C12-HSL. Asimismo se reportó que la movilidad de *P. aeruginosa* tiene un papel muy importante en la producción de biopelículas, ya que las células deben ser móviles y dejar de moverse al establecerse la biopelícula.<sup>37</sup>

Se calcula que aproximadamente el 6% del genoma de esta bacteria se regula por este sistema. Asimismo, se encontró que la expresión genética se ve afectada, principalmente al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, pero no exclusivamente en esta etapa, sino que puede ocurrir a todo lo largo de la curva de crecimiento. También se hizo patente que las condiciones ambientales modulan de una manera muy importante a este sistema, de modo que apenas empezamos a entender la gran complejidad de este regulón y la importancia que tiene en la virulencia y en la adaptación de *P. aeruginosa* a su ambiente.<sup>37-38</sup>

## 2. ANTECEDENTES

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos más importantes en infecciones nosocomiales, representa la 2da causa. Su habilidad para desarrollar resistencia a antibióticos por diversos mecanismos así como la expresión de diversos factores de virulencia contribuye a la falla de tratamiento actualmente utilizado. Entre los principales factores de virulencia que determinan el impacto de las infecciones son la producción de biopelícula, bombas de secreción tipo III y el flagelo.<sup>39</sup>

El Instituto Nacional de Salud de EUA publicó recientemente que más del 60% de todas las infecciones bacterianas está involucrado la producción de biopelícula, de igual manera se les atribuye el 60% de infecciones nosocomiales, incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la mortalidad debido a su gran resistencia a los antimicrobianos mil veces mayor que la de las células que viven en forma planctónica y además se relaciona con infecciones persistentes.<sup>40</sup>

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos relacionado con la producción de biopelícula involucra diversos mecanismos como: disminución de la tasa de crecimiento por limitación de nutrientes, cambios fenotípicos en las células bacterianas como la adquisición de genes de resistencia de genes de la biopelícula y la persistencia de un pequeño grupo de bacterias.<sup>41</sup>

El más reciente factor considerado es la persistencia y la tolerancia, las bacterias de la biopelícula no sólo evaden el ataque de los antibióticos, también resisten a los desinfectantes. Las células persistentes pueden constituir una pequeña fracción de la población total, pero estas pocas células son altamente protectoras. Los datos que soportan la persistencia de la biopelícula incluyen las siguientes hipótesis: la dimensión bifásica de la biopelícula, los genes que contribuyen a la persistencia y los antibióticos bacteriostáticos que inhiben el crecimiento paradójicamente contribuyen a la persistencia y al preservación de la biopelícula, la persistencia depende de la dosis del antibiótico y del tiempo de duración del ataque. Cuando la terapia culmina, las células persistentes restablecen la biopelícula y por lo tanto la infección.<sup>21</sup>

La formación de biopelícula representa un problema de salud pues contamina dispositivos comúnmente implantados en la unidad de terapia de cuidados intensivos. Y hasta el momento no se tiene tratamiento antibiótico específico contra la biopelícula.<sup>41</sup>

Por otro lado, la emergencia de cepas de *P. aeruginosa* panresistentes ha sido reportada en la literatura.<sup>42</sup> En el Hospital Infantil de México se han identificado cepas panresistentes en los últimos 3 años. Ya referidas previamente en la tesis de Aguilar y cols. 2009, en donde se describe la existencia de las cepas panresistentes en el Hospital.

Una revisión sistemática de la literatura sugiere que la exposición previo de antibióticos es el principal factor de riesgo para adquisición de *P. aeruginosa* multirresistente.<sup>43</sup>

La única terapia específica conocida se basa en la incorporación de antibióticos en los materiales del catéter. Se han propuesto dos métodos físicos para la erradicación de la biopelícula *in vitro*: el uso de campo electromagnético y el uso del ultrasonido, aunados al uso de antibióticos parece ser un promisorio método para el tratamiento de la biopelícula.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha habido un incremento en las infecciones nosocomiales, y *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales causas de infecciones graves particularmente en pacientes inmunosuprimidos, quemados, y con fibrosis quística. En muchas de estas infecciones, la resistencia a los fármacos es uno de los obstáculos principales para su control, con la emergencia de cepas panresistentes a los antibióticos habitualmente utilizados. En el HIMFG a partir de Abril de 2007 hasta la fecha, se han aislado cepas panresistentes,

Conocer la Epidemiología del Hospital, el comportamiento de los pacientes con aislamientos de *P. aeruginosa* panresistente, el curso clínico, caracterización de la producción de biopelícula y permitirá un mejor entendimiento, de los factores de riesgo asociados en población susceptible, así como la implementación de medidas que conduzcan a su prevención y puede ser punto de partida para la generación de medicamentos para su tratamiento.

Por lo que en el presente estudio pretende hacer una relación con el curso clínico de los pacientes infectados con *Pseudomonas aeruginosa* panresistente, y sensible y la producción de la biopelícula.

### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*P. aeruginosa* es la 2da causa de infección nosocomial, pese a que existen antimicrobianos útiles, la panresistencia a fármacos es un problema emergente mundial. Las infecciones graves constituyen un problema latente en nuestro hospital. *P. aeruginosa* cuenta con diversos factores de virulencia, siendo uno de los principales la producción de biopelícula. Sin embargo, no se ha relacionado la producción de biopelícula de *P. aeruginosa* con la susceptibilidad antimicrobiana, y su repercusión con la evolución clínica. No existen estudios sobre cepas panresistentes y producción de biopelícula.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general:

Analizar las características clínicas del paciente infectado con *P. aeruginosa* panrrresistente y sensible productora de biopelícula.

### Objetivos particulares:

- Analizar las características clínicas de los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* panrrresistentes, en comparación con los pacientes con *P. aeruginosa* sensible productora de biopelícula.
- Identificar y clasificar a las cepas *P. aeruginosa* panrrresistentes y sensibles de acuerdo a la producción de biopelícula.
- Relacionar la producción de biopelícula y susceptibilidad de las cepas *P. aeruginosa* con la evolución del paciente.
- Analizar factores asociados a la adquisición de *P. aeruginosa* panrrresistente.

## 6. DISEÑO DEL ESTUDIO

**Diseño del estudio:** descriptivo, retrospectivo, de una serie de casos.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### **Población de estudio:**

Pacientes de 1 mes a 18 años, con aislamientos de *P. aeruginosa* panresistentes y sensibles del HIMFG de Abril 2007-Julio 2009.

### **Lugar donde se realizó el estudio:**

Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

### **Criterios de inclusión:**

**Casos:** Pacientes que cursaron con algún proceso infeccioso con aislamiento de *P. aeruginosa* panresistentes productoras de biopelícula de 2007 a 2009.

**Controles:** Pacientes que cursaron con algún proceso infeccioso con aislamiento de *P. aeruginosa* sensibles productoras de biopelícula de 2007 a 2009.

### **Criterios de exclusión:**

Pacientes que no hayan tenido algún proceso infeccioso relacionado con el aislamiento de *P. aeruginosa*.

Pacientes que no sea posible conseguir la información de archivo clínico

### **Criterios de eliminación:**

Pacientes en los cuales el aislamiento de *P. aeruginosa* esté contaminado, no se pueda recuperar o no se disponga en el cepario.

### **El estudio se dividió en tres fases:**

1. Fase Clínica
2. Fase Microbiológica
3. Fase de Análisis

### **Descripción general del estudio.**

#### **REVISIÓN DE EXPEDIENTES CLÍNICOS:**

Se realizó un formato para identificar las variables demográficas, enfermedad de base y factores de riesgo, así como los datos estancia hospitalaria, cambios

terapéuticos y muertes. Se realizó el seguimiento clínico durante su internamiento y la respuesta al tratamiento.

#### OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *P. aeruginosa* Y VALIDACIÓN.

Se buscaron las cepas de *P. aeruginosa* con perfil de panresistencia mediante la revisión de las bitácoras del laboratorio Central del Hospital Infantil de México, y también cepas con perfil de resistencia sensibles como control. Dichas cepas fueron identificadas empleando el sistema automatizado Vitek 2 según los lineamientos de Institute of Standard Clinical and Laboratory (CLSI). Las cepas se envían por protocolo al laboratorio de Bacteriología Intestinal y se conservan a -70 °C. Previo a los ensayos se validan las cepas mediante pruebas bioquímicas convencionales. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: catalasa (+) y oxidasa (+), producción de pigmentos (piocianina y pioverdina) en gelosa Mueller-Hinton, producción de  $\beta$ -hemólisis en gelosa sangre, no fermentación de lactosa en gelosa MacConkey, utilización de citrato como única fuente de carbono, no fermentación de azúcares en medio agar de triple azúcar y Hierro (TSI) y crecimiento a 42 °C en caldo nutritivo.

Las cepas fueron conservadas a corto plazo a 4° C en tubos tipo eppendorff que contenían gelosa especial semisólida (GESS) sellados con parafina. Para la conservación a largo plazo las cepas fueron cosechadas y conservadas en crioviales con base de leche descremada a -70°C.

#### PRODUCCION Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULA.

Los experimentos se realizaron por triplicado. Y se utilizó como control la cepa de referencia de *P. aeruginosa* de ATCC 27853.

#### PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

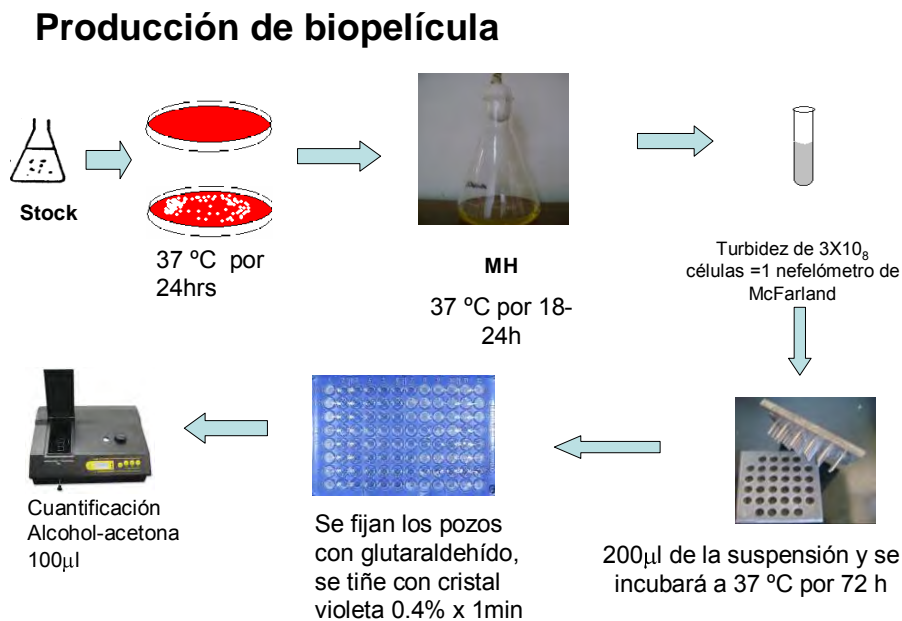
La cepa congelada en leche a -70 °C, se recupera en gelosa sangre incubado a 37 °C durante 24hrs; se observa la pureza de la cepa y en caso de encontrarse dos morfotipos se separan, resembrando cada una de ellas en agar MH y posterior a las 24hrs se realiza a ambas la prueba de biopelícula, la cual consiste en sembrar una colonia aislada en caldo TSA con una incubación de 18-24 hrs en agitación a 37 °C, posteriormente del



desarrollo logrado se tomaran unas gotas y se sembrará en un tubo que contenga de 5 a 10 ml de caldo TSA, este último también se incuba en agitación a una turbidez de  $3 \times 10^8$  células que corresponde al estándar 1 del nefelómetro de McFarland. Partiendo de esta concentración se procede a colocarla en una placa de 96 pozos con 200  $\mu$ l de la suspensión y se incuba a 37 °C por 72 h, revisando cada 24 hrs. Transcurrido el tiempo se descarta el sobrenadante y se fijan los pozos con unas gotas de glutaraldehído, se deja secar al aire y se tiñe con cristal violeta al 0.4% durante 1 min. Posteriormente se decanta el sobrenadante y se hacen lavados con agua empleando una pipeta, se deja secar al aire y se observa al microscopio la biopelícula.

### CUANTIFICACIÓN DE BIOPELICULA

A los pozos teñidos y lavados se les adiciona alcohol-acetona de 100 en 100  $\mu$ l hasta eluir todo el cristal violeta. Se lee contra un blanco de reactivos a 570 nm. Aquellas lecturas obtenidas mayores a 0.7 de absorbancia se reportarán con alta producción de biopelícula y absorbancias menores a 0.3 se reportará como baja producción de biopelícula.



**Esquema 1.** Metodología de producción y cuantificación de biopelícula.

## DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

**Infección documentada microbiológicamente:** se corrobora la presencia de un agente infeccioso ya sea por cultivo, tinción de Gram o detección de antígenos por coagulación o reacción en cadena de la polimerasa.

**Infección sospechada clínicamente:** incluye hallazgos positivos a la exploración física o en los exámenes de laboratorio.

**Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica:** la presencia de al menos dos de los siguientes criterios. Uno de los cuales debe ser anormal temperatura o leucocitos:

- **Temperatura** mayor de 38.5 °C o menor de 36 °C
- **Taquicardia** definida como >2 desviaciones estándar por arriba de las cifras de frecuencia cardíaca normales para la edad, en ausencia de estímulos externos, uso crónico de drogas, estímulo doloroso, o elevación persistente en 0.5 a 4 horas en niños de riesgo como menores de un año. O bradicardia definida por frecuencia cardíaca por abajo del percentil 10 para su edad en ausencia de estímulo vagal, uso de betabloqueadores, cardiopatía congénita, o depresión persistente en un período de 5 h.
- **Frecuencia respiratoria** >2 desviaciones estándar para su edad, o ventilación mecánica indicada por infección aguda y no por patología neuromuscular o anestesia general.
- **Cuenta de leucocitos** aumentada o disminuída (no asociada a quimioterapia) o >10% de neutrófilos inmaduros (bandas).

**Sepsis:** SRIS con presencia o como resultado de infección probable o comprobada.

**Choque séptico:** sepsis y disfunción cardiovascular.

### **Susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los antibióticos**

Sensible cepas de *P. aeruginosa* sensible a los antibióticos comúnmente utilizados.

**Resistente:** microorganismos que muestra resistencia *in vitro* al menos uno de los antibióticos antipseudomónicos (piperacilina, ciprofloxacino, ceftazidima, o imipenem).

**Multirresistente:** microorganismo que muestra resistencia al menos a tres familias de antibióticos.

**Panresistencia:** microorganismo que muestra resistencia a todos los antibióticos disponibles antipseudomónicos excepto polimixina B.

### **Producción de biopelícula de *P. aeruginosa***

**Alta** de 90-200

**Media** de 89-30

**Baja** de 29 a 1.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizaron medidas de tendencia central: frecuencias simples, media, porcentaje y mediana para cada variable, y desviación estándar.

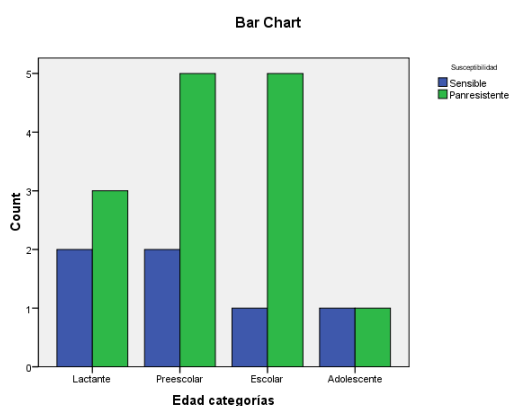
Se utilizó el paquete estadístico SPSS v16.

## 9. RESULTADOS

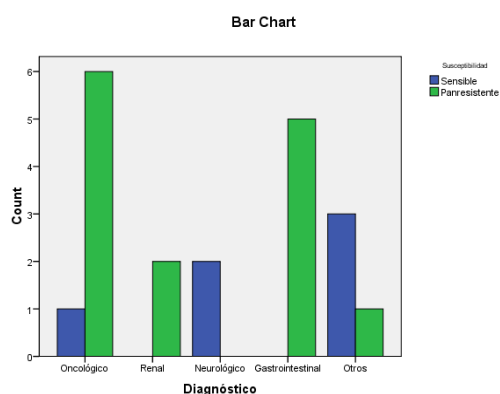
Se revisaron los expedientes de los pacientes, que se había reportado en el Laboratorio Central del Hospital Infantil de México con aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* panresistentes, de Abril de 2007 a Julio de 2009, un total 18 pacientes, de los cuales no se tuvo disponible 1 expediente, y en dos casos no se dispuso de la cepa. Se encontró que había relevancia clínica en 13 casos. Y como control se tuvieron 5 cepas de *P. aeruginosa* sensibles y 2 multirresistentes con implicación clínica. En total se revisaron 20 pacientes, 14 pacientes con aislamientos de *P. aeruginosa* panresistentes, y 6 pacientes con aislamientos de cepas sensibles.

De los pacientes estudiados, con aislamiento de *P. aeruginosa* panresistente, se encontraron 4 pacientes femeninos (20%), y 10 masculinos (50%), con una edad promedio de 4.7 años con una mediana de 3.12 años y un valor mínimo de 1 mes y un máximo de 15 años. Y en el grupo de los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* sensible se encontraron 4 pacientes femeninos (20%) y 2 masculinos (10%), con una edad promedio de 5 años, con una mediana de 22.5, con un valor mínimo de 1 mes y un máximo 14 años

La distribución de los pacientes por grupo etario y los diagnósticos de los pacientes incluidos se muestra en el gráfico 1 y 2. En otros diagnósticos se consideró: lupus eritematoso sistémico, mal de Pot, farmacodermia, displasia broncopulmonar, comunicación interventricular y síndrome de Down, y prematuridad.



**Gráfico 1.** Distribución de los pacientes por grupo etario.



**Gráfico 2.** Frecuencias de los diagnósticos de los pacientes por grupo.

A continuación se muestran las condiciones previas a la infección por *Pseudomonas*.

Condición	Panrrresistentes		Sensibles		Prueba exacta de Fisher
Referidos de otro hospital	6	42.9%	0	0%	0.077
Cirugía reciente	9	64.3%	2	33.3%	0.217
Quimioterapia	3	21.4%	1	16.7%	0.657
Esteroides	4	28.6%	1	16.7%	0.517
Inmunomodulador	3	21.4%	6	100%	0.657
Uso previo de antibióticos	13	92.9%	5	100%	0.3

**Tabla 2.** Comparación de frecuencias de factores en los pacientes previos a infección por *P. aeruginosa* panrrresistente y sensible.

Se analizaron los pacientes que estuvieron con tratamiento antibiótico previo al proceso de infección por *P. aeruginosa*, como se muestra en la tabla 2.

Tipo de antibiótico	Panrrresistente	Sensible	No. de familias	Panrrresistente	Sensible
Cefalosporina	7 (50%)	2 (50%)	Ninguno	0 (0%)	1 (25%)
Aminoglucósido	2 (14.2%)	1 (25%)	1 familia	6 (42.8%)	2 (50%)
Ureidopenicilina	3 (21.4%)	1 (25%)	2 familias	3 (21.4%)	1 (25%)
Carbapenémico	2 (14.2%)	1 (25%)	3 familias	2 (14.2%)	0 (0%)
Ninguno	0 (0%)	1 (25%)	4 familias	3 (21.4%)	2 (50%)

**Tabla 3.** Comparación de los antibióticos previos administrados entre las cepas de *P. aeruginosa* panrrresistentes y sensible por grupo de familia y por número de familia.

Durante su internamiento los pacientes fueron sometidos a diversos procedimientos los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Condición	Panrresistentes		Sensibles		Prueba exacta de Fisher
<b>Colocación de CVC</b>	10	71.4%	4	66.7%	0.613
<b>Sonda urinaria</b>	10	71.4%	3	50%	0.336
<b>Intubación endotraqueal</b>	5	35.7%	2	33.3%	0.664
<b>NPT</b>	4	28.6%	1	16.7%	0.517
<b>Procedimiento Dialítico</b>	1	7.1%	1	16.7%	0.521

**Tabla 4.** Comparación de frecuencias de procedimientos invasivos realizados en los pacientes con infección por *P. aeruginosa* panrresistente y sensible.

En la siguiente tabla se muestra los diversos síntomas y signos relacionados con los procesos infecciosos de los pacientes infectados con *Pseudomonas aeruginosa* tanto panrresistentes como sensible.

Condición	Panrresistentes		Sensibles		Prueba exacta de Fisher
<b>Fiebre</b>	12	85.7%	6	100%	0.479
<b>Taquicardia</b>	10	71.4%	6	100%	0.207
<b>Taquipnea</b>	8	57.1%	5	83.3%	0.277
<b>Leucocitosis</b>	8	57.1%	3	50%	0.574
<b>Bandemia</b>	9	64.3%	3	50%	0.455
<b>Leucopenia</b>	2	14.3%	3	50%	0.131

**Tabla 5.** Comparación de frecuencias de signos y síntomas presentados durante la infección por *P. aeruginosa* panrresistente y sensible.

De los pacientes estudiados con cepa de *P. aeruginosa* panresistentes se documentó sepsis un 50%, choque séptico en un 35.7% y síndrome de respuesta inflamatoria en un 7.14%. Y los pacientes con *P. aeruginosa* sensible se encontró sepsis en un 50% y choque séptico en un 50% de los casos.

<b>Infección localizada</b>	<b>Panresistentes</b>	<b>Sensibles</b>
<b>Ninguna</b>	1 (7.14%)	1 (16.6%)
<b>Sepsis relacionada a colonización de catéter venoso central</b>	2 (14.28%)	3 (50%)
<b>Infección de vías urinarias</b>	5 (35.71%)	0 (0%)
<b>Infección de tejido blando</b>	2 (14.28%)	1 (16.6%)
<b>Neumonía</b>	1 (7.14%)	0 (0%)
<b>Colangitis</b>	0 (0%)	1 (16.6%)
<b>Peritonitis</b>	2 (14.28%)	0 (0%)
<b>Urosepsis</b>	2 (14.28%)	0 (0%)

**Tabla 6.** Comparación de frecuencia de Infección localizada de pacientes con Pseudomonas aeruginosa panresistentes y sensible.

Los pacientes presentaron una estancia intrahospitalaria media de 52.35 días con aislamiento de *P. aeruginosa* panresistente, con una mediana de 32, con valor mínimo de 8 y máximo de 248. Y en los pacientes con cepas sensibles tuvieron una media de 42.67 días, con una mediana de 33.5, con un valor mínimo de 10 y máximo de 92.

Respecto a los aislamientos de *P. aeruginosa* se encontró que las cepas panresistentes fueron 4 (28.5%) aisladas de hemocultivo, 9 (64.3%) de urocultivo y 1 (7.4%) de diversos, y de las cepas sensibles todas fueron aisladas de hemocultivo 6 (100%).

En la siguiente tabla se muestran las salas en donde se les aisló a los pacientes *P. aeruginosa*.

<b>Sala</b>	<b>Panrresistentes</b>	<b>Sensibles</b>
<b>UTIP</b>	4 (28.5%)	2 (33.3%)
<b>UCIN</b>	0 (0%)	1 (11.1%)
<b>Cirugía</b>	2 (14.28%)	0 (0%)
<b>Nefrología</b>	2 (14.28%)	0 (0%)
<b>Pediatría</b>	2 (14.28%)	1 (11.1%)
<b>Neurocirugía</b>	1 (7.14%)	0 (11.1%)
<b>Terapia quirúrgica</b>	1 (7.14%)	0 (0%)
<b>Oncología</b>	0 (0%)	1 (11.1%)
<b>Urgencias</b>	1 (7.14%)	1 (11.1%)
<b>Urología</b>	1 (7.14%)	0 (0%)

**Tabla 7.** Comparación de frecuencias de aislamientos de *P. aeruginosa* panrresistentes y sensible por sala de hospitalización.

Los pacientes que requirieron terapia intensiva con aislamiento de *P. aeruginosa* panrresistentes fue de un 42.8% y los pacientes con cepas sensibles en un 50%. Con una prueba exacta de Fisher's de 0.574.

En los pacientes con *P. aeruginosa* panrresistente se encontró otros microorganismos aislados en 6 casos (42.8%), y de éstos aislamientos los hongos en un 66.6% y *S. epidermidis* en un 33.3%. Y de los pacientes con *P. aeruginosa* sensible se aislaron otros microorganismos en 4 casos (66.6%); de éstos *E. coli* en un 50%, *Serratia marcescens* en un 25% y hongos en un 25%.

Las cepas aisladas de *P. aeruginosa* panrresistentes todas fueron de origen nosocomial. Y las cepas de *P. aeruginosa* sensible fueron de origen nosocomial en un 83.3% y el 16.6% de la comunidad.

Los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* recibieron diversos esquemas de tratamiento. A continuación se muestran los casos, tratamiento administrado, duración del tratamiento, el desenlace y la producción de biopelícula.

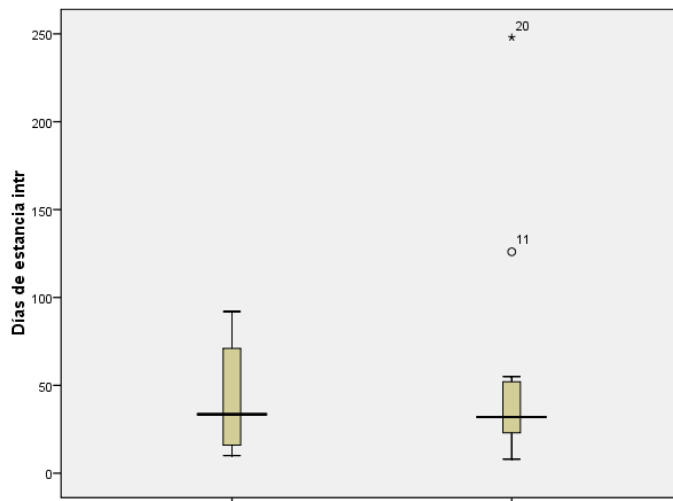


No. de caso	Susceptibilidad	Otros aislamientos	Terapia antibiótica	Duración de tratamiento (días)	Desenlace	Producción de biopelícula
1	S	<i>E. coli</i>	Ureidopenicilina + aminoglucósido	14	Mejoría	Alta
2	P	No	Carbapenémico + aminoglucósido + ciprofloxacino	10	Muerte	Alta
3	P	No	Carbapenémico	10	Mejoría	Alta
4	P	No	Cefepima + aminoglucósido + ciprofloxacino	7	Mejoría	Alta
5	S	<i>Serratia marcescens</i>	Ninguno	0	Muerte	Alta
6	P	<i>S. epidermidis</i>	Carbapenémico + ciprofloxacino	8	Muerte	Alta
7	P	Hongos	Cefepima + aminoglucósido	10	Mejoría	Baja
8	S	<i>E. coli</i>	Carbapenémico	15	Muerte	Baja
9	P	Hongos	Carbapenémico + aminoglucósido + ciprofloxacino	42	Mejoría	Baja
10	S	Hongos	Ureidopenicilina + aminoglucósido	1	Muerte	Baja
11	P	No	Carbapenem + aminoglucósido	4	Muerte	Baja
12	S	No	Carbapenem + aminoglucósido	14	Mejoría	Baja
13	S	No	Cefepima + aminoglucósido	15	Mejoría	Baja
14	P	No	Carbapenémico + aminoglucósido + ciprofloxacino	14	Muerte	Baja
15	P	Hongos	Cefepima + aminoglucósido	3	Muerte	Baja
16	P	No	Amikacina	10	Mejoría	Baja
17	P	Hongos	Cefalosporina de 2da generación	14	Mejoría	Baja
18	P	No	Ninguno	0	Mejoría	Baja
19	P	No	Carbapenémico + aminoglucósido + ciprofloxacino	10	Mejoría	
20	P	<i>S. epidermidis</i>	Ureidopenicilina + aminoglucósido	14	Mejoría	Baja

**Tabla 8.** Casos con aislamiento de *Pseudomonas* panresistentes y sensibles, tratamiento antibiótico administrado, duración, producción de biopelícula y desenlace. P=*P. aeruginosa* panresistente, S= *P. aeruginosa* sensible

Y respecto a la producción de biopelícula se encontró en las cepas panrresistentes una media de 57.92, con una mediana de 13, con valor mínimo de 8 y máximo de 213. Y en las cepas sensibles se encontró una media de 83.49, con una mediana de 14, con un valor mínimo de 2 y máximo de 240.

La duración de estancia hospitalaria de los pacientes en quienes se aisló *P. aeruginosa* panrresistente se encontró una media de 52.3 días, con una mediana de 32, con un valor mínimo de 8 y máximo de 248, y los pacientes con aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* sensibles se encontró una media de 42.67 días, con un valor mínimo de 10 y máximo de 92, con un intervalo de confianza de 95%.



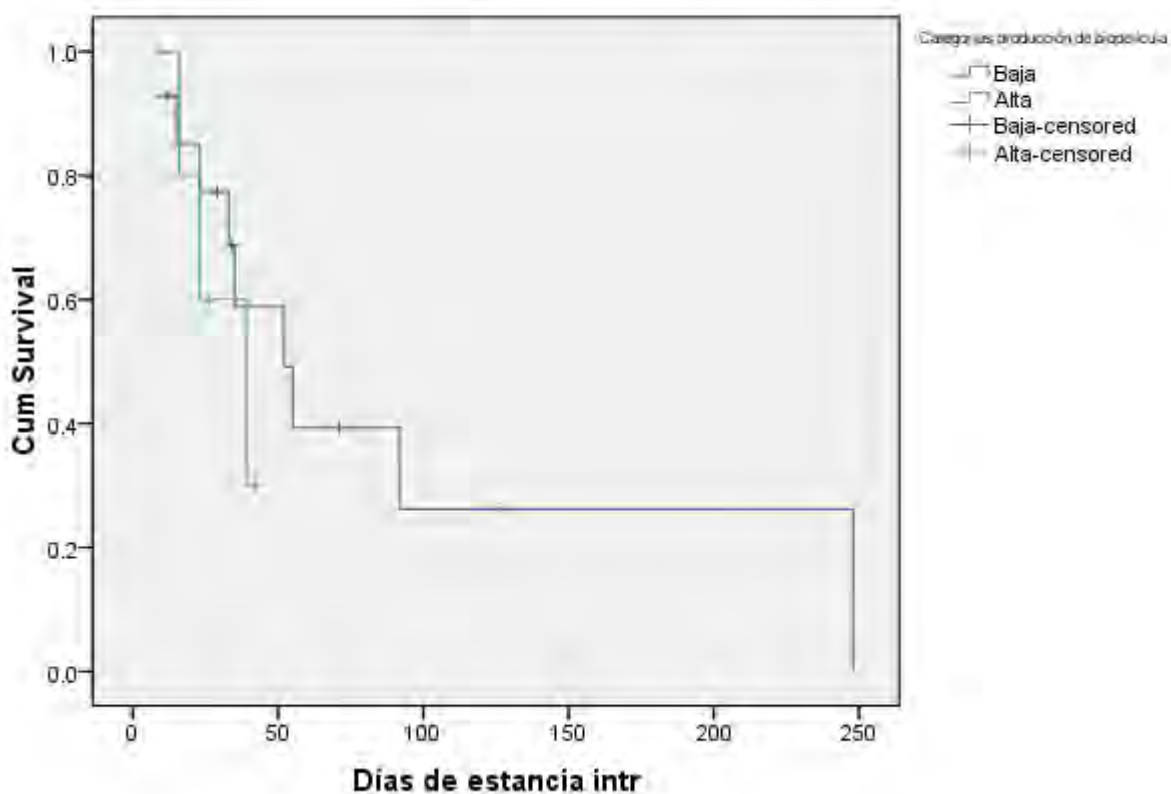
**Gráfico 3.** Distribución de los días de estancia hospitalaria de pacientes con aislamientos de *P. aeruginosa*.

De los pacientes estudiados con aislamiento de *P. aeruginosa* panrresistentes se encontró mejoría en un 64.2% y muerte en un 35.7%. Y de los pacientes con aislamiento de cepa de *P. aeruginosa* sensible se encontró mejoría en un 50% y muerte en un 50%. Con una prueba exacta de Fisher's de 0.455.

	Mejoría	Muerte
<b><i>P. aeruginosa</i> sensible con otro aislamiento</b>	1	3
<b><i>P. aeruginosa</i> sensible sin otro aislamiento</b>	2	0
<b><i>P. aeruginosa</i> panresistente con otro aislamiento</b>	4	4
<b><i>P. aeruginosa</i> sensible con otro aislamiento</b>	4	1

**Tabla 9.** Relación de las cepas de *P. aeruginosa* panresistentes y sensible con y sin otro aislamiento, con el desenlace del paciente.

### Survival Functions



**Gráfico 4.** Curva de sobrevivencia de los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* sensible y panresistente con relación de los días de estancia hospitalaria, y con la cantidad de producción de biopelícula.

## 10. DISCUSIÓN

No existe bacteria con importancia clínica que no haya desarrollado algún tipo de resistencia a los antibióticos, ya descrito hace más de 60 años por René Dubos.<sup>44</sup> Las infecciones nosocomiales son un problema emergente de salud pública. Y *Pseudomonas aeruginosa* es una causa importante, siendo difícil de erradicar por la expresión de resistencia y por el tratamiento antibiótico limitado.<sup>41</sup> De los pacientes analizados, en el HIM se encontraron 14 cepas panresistentes con relevancia clínica. Y dos cepas multirresistentes debido a que una de estas cepas mostró resistencia intermedia para ciprofloxacino para fines de análisis se catalogó como panresistente y la otra cepa fue resistente a 3 familias de antibióticos, y sensible a ciprofloxacino, gentamicina y piperacilina tazobactam se consideró como sensible.

Se encontraron 14 cepas de *P. aeruginosa* panresistentes con relevancia clínica, en dos años, si bien *P. aeruginosa* ocupa un 2do lugar en infecciones nosocomiales no son tan frecuentes las cepas panresistentes. A diferencia de lo reportado en un Hospital del IMSS en 2006, en donde analizaron 24 cepas al azar, y encontraron panresistencia en el 50% de los aislamientos.<sup>42</sup> Sin embargo valdría la pena analizar si existe correlación clínica con dichos aislamientos. Y en otro estudio en España encontraron un incremento en el grado de resistencia a lo largo del tiempo con las familias de antibióticos, pero no se menciona el perfil de las cepas aisladas. En Canada, en 2008 se encontró una frecuencia de cepas multirresistentes del 12.6%.<sup>45-46</sup> Por lo que es importante llevar un control de cada centro hospitalario de las cepas panresistentes. Existen pocos datos en la literatura sobre la frecuencia de las cepas panresistentes.

Un factor importante para la adquisición de cepas panresistentes es la exposición previa a antibióticos antipseudomónicos.<sup>47-48</sup> Lo cual se observó en todos nuestros aislamientos con cepas panresistentes, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa por ser una muestra pequeña. *Pseudomonas* resulta resistente a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica, como resultado de las cepas portadoras de

plásmidos y de proteínas de la membrana celular externa, que limitan la penetración del fármaco al sitio de acción.

De acuerdo a los resultados se observó que los pacientes referidos de otras instituciones, tienen mayor relación con la adquisición de *P. aeruginosa*, no se encuentra en la literatura dicho factor asociado. Siendo importante mencionar la necesidad de mejorar las políticas de uso de los antibióticos en los hospitales y así mejorar las medidas de control de infecciones nosocomiales.<sup>49</sup>

Se observó mayor tendencia al uso de invasiones en pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* panresistentes, lo cual se ha relacionado con la adquisición de cepas por diferentes expresión de factores de virulencia. Así como el lugar de adquisición de cepas panresistentes, siendo más frecuente en la unidad de cuidados intensivos (UCI), acorde con el análisis de perfil de *P. aeruginosa* resistentes que han mostrado un riesgo de infección en la UCI.<sup>48</sup> De la misma manera se encontró mayor estancia intrahospitalaria los pacientes con aislamiento de *P. aeruginosa* panresistentes. Otros factores de riesgo descritos para adquirir infección por *Pseudomonas* en niños dependen del estado inmunológico, edad, estado de nutrición y enfermedad concomitante.<sup>47</sup>

Las infecciones más frecuentemente encontradas con relación a cepas panresistentes fueron infección de vías urinarias, urosepsis e infección relacionada a catéter, que es lo más frecuente reportado en la literatura, sobre todo en pacientes sometidos a manipulación urológica, con uropatía obstructiva o que han recibido antibióticos de amplio espectro.<sup>37</sup>

La coinfección por otro germen en conjunto con *P. aeruginosa* es frecuente, en el estudio se observó mayor mortalidad de los pacientes con aislamiento de *Pseudomonas* tanto sensible como panresistentes y con otro microorganismo, que aquellos pacientes sólo con infección por *Pseudomonas*. Sin embargo no es posible atribuir como causa directa de muerte, ya que es difícil conocer con exactitud cuando la mortalidad se debe a la bacteriemia por pseudomonas, a la enfermedad de base o a la coinfección por otro microorganismo. Está bien descrito en la literatura que las pseudomonas pueden adquirir resistencia de

otros patógenos a través de plásmidos, trasposones y bacteriofagos.<sup>21</sup> Cabe mencionar que en un paciente se documentó colonización por *P. aeruginosa* panresistente, habiendo cursado previamente con cuadro de infección por el mismo germen.<sup>50</sup>

De manera general, se observó mayor producción de biopelícula en los pacientes con cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sensibles que en las panresistentes, sin embargo, en la curva de sobrevida se observa una muerte más temprana en los pacientes con cepas panresistentes con relación a mayor producción de biopelícula. Es importante mencionar que la muestra estudiada es pequeña para poder establecer asociación, y en la literatura no se han encontrado estudios con esta asociación por lo que se requiere continuar con ensayos para contrastar la expresión fenotípica de otros factores de virulencia *in vitro* en relación a la evolución clínica de los pacientes. Es reconocido ampliamente que la biopelícula está asociada a infecciones persistentes y específicamente que las células de la biopelícula pueden ser significativamente más resistentes a los antimicrobianos que las pseudomonas plantónicas. En la literatura se reporta que las cepas nosocomiales producen un 60% de biopelícula, lo cual contrasta con nuestros resultados, ya que en todas las cepas se encontró producción de biopelícula.<sup>51-52</sup>

Los resultados del presente trabajo orienta que las cepas panresistentes son un importante problema hospitalario, debido a las limitadas opciones terapéuticas y a la morbi-mortalidad asociada, será importante realizar estudios de campos pulsados para descartar brote en el hospital o documentar una cepa circulante. Por lo que es muy importante continuar con las medidas de prevención, el uso racional de antibióticos para no seleccionar cepas en pacientes susceptibles, vigilancia epidemiológica de los casos.

A pesar de los estudios de emergencia de cepas panresistentes son necesarios análisis prospectivos comparativos para el estudio de los diversos factores de riesgo. se requiere el desarrollo de nuevos medicamentos para contrarrestar las infecciones en las cuales la biopelícula está involucrada Así como establecer estrategias de tratamiento al no contar con antibióticos. Y el

uso de herramientas como epidemiología molecular para tener una mejor caracterización de las cepas.

Finalmente, es importante continuar con la vigilancia epidemiológica, siempre será el principal reto el establecer y supervisar el cumplimiento de las estrategias de prevención para evitar infecciones nosocomiales, y mejor aún, la emergencia de cepas panrrresistentes.

## 11. CONCLUSIONES

- La administración previa de antibióticos antipseudomónicos es un factor de riesgo para la adquisición de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* panrrresistentes.
- 
- La adquisición de cepas panrrresistentes es de origen nosocomial.
- La coinfección de *P. aeruginosa* panrrresistente con otro germen se asocia a mayor mortalidad en pacientes con factores de riesgo.
- *Pseudomonas aeruginosa* tanto panrrresistentes como sensibles producen biopelícula sin diferencia estadísticamente significativa, ni relación con el desenlace del paciente
- Se encontró asociación no significativa entre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* panrrresistentes productoras de biopelícula, con muerte más temprana que con las cepas sensibles.
- Los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* siguen siendo un reto para el tratamiento debido a la expresión de diversos factores de virulencia así como a su susceptibilidad a los antimicrobianos.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Centers for Disease Control and Prevention 2002. Campaign to prevent Antimicrobial resistance in healthcare settings. <http://www.cdc.gov/drugresistance/healthcare/default.htm>.
2. Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am*. 1995; 9:497-530.
3. Mendes R, García P, Guzman M, Toleman M, Walsh T, Jones R. First Isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1433-4.
4. Harris A, Torres-Viera C, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore MH, Carmeli Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 1999; 28:1128-33.
5. Canton R, et al. Patógenos multirresistentes en la fibrosis quística. *Arch Bronconeumol* 2002; 38(8):376-85.
6. Mandell, G. L. Benett, J. E. y Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth Edition. Ed. Saunders, Philadelphia, Churchill Livingstone. Volume 2. pp 2587-2615.
7. Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ and Kaplan SL (2004). Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Fifth Edition. Ed. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. Volume 1. pp 1557-1573.
8. Corona A, Miranda M, Leañes B, Portillo L, Hernández A, Antro J, et al. Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res*.2001;32:238-42.
9. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, et al. Prospective study of nosocomial colonization an infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2001;27:503-512.
10. Cardenosa Cendrero Ja, Sole-Violan J, Bordes Benitez A et al. Role of different routes of tracheal colonization in the development of pneumonia in patients receiving mechanical ventilation. *Chest*, 1999; 116:462-470.
11. Ciara M. Shaver<sup>1</sup> y Alan R. Hauser. Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infect Immun*. Dec. 2004, p. 6969–6977 Vol. 72, No. 12.
12. Davies JC. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Pathogenesis and persistente. *Paediatric Respir Rev*. 2002; 3:128-134.
13. Anwar H, Brown MRW, Day A, et al. Outer membrane antigens of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolated directly from the sputum of a cystic fibrosis patient. *Microbiol Lett*. 1984; 24:235-239.
14. Berger M, Sorensen R. U, Tosi M. F. et al Complement receptor expression of neutrophils at an inflammatory site, the pseudomonas-infected lung in cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 1989. 84: 1302-1313.
15. Lam, J., R. Chan, K. Tam, 7 J. W. Costerton. 1980. Production of mucoid micro-colonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun*. 28: 546-556.
16. Criz S. J. Prit T. L. et al. Role of lipopolysacharides in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1984. 44:508-513.
17. Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C. Functional role of



- bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. 2009. *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2), pp. 430-449
18. Pedersen, S. S.: Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *A. P. M. I. S.* 1992. Suppl.28:1-79.
  19. Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher, & D. W. Martin. 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* 176: 2773-2780.
  20. Donlan, R. M., and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167–193
  21. Aparna, Madhu Sharma and Sarita Yadav. Biofilms: microbes and disease *BJID* 2008; 12 (December).
  22. Victoria E. Wagner and Barbara H. Iglewski. *P.aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clinic Rev Allerg Immunol* (2008) 35:124–134.
  23. TR De Klevit. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* (2009) 11(2), 279–288
  24. Whiteley M, Bangera M.G, Bumgarner R. *et al.* Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Nature* 2001, 413:860-864.
  25. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non fermentative Gram-negative bacteria. *CID* 1998; 27 (Suppl 1 S93-S99).
  26. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 2002; 95 (Suppl. 41) 22-26.
  27. Stover C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000 :406 :959-964.
  28. Burrows, L. L., D. F. Charter & J. S. Lam. 1996. Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. *Mol. Microbiol.* 22: 481-495.
  29. Withers, H., Swift, S. & P. Williams. 2001. *Quórum sensing* as an integral component of gene regulatory networks in gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 186-193
  30. Fuqua W. C. M. R. Parsek and E. P. Greenberg. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quórum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35: 439-468.
  31. De Kievit, T., Y. Kakai, K. Register, E. C. Pesci & B. H. Iglewski 2002. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl quórum-sensing* systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 101-106.
  32. Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi, and E. P. Greenberg. 2003. Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quórum controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185: 2066-2079.
  33. Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, and B. H. Iglewski. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11229–11234.
  34. Whiteley M., K. M. Lee, & E. P. Greenberg. 1999. Identification of genes controlled by quórum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 9839-9843

35. Yi-Hu Dong, Lian-Hui Wang and Lian-Hui Zhang. 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362, 1201-1211
36. Medina, G., Juárez, K., and Soberón-Chávez G., 2003b, The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB operon is not expressed on the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer Nbutanoyl-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 185: 377-380.
37. T. R. de Klevit. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Minireview. *Environmental Microbiology* (2009) 11(2), 279–288
38. Joanna B. Goldberg, *et al.* *Pseudomonas* 2007. Meeting Review. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Apr. 2008, p. 2649–2662
39. Veessenmeyer, J.L., Hauser, A.R., Lisboa, T., Rello, J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: Evolving translational strategies *Critical Care Medicine* 37 (5), pp. 1777-1786.
40. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infectious Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470–85.
41. Louis B. Rice. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *CID* 2006;43 (Suppl 2) • Rice
42. Jane-Castillo Vera. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario multirresistentes a 21 antibióticos Volumen 31 No. 2 Abril-Junio 2006. p. 41-
43. Falagas M.E., Kopterides P. Risk factors for the isolation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect* 2006; 64:7-15.)
44. Moberg C.L. René Dubos: a harbinger of microbial resistance to antibiotic. *Microb Drug Resist.* 1996;2:287-97
45. C. Guerrero, *et al.* Sensibilidad de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Murcia. *Rev Esp Quimioterapia.* 2003; Vol 16 (No. 4)
46. Yemile Lebeque, *et al.* Infecciones nosocomiales; incidencia de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev cubana med v.45 n.1 Ciudad de la Habana ene.-mar. 2006*
47. Millena R. S Pinheiro, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infections: factors relating to mortality with emphasis on resistance pattern and antimicrobial treatment. *BJID* 2008; 12 (December).
48. George Zhanel, *et al.* Antimicrobial Resistant Pathogens in Intensive care units in Canada: results of the Canadian national intensive care unit study, 2005-2006. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr. 2008, p 1430-1437.
49. Timothy, *et al.* Infectious Diseases Society of America and the Society Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. *Antimicrobial Stewardship Guidelines* • *CID* 2007;44 (15 January) • 159
50. Paterson D The epidemiological profile of infectious with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 2006; 43(Suppl 2):S43–8

51. Amy L. Spoering. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of bacteriology*. Dec 2001, pag 6746-6751.
52. Susan J. Rehm. The Far-Reaching impact of antimicrobial resistance. *Impact of Antimicrobial Resistance • CID 2007:45 (Suppl 2) • S97*