



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



**Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*
resistente a carbapenémicos obtenidas de pacientes pediátricos**

Tesis

**Que como uno de los requisitos para obtener el grado de
Químico Farmacéutico Biológica**

presenta:

Juan Manuel Torres González

Directora de Tesis

Dra. en C. Alejandra Aquino Andrade

Asesor interno

Q.F.B. Gildardo Herrera Quiroz

Ciudad de México, 2019



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.

Índice general

	Página
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Generalidades	2
2.2. Importancia clínica	2
2.3. Mecanismos de resistencia	3
2.4. Betalactamasas	6
2.5. Carbapenemasas	8
2.6. Métodos de tipificación	8
2.6.1. Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST)	8
2.6.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)	9
2.6.3. DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)	9
2.6.4. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	9
2.7. Epidemiología	11
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivo	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos particulares	18
6. Material y métodos	19
6.1. Diagrama de flujo	19
6.2. Selección de aislamientos	19
6.3. Identificación y perfil de susceptibilidad	20
6.4. Detección de carbapenemasas	21
6.4.1. Carba NP	21
6.4.2. Método modificado de inhibición al carbapenémico (mMIC)	22
6.4.3. Búsqueda de genes que codifican carbapenemasas	22
6.5. PFGE	24
6.5.1. Extracción de DNA	24

6.5.2. Restricción de DNA	25
6.5.3. Electroforesis	26
7. Resultados	27
8. Discusión de resultados	37
9. Conclusiones	41
10. Perspectivas	41
11. Referencias	42

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Mecanismos de resistencia en <i>P. aeruginosa</i>	5
Tabla 2. Clasificación molecular y funcional de betalactamasas	7
Tabla 3. Ventajas y limitaciones de métodos de tipificación	10
Tabla 4. Interpretación de los valores del método de difusión en disco y CMI	21
Tabla 5. Mezcla de reacción para multiplex PCR de IMP,VIM y KPC	23
Tabla 6. Condiciones para llevar a cabo PCR multiplex de IMP,VIM y KPC	23
Tabla 7. Mezcla de reacción para PCR de GES, OXA-48 y NDM	24
Tabla 8. Condiciones para llevar a cabo PCR multiplex de GES, OXA-48 y NDM	24
Tabla 9. Distribución de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>	32

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Distribución global de <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos.	11
Figura 2. Resistencia global de <i>P. aeruginosa</i> a antibióticos de elección para su tratamiento.	12
Figura 3. Resistencia a antibióticos de <i>P. aeruginosa</i> en México.	13
Figura 4. Frecuencia de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos durante el periodo de enero de 2017 a abril 2018	27
Figura 5. Frecuencia de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> por tipo de muestra	28
Figura 6. Perfil de susceptibilidad de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos	29
Figura 7. Aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> productores de carbapenemasas	30
Figura 8. Resultados de las pruebas fenotípicas Carba NP y mMIC para la detección de carbapenemasas	30
Figura 9. Carbapenemasas encontradas en aislamientos resistentes a carbapenémicos durante el periodo de enero 2017 a abril 2018.	31
Figura 10. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> agrupados en clona 1 y 2.	33
Figura 11. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> agrupados dentro de las clonas 3, 4, 5 y 6	34
Figura 12. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> que se distribuyeron en las clonas 7, 8, 9, 10 y 11	35
Figura 13. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> no agrupados	36

1. Introducción

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo que causa infecciones asociadas al cuidado de la salud. Posee la capacidad de adaptarse a diversos ambientes, presenta resistencia intrínseca a múltiples antibióticos y puede adquirir resistencia por medio de elementos genéticos móviles (EGM) o por mutaciones en genes cromosómicos. Uno de los mecanismos de resistencia adquiridos de mayor importancia en *P. aeruginosa* es la producción de betalactamasas las cuales rompen moléculas de betalactámicos.

Las carbapenemasas son betalactamasas que tienen la característica de degradar carbapenémicos y otros betalactámicos. Los carbapenémicos son principalmente utilizados para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos y son una de las últimas opciones terapéuticas contra *P. aeruginosa*. Las carbapenemasas de mayor importancia en *P. aeruginosa* son: GES, IMP, KPC, SPM, VIM, NDM y OXA.

La detección y vigilancia de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas es importante para evitar brotes por lo que se utilizan métodos de tipificación los cuales nos arrojan información epidemiológica que permite analizar si existe relación entre dos aislamientos de diferentes pacientes u obtenidas de diversas superficies; además de que se puede realizar una agrupación filogenética, la cual es de suma importancia debido a que a nivel global se han reportado ciertas clonas de *P. aeruginosa* de alto riesgo por sus características relacionadas con el fenotipo multidrogoresistentes (MDR) o extensamente drogo resistentes (XDR).

Por lo que en el presente trabajo se realizó una búsqueda de carbapenemasas en aislamientos de *P. aeruginosa* que presentan susceptibilidad intermedia o resistente a carbapenémicos, los cuales fueron obtenidos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), durante el periodo de enero del 2017 a abril del 2018. Posteriormente, se agruparon por un método de tipificación para analizar si existía relación entre ellos y conocer si existe alguna clona de alto riesgo dentro del Instituto.

2. Marco teórico

2.1. Generalidades

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, oxidasa positiva, indol rápido negativo, no fermentador de lactosa. Se clasifica como un patógeno oportunista. Su capacidad metabólica es extensa debido a que produce múltiples metabolitos y polímeros secundarios, además utiliza diversas fuentes de carbono y aceptores de electrones, lo cual le confiere la capacidad de adaptarse a diversos ambientes, incluyendo suelo, agua, plantas y animales, y puede infectar múltiples huéspedes 1,2,3,4.

Posee un genoma de 5-7Mpb que puede ser muy variable y posee plasticidad, debido a la inserción de diferentes elementos móviles, como islas genómicas y patogénicas que le proporciona versatilidad y le permite una mejor adaptación a diferentes nichos. Una característica virulenta importante es la formación de biofilm y su multirresistencia natural a un amplio número de antibióticos y desinfectantes 1,2,3,4,5.

2.2. Importancia clínica

Las infecciones asociadas al cuidado de la salud por bacilos Gram negativos son de extrema importancia por las elevadas tasas de mortalidad entre el 20 y 50%. *P. aeruginosa* ocupa uno de los principales lugares debido a que se aísla como agente causal de diversas infecciones, en algunos reportes se observan frecuencias que van de 17.27% hasta 20.7% 6,7,8,9,10.

P. aeruginosa causa una variedad de infecciones entre la más importantes se encuentran: neumonía asociada a ventilación; infección del tracto urinario, piel y tejido conectivos (cartílago y hueso) y bacteriemia 4,11,12,13.

Existen diversos factores de riesgo que predisponen a la infección por *P. aeruginosa*, tales como: edad (pacientes pediátricos y geriátricos), inmunocompromiso, comorbilidades (enfermedades cardíacas, padecimientos oncológicos, diabetes, fibrosis quística), daño en piel, uso continuo de antibióticos,

ventilación mecánica asistida y procedimientos invasivos (catéter, hemodiálisis, traqueotomía) 2,4,13,14,15,16,17.

Las infecciones por *P. aeruginosa* en niños son las más frecuentes. En hospitales, es común encontrarla colonizando diferentes superficies, fuentes húmedas; tales como unidades de aire acondicionado, grifos de fregaderos y equipos médicos. Aproximadamente, un 30% de la población general porta *P. aeruginosa* en la piel, mucosas y el intestino 3,4.

Las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos han aumentado, lo que se considera una amenaza para la salud pública, debido a que la aparición de resistencia antimicrobiana se asocia con efectos perjudiciales, como una estancia hospitalaria prolongada o costos elevados de asistencia médica y mortalidad 10,15,16,18.

2.3. Mecanismos de resistencia

La resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* está clasificada en resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca es aquella innata o inherente a una especie 33. Esta especie es intrínsecamente resistente a: aminopenicilinas sin y con inhibidor de betalactamasas, cefalosporinas de primera y segunda generación, dos cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftriaxona), tetraciclinas, tigeciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y al carbapenémico, ertapenem 33.

Las cepas silvestres de *P. aeruginosa* codifican una cefalosporinasa clase C, AmpC, inducida molecularmente y la cual no es inhibida por ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam, esta cefalosporinasa le confiere la resistencia a aminopenicilinas con y sin inhibidor de betalactamasa, cefalosporinas de primera, segunda generación y cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftriaxona) 11.

Además, en *P. aeruginosa* se da la formación de biofilm, que consiste en una matriz extracelular compuesta de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos; la cual está regulada por respuesta a estímulos ambientales. La formación de biofilm protege a la bacteria de antibióticos, de mecanismos de defensa inmune y también es un mediador de las interacciones célula-célula y célula-superficie 2.

La producción de alginato y la sobreproducción de polisacáridos extracelulares disminuyen la permeabilidad lo que ocasiona que todas las cepas de *P. aeruginosa* presenten resistencia al carbapenémico, ertapenem ^{2,11}.

P. aeruginosa posee bombas de eflujo, como MexAB-OprM, que se encargan de expulsar sustancias nocivas para la bacteria y que contribuyen a la resistencia intrínseca de este microorganismo a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, novobiocina, macrólidos y algunos betalactámicos ^{11,19}.

La resistencia adquirida en *P. aeruginosa* se debe a cambios en genes pre-existentes o adquisición de genes. Las mutaciones en genes cromosómicos pueden incrementar la expresión de mecanismos de resistencia intrínseca (enzimas que inactivan antibióticos AmpC y bombas de eflujo como MexAB-OprM, alteraciones de permeabilidad por pérdida de porinas en la membrana externa (OprD) o modificaciones en sitios blanco ^{15,20}.

Los EGM de transferencia horizontal, como los plásmidos acarrean genes de resistencia, que codifican betalactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos o mecanismos no enzimáticos como Qnr para la resistencia a fluoroquinolonas. Estos plásmidos comúnmente llevan múltiples determinantes de resistencia, una sola conjugación de plásmido puede ser suficiente para conferir el fenotipo de resistencia a múltiples antibióticos a una cepa receptora ²¹.

P. aeruginosa puede presentar la mayoría de estos mecanismos de resistencia conocidos ya sea que puedan ser codificados cromosómicamente de manera intrínseca o sean adquiridos por determinantes de resistencia importados; afectando la mayoría de las clases de antibióticos tales como betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y polimixinas ¹¹.

En la siguiente tabla se enlistan los mecanismos de resistencia que puede presentar *P. aeruginosa*.

Tabla 1. Mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*

Tipo	Mecanismo de resistencia	Antibiótico	Tipo de resistencia
Cromosómica	Cefalosporinasa tipo Amp-C	Betalactámicos	Inactivación del antibiótico
	OXA-50 Oxacilinasa clase D	Betalactámicos	Inactivación del antibiótico
	Enzimas que inactivan aminoglucósidos	Aminoglucósidos	Inactivación del antibiótico
	Sistemas de eflujo (sobrexpresión)	Múltiples clases de antibióticos	Sistemas de eflujo
	Disminución de la permeabilidad de membrana	Múltiples clases de antibióticos	Impermeabilidad de membrana
	DNA girasa y topoisomerasa IV	Fluoroquinolonas	Modificación del sitio blanco
	Modificación del LPS	Colistina	Modificación del sitio blanco
EGM	Serinetiltransferasas de clase A (PSE, CARB, TEM)	Betalactámicos	Inactivación del antibiótico
	BLEE clase A (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, IBC)	Betalactámicos	Inactivación del antibiótico
	BLEE clase D (tipos OXA)	Betalactámicos	Inactivación del antibiótico
	Metalobetalactamasas clase B (IMP, VIM, SPM, GIM)	Carbapenémicos	Inactivación del antibiótico
	Serincarbapenemasa de clase A (KPC)	Carbapenémicos	Inactivación del antibiótico
	Serincarbapenemasa de clase D (Tipo OXA; OXA-40)	Carbapenémicos	Inactivación del antibiótico
	Enzimas que inactivan aminoglucósidos	Aminoglucósidos	Inactivación del antibiótico
	Enzimas ribosomales metiltransferasa	Aminoglucósidos	Modificación del sitio blanco

Modificado de Bassetti M. *Drugs Context.* 2018; 7: 212527

2.4. Betalactamasas

Son enzimas capaces de romper moléculas de betalactámicos que confieren resistencia al microorganismo que la produce. Existen más de 1,000 betalactamasas producidas por diversas bacterias, son el mecanismo de propagación de resistencia más común e importante en bacilos Gram negativos.

Existen dos sistemas de clasificación en uso para estas enzimas:

- Clasificación molecular Ambler o clasificación molecular, la cual está basada en motivos conservados y secuencia de proteínas que categoriza aún más estas enzimas en cuatro clases: A, B, C y D. Las betalactamasas clase A, C y D, utilizan serina como sustrato, para la hidrólisis del betalactámico; mientras que la clase B requiere iones divalentes de zinc.
- Clasificación funcional Bush, Jacoby y Medeiros (Tabla 2), clasifica de acuerdo al sustrato y perfiles de inhibición. Está compuesta de tres grupos: grupo 1 (clase C), cefaloporinasas; grupo 2 (clase A y D), amplio espectro, resistentes a inhibidor, betalactamasas de espectro extendido y serincarbapenemasas y grupo 3 (clase B), metalobetalactamasas ²².

Tabla 2. Clasificación molecular y funcional de betalactamasas

Clasificación Molecular	Clasificación funcional	Sustrato	Inhibidores		Ejemplos
			CLAV	TAZ	
A	2 ^a	Penicilinas	Si	No	PC-1
	2b	Penicilinas, algunas C1G	Si	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	CFS de espectro extendido, monobactam	Si	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PET-1, VEB-1
	2br	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
	2ber	CFS de espectro extendido, monobactámicos	No	No	TEM-50
	2c	Carbenicilina	Si	No	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbenicilina, cefepime	Si	No	RTG-4
	2e	Betalactámicos de espectro extendido	Si	No	CepA
	2f	Betalactámicos de espectro extendido		No	KPC-2, IMI-1, SME-1
	B	3a	Carbapenémicos	No	Si
3b		Carbapenémicos	No	Si	CphA, Sfh-1
C	1	CFS	No	No	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	CFS	No	Si	GC1, CMY-37
D	2d	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
	2de	CFS de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48

Tomado de Ur Rahman S. Biomed Res Int. 2018; 26: 9519718.

2.5. Carbapenemasas

Las carbapenemasas son capaces de hidrolizar carbapenémicos y otros betalactámicos. Los carbapenémicos son antibióticos de amplio espectro y son principalmente usados para el tratamiento de infecciones por bacterias aerobias Gram negativas. La propagación de la resistencia a carbapenémicos por adquisición de carbapenemasas es un grave problema de salud pública. De acuerdo a su dependencia de cationes divalentes para la activación de la enzima, las carbapenemasas pueden ser divididas en no metalcarbapenemasas (independientes de Zinc donde se encuentran las clases A, C y D) y metalcarbapenemasas (dependientes de Zinc encontramos a la clase B). Las carbapenemasas de mayor importancia reportadas en *P. aeruginosa* tenemos para la clase A: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) y GES (betalactamasa de espectro extendido Guiana), mientras que las carbapenemasas más comunes pertenecientes a la clase B tenemos IMP (*Pseudomonas* resistente a imipenem), VIM (metalobetalactamasa codificada en integrón Verona), SPM (Sao Paulo metalobetalactamasa) y NDM (Nueva Delhi metalobetalactamasa). Por otra parte, en las carbapenemasas de la clase C encontramos ACT-1 (betalactamasa tipo Amp C). Por último, en las carbapenemasas clase D tenemos la familia de las oxacilinasas donde la de mayor importancia en *P. aeruginosa* es OXA-48 ^{11,12,15,23}.

2.6. Métodos de tipificación

Los métodos de tipificación son útiles para la caracterización y análisis epidemiológico de microorganismos infecciosos. Los principales métodos de tipificación molecular son los siguientes:

2.6.1. Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST, *Multilocus Sequence Typing*)

Método de tipificación que permite la caracterización de aislamientos bacterianos de manera estandarizada, reproducible. Es una herramienta que nos permite realizar estudios de evolución molecular y epidemiológicos globales. Un desarrollo conceptual clave fue el reconocimiento de que las bacterias no necesariamente

tienen una estructura poblacional clonal, por lo que los patrones de intercambio genético entre bacterias, y por lo tanto de descendencia, solo pueden resolverse mediante el análisis de datos de secuencias de nucleótidos de múltiples ubicaciones del cromosoma por lo que la técnica se enfoca únicamente en genes de mantenimiento altamente conservados y la combinación de cada alelo ²⁴.

2.6.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

Se basa en la extracción del DNA en una matriz sólida aprovechando sus características físicas como la solubilidad, por medio de compuestos químicos que degradan componentes celulares, lo que permite la obtención de DNA dentro de la matriz. Posteriormente, se corta con enzimas de restricción y se separan los fragmentos por electroforesis con cambios de dirección periódicos.

Es útil en investigaciones epidemiológicas de gran escala, con alto poder de discriminatorio, expresa la homogeneidad de distribución entre tipos y es valioso para definir la mejor estrategia de tipificación y de interpretación de datos ^{25,26}.

2.6.3. DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*)

Es un método útil para investigar la diversidad genética entre especies, se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde los fragmentos aleatorios de DNA genómico se amplifican con cebadores cortos de secuencias de nucleótidos arbitrarias. La técnica RAPD ha sido utilizada para analizar la diversidad genética, para discriminar entre cepas de diferentes especies bacterianas, caracterización molecular de especies de plantas y en la estimación de la diversidad genética en varias especies de plantas en peligro de extinción ²⁷.

2.6.4. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

Esta técnica es utilizada en numerosos estudios para explorar la diversidad microbiana de las poblaciones predominantes en diversos hábitat. Se ha utilizado para evaluar los efectos de variación espacial y temporal en la estructura de las

comunidades microbianas. En esta técnica se amplifican fragmentos de DNA, los amplicones resultantes luego se digieren con una o más enzimas de restricción. Dado que las diferencias en los tamaños de los fragmentos cortados reflejan diferencias en las secuencias de los genes (polimorfismos de secuencia), se pueden inferir relaciones filogenéticamente²⁸.

A continuación, se muestran algunas ventajas y limitaciones de cada uno de los métodos.

Tabla 3. Ventajas y limitaciones de métodos de tipificación

Método	Ventajas	Limitaciones
MLST	Estandarización de datos MLST Alta reproducibilidad y no requiere acceso a reactivos o entrenamiento especializados Datos generados son totalmente portátiles entre los laboratorios y se pueden compartir en todo el mundo a través de Internet	Muy costoso Insuficiente discernimiento para el uso de rutina en la vigilancia local y los brotes Carecen del poder discriminatorio para diferenciar ciertas bacterias
PFGE	Económico Excelente tipificabilidad Alta sensibilidad Fácil interpretación Alto poder discriminatorio	Ausencia de protocolos estandarizados Limitada reproducibilidad Método laborioso (varios días para obtención de resultados) Conocimientos técnicos requeridos
RAPD	Rápida	Bajo poder discriminatorio
RFLP	Semicuantitativa Alta reproducibilidad Bajo costo Técnica sencilla y analítica	Tiempo Preparación costosa y secuenciación de bibliotecas de clones Bajo poder discriminatorio

2.7. Epidemiología

P. aeruginosa es uno de los principales microorganismos que causa infecciones asociadas al cuidado de la salud, en EE. UU. (7.1%) y ciudades europeas (8.9%). En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria del Instituto del Seguro Social reportó una tasa de incidencia de 19.9% en 2013 superior a lo reportado en 2011, que fue de 6.9%.

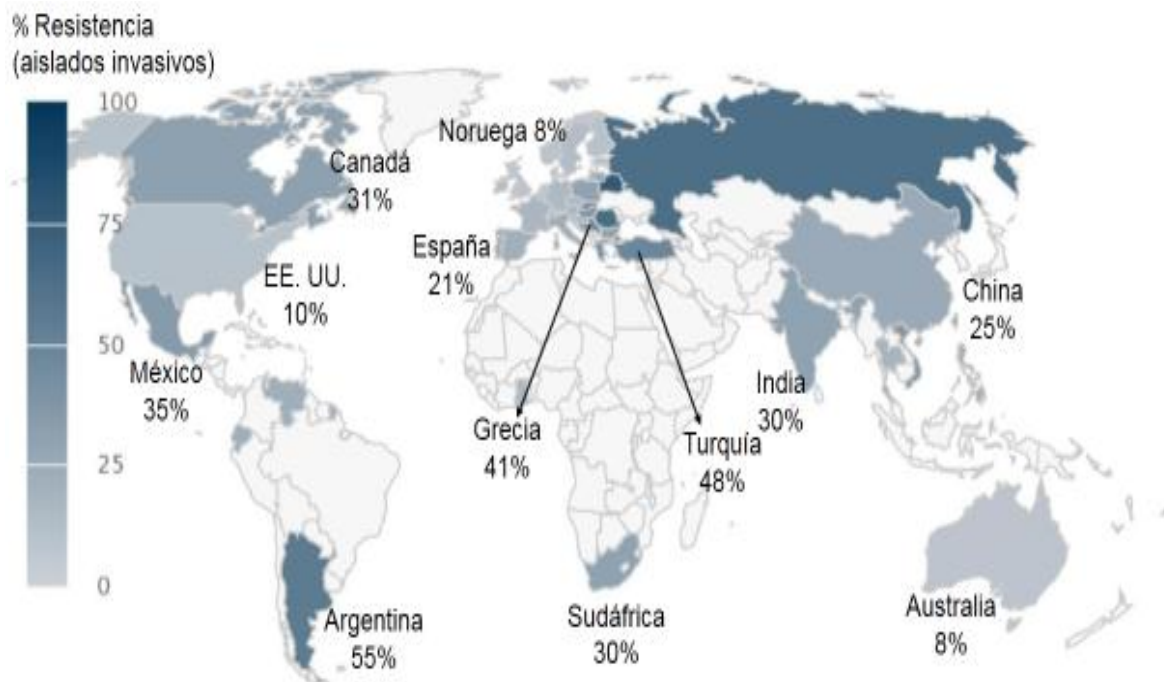


Figura 1. Distribución global de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Modificada de The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy. ResistanceMap: Antibiotic resistance. 2019. <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>.

En la figura 1, se observa que la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* es un problema a escala mundial. Solo reportaron tasas de resistencia variables: menores a 15% en países como Suecia, Noruega, Alemania, Australia, Países Bajos y EE. UU., de 16-30% en Venezuela, Ecuador, Francia, España, China e India; entre 31-45% en Canadá, México, Croacia, Hungría y Grecia; y mayores a 45% en Rusia, Argentina, Rumania y Turquía. En México, existen otros reportes como el presentado por López –García y colaboradores en 2018 donde se muestran resistencia a carbapenémicos del 68%; mientras que Ponce-de-León y colaboradores, en mismo año, observaron resistencia de 38% ³⁶.

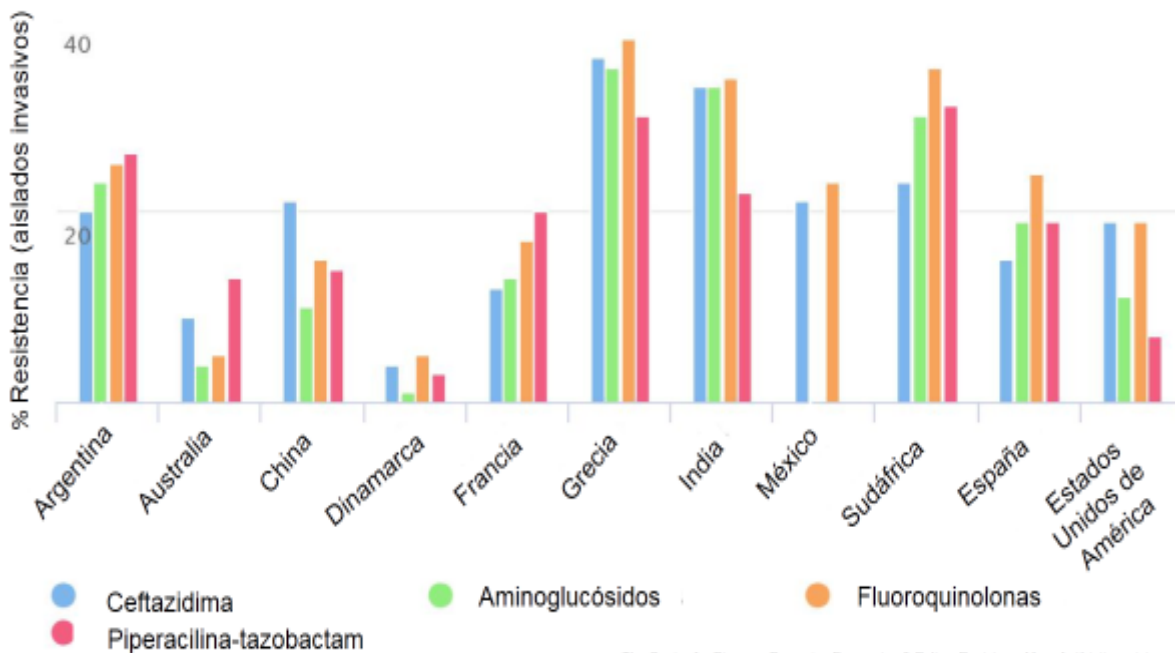


Figura 2. Resistencia global de *P. aeruginosa* a antibióticos de elección para su tratamiento. Modificada de The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy. ResistanceMap: Antibiotic resistance. 2019. <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>.

En la figura 2, se señala la resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos utilizados como tratamiento de elección. Se observan países representativos de cada región geográfica. Para el continente Americano se muestran tres panoramas distintos por una parte EE. UU. tiene tasas de resistencia a los antimicrobianos menores al 20%; ceftazidima (19%), piperacilina-tazobactam (7%), aminoglucósidos (11%) y fluoroquinolonas (19%); para México, se observan frecuencias no mayores a 25%; ceftazidima (21%) y fluoroquinolonas (23%); por otra parte en Argentina se observan tasas menores de 30%; ceftazidima (20%), aminoglucósidos (23%), piperacilina-tazobactam (26%), fluoroquinolonas (25%). Para el continente Europeo se pueden apreciar cuatro escenarios distintos por una parte en Dinamarca se reportan frecuencias de resistencia no mayores al 5%; ceftazidima (4%), piperacilina-tazobactam (3%), aminoglucósidos (1%), fluoroquinolonas (5%); en Francia, se reportan frecuencias menores al 20%; ceftazidima (12%), piperacilina-tazobactam (20%), aminoglucósidos (13%), fluoroquinolonas (17%); en España, se reportan frecuencias menores al 25%; ceftazidima (15%), piperacilina-tazobactam (19%), aminoglucósidos (19%), fluoroquinolonas (24%); mientras que en Grecia se

reportan frecuencias de resistencia cerca de 40%; ceftazidima (36%), piperacilina-tazobactam (30%), aminoglucósidos (35%), y fluoroquinolonas (38%). En el continente Asiático existen dos perspectivas no muy distintas pero si de gran importancia por las frecuencias de resistencia, por una parte China presenta tasas menores al 25%; ceftazidima (21%), piperacilina-tazobactam (14%), aminoglucósidos (10%) y fluoroquinolonas (15%); mientras que en la India, la resistencia es menor al 35%; ceftazidima (33%), aminoglucósidos (33%), piperacilina-tazobactam (22%) y fluoroquinolonas (34%). Para el continente africano, solo está representado por Sudáfrica en donde las tasas de resistencia se observan en promedio de 35%; ceftazidima (23%), aminoglucósidos (30%), piperacilina-tazobactam (31%) y fluoroquinolonas (35%). Por último, tenemos Australia, en donde se visualizan resistencias menores al 15%; ceftazidima (9%), aminoglucósidos (4%), piperacilina-tazobactam (13%) y fluoroquinolonas (5%).

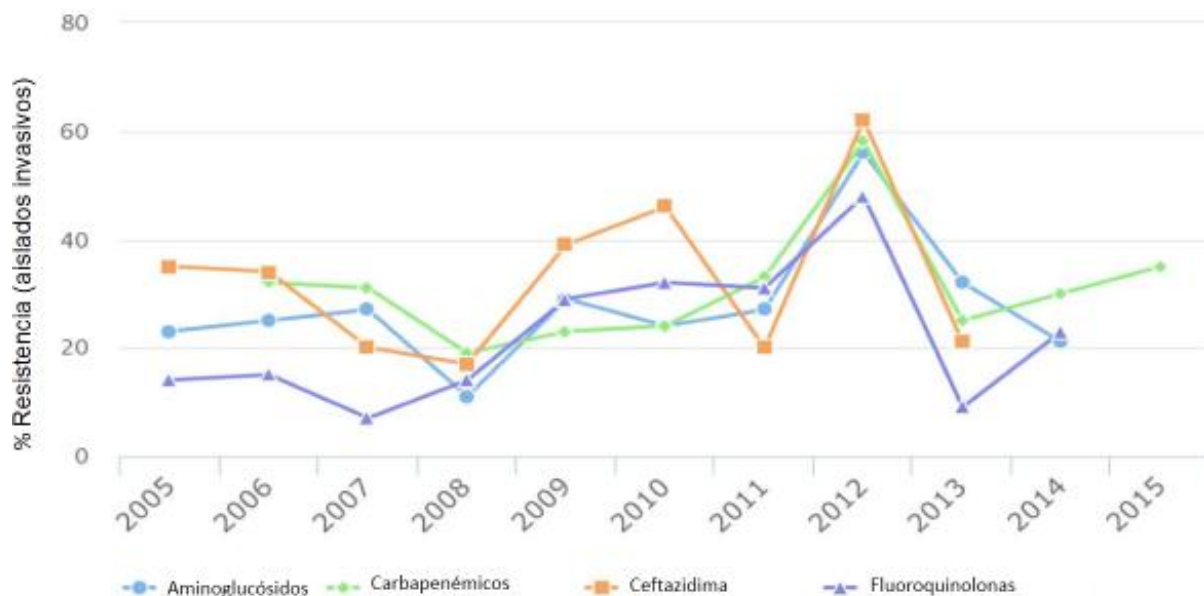


Figura 3. Resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa* en México. Modificado de The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy. ResistanceMap: Antibiotic resistance. 2019. <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>.

En la figura 3, se observa como existe una variación del 2005 al 2015 en la resistencia de *P. aeruginosa* a antibióticos en el hospital civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”. Se puede apreciar que en 2005, informa tasas de resistencia a ceftazidima 35%, amikacina 23% y fluoroquinolonas 14%. Para el 2006 se comenzó

el reporte de resistencia a carbapenémicos que fue de 32%. En el 2008, se muestra una disminución en las frecuencias de resistencia encontrando ceftazidima 17%, amikacina 11%, carbapenémicos 19% y fluoroquinolonas 14%; sin embargo, para 2010 aumentaron las tasas de resistencia documentándose; ceftazidima 46%, amikacina 24%, carbapenémicos 24% y fluoroquinolonas 32%. En el 2012, el aumento de la resistencia continuó reportándose ceftazidima 62%, amikacina 56%, carbapenémicos 58% y fluoroquinolonas 48%. Aunque en 2014, se observa una aparente disminución en la resistencia, se deja de reportar ceftazidima y se encontraron las siguientes frecuencias; amikacina 21%, carbapenémicos 30% y fluoroquinolonas 23%. Para el 2015, solo se reporta resistencia a carbapenémico en un 35%, se desconoce el motivo no se reportan otros antibióticos.

Cabe señalar que la información respecto a México solo proviene del hospital de Guadalajara, y aunque nos ayuda a darnos una idea de las frecuencias de resistencia, vale la pena señalar otros artículos en donde se documentan distintos valores como el presentado por Ponce de León donde en el año 2018 reportó las siguientes tasas de resistencia: ceftazidima 41%, amikacina 30%, fluoroquinolonas 41% y carbapenémicos 38%. Mientras que López-García y colaboradores reportaron las siguientes frecuencias de resistencia ceftazidima 59%, amikacina 63%, fluoroquinolonas 69% y carbapenémicos 68% ³⁶.

Los estudios de genética de poblaciones de microorganismos de importancia clínica han sido esenciales para comprender y predecir su evolución. Varios autores han informado que *P. aeruginosa* exhibe una estructura de población epidémica no clonal y que gran parte de su variación genética es el resultado de eventos de recombinación. Esta variación ha permitido que algunas cepas se adapten al entorno del hospital y prevailezcan durante largos períodos de tiempo en estos sitios. La importancia de conocer la diversidad clonal radica en que dentro de cada complejo clonal, se agrupan secuencias tipo (ST). Hay informes de clonas de alto riesgo de *P. aeruginosa* que circulan en hospitales de todo el mundo, que presentan características genéticas específicas (ST111, ST235 y ST175) relacionadas con el fenotipo MDR o XDR ^{3,17, 28}.

En un estudio realizado en pacientes pediátricos mexicanos se reportó una alta frecuencia de la clona ST1725 (56.89%), además de que se encontró la clona ST233 (3.44%) reportada en otras regiones como de alto riesgo por su perfil de resistencia a antibióticos presentando un fenotipo MDR o XDR (17). Otro estudio realizado en el hospital pediátrico del Centro Médico Nacional en la Ciudad de México reporta la clona ST309 como de alto riesgo por presentar fenotipos de MDR y XDR ³.

La prevalencia creciente de esta clona complica el panorama clínico, limita las opciones terapéuticas y tiene un impacto significativo en la morbilidad y la mortalidad ^{3,13,17}.

3. Justificación

Las infecciones asociadas al cuidado de la salud son un grave problema de salud pública, *P. aeruginosa* es uno de los principales agentes causales.

Las infecciones asociadas a este patógeno generalmente provocan cuadros clínicos graves como: neumonías, infecciones óseas y articulares, necrosis, bacteriemia y en ocasiones, la muerte. Esto trae como consecuencia estancias hospitalarias prolongadas; además que el paciente es sometido a tratamientos largos con antibióticos que pueden tener efectos secundarios a la salud.

En México, se reporta resistencia a carbapenémicos hasta el 35%. La resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* está dada por tres mecanismos: expresión de bombas de eflujo, producción de carbapenemasas y pérdida de porinas en la membrana externa.

Actualmente, la información que se tiene del microorganismo en México es limitada y aún más en pacientes pediátricos.

Con este trabajo se conocerán los patrones clonales, el perfil de resistencia y la frecuencia de aislamientos de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas que causan infecciones en pacientes pediátricos, lo que proporcionará información epidemiológica en el INP.

4. Hipótesis

Los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos de muestras clínicas del INP tendrán una baja diversidad clonal.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

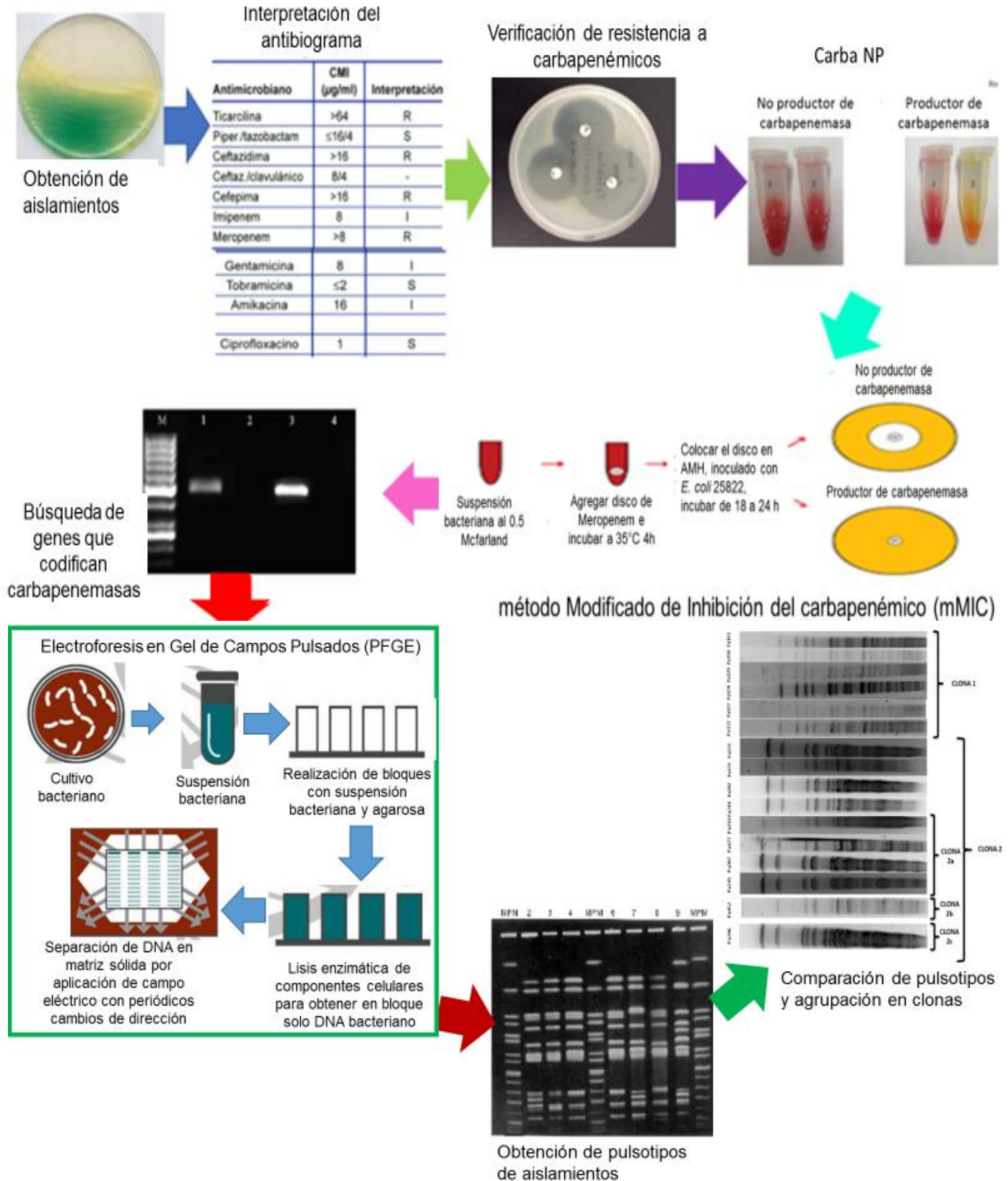
Determinar los patrones clonales en aislamientos de *P. aeruginosa* de muestras clínicas de pacientes del INP.

5.2. Objetivos particulares

- ❖ Determinar el perfil de susceptibilidad a antibióticos
- ❖ Detectar fenotípicamente la producción de carbapenemasas
- ❖ Describir la frecuencia de carbapenemasas
- ❖ Establecer el patrón clonal de cada aislamiento

6. Material y métodos

6.1 Diagrama de flujo



Tipo de estudio

Descriptivo, transversal, retrospectivo

6.2. Selección de aislamientos

Se obtuvieron 60 aislamientos de pacientes pediátricos hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría con infección por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, durante el periodo de enero del 2017 a abril del 2018.

Criterios de inclusión

Aislamientos puros de *P. aeruginosa* con perfil de susceptibilidad intermedio o resistente a carbapenémicos

Criterios de exclusión

Aislamientos de *P. aeruginosa* sensibles a los carbapenémicos.

Criterios de eliminación

Aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística

6.3. Identificación y perfil de susceptibilidad

Los aislamientos fueron identificados por el equipo semiautomatizado Phoenix (Becton Dickinson). Con el mismo equipo se obtuvieron los perfiles de susceptibilidad a antibióticos. Los valores de CIM se interpretaron siguiendo los lineamientos del CLSI 2019 ³³.

Tabla 4. Interpretación de los valores del método de difusión en disco y CMI

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Categoría interpretativa y puntos de corte para difusión en disco (mm)			Categoría interpretativa y puntos de corte para CMI (µg/mL)		
		S	I	R	S	I	R
Penicilinas							
Piperacilina	100 µg	≥21	15-20	≤14	≤16	32-64	≥128
Betalactámico / Inhibidor de Betalactamasa							
Piperacilina/ Tazobactam	100/10 µg	≥21	15-20	≤14	≤ 16/4	32/4 – 64/4	≥128/4
Ticarcilina/ Clavulanato	75/10 µg	≥24	16-23	≤15	≤ 16/2	32/2 – 64/2	≥128/2
Cefalosporinas							
Ceftazidima	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
Cefepime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
Carbapenémicos							
Imipenem	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8
Meropenem	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8
Lipopéptidos							
Colistina	No aplica. Colistina no difunde en disco				≤2	-----	≥4
Aminoglucósidos							
Gentamicina	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
Amikacina	30 µg	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
Fluoroquinolonas							
Ciprofloxacino	5 µg	≥25	19-24	≤18	≤0.5	1	≥2
Levofloxacino	5 µg	≥22	15-21	≤14	≤1	2	≥4

Tomado de CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

6.3. Detección de carbapenemasas

Se realizó la detección fenotípica de carbapenemasas mediante la prueba de Carba NP y el método modificado de inhibición del carbapenémico (mMIC) de acuerdo a las especificaciones del Instituto de Estandarización de Laboratorio Clínicos (CLSI 2019).

6.3.1. Carba NP

Es una prueba que evidencia la presencia de carbapenemasas. Se basa en un cambio de color del indicador rojo neutro por acidificación del medio debido a la hidrólisis del carbapenémico por acción de carbapenemasas las cuales son

liberadas de la bacteria al someterse a lisis. A partir de un cultivo puro en medio agar Mueller- Hinton (AMH), se tomó una asada de la bacteria, se colocó en una solución de lisis bacteriana, y se incubó por un periodo de 30 min. a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la lisis. Posteriormente, se centrifugó y del sobrenadante se tomaron 30 μ L y se colocaron en una solución que contenía el indicador rojo neutro y el imipenem. Se incubó a 37°C por 2 h. Un cambio de coloración de rojo a amarillo nos indicó presencia de carbapenemasas. Se utilizó como control positivo *K. pneumoniae* ATCC 700603 y como control negativo *E. coli* ATCC 25922.

6.3.2. Método modificado de inhibición al carbapenémico (mMIC)

Esta prueba permite demostrar la producción de carbapenemasas, por inactivación de un carbapenémico, la cual se observa por el crecimiento de una bacteria susceptible en un medio que contiene el disco con el meropenem previamente expuesto a la bacteria a evaluar.

Para el procedimiento se sometió a la bacteria a crecimiento en medio digerido de soya y caseína (TSB), que contenía un disco del carbapenémico meropenem (10 μ g) a 37°C durante 4 h; transcurrido el tiempo, se realizó la inoculación masiva de una placa de AMH con *E. coli* ATCC 25922 la cual tiene la característica de ser susceptible a carbapenémicos, se colocó el disco de meropenem, y se incubó a 37°C por 24h. Al término de la incubación se midió el halo de inhibición. La producción de carbapenemasas se interpretó cuando el halo de inhibición fue entre 6 y 15mm o existió presencia de colonias en un halo <19mm, mientras que se consideró como no productora de carbapenemasas cuando existió un halo de inhibición \geq 19mm. Se utilizó como control positivo *K. pneumoniae* ATCC 700603 y como control negativo *E. coli* ATCC 25922.

6.3.3. Búsqueda de genes que codifican carbapenemasas

Se realizó la extracción de DNA de todas las cepas de *P. aeruginosa*, posteriormente se realizó una amplificación, de fragmentos de los genes que codifican para los genes de carbapenemasas (KPC, GES, IMP, VIM, NDM y OXA)₈. Se realizó la mezcla de reacción de la tabla 5, para llevar a cabo la amplificación de IMP, VIM y KPC:

Tabla 5. Mezcla de reacción para multiplex PCR de IMP,VIM y KPC

Componente	1X
Agua	3.5µL
Master mix	12.5 µL
IMP Directo	1 µL
IMP Reverso	1 µL
VIM Directo	1 µL
VIM Reverso	1 µL
KPC Directo	1 µL
KPC Reverso	1 µL
DNA	3 µL
Volumen final	25 µL

Se colocó la mezcla en microtubos y posteriormente se realizó la amplificación, en un termociclador, bajo las condiciones indicadas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones para llevar a cabo PCR multiplex de IMP,VIM y KPC

Temperatura (°C)	Tiempo	
95	2 min	
95	15 seg	
52	30 seg	35 ciclos
72	1 min	
72	7 min	

Para la amplificación de GES, OXA- 48 y NDM se realizó la mezcla de reacción de la tabla 7.

Tabla 7. Mezcla de reacción para PCR de GES, OXA-48 y NDM

Componente	1X
Agua	8.5µL
Master mix	12.5 µL
Directo	1 µL
Reverso	1 µL
DNA	2 µL
Volumen final	25 µL

Se colocó el cebador directo o reverso dependiendo el gen que se deseaba amplificar.

Posteriormente, se colocó la mezcla de reacción en microtubos y se realizó la amplificación, bajo las condiciones de la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones para llevar a cabo PCR multiplex de GES, OXA-48 y NDM

Temperatura (°C)	Tiempo	
95	2 min	
95	15 seg	
52	30 seg	35 ciclos
72	30 seg	
72	7 min	

6.4. Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Mediante este procedimiento con alto poder discriminatorio que permite comparar y relacionar el material genético de una determinada especie bacteriana para determinar si guardan una relación clonal ^{25,26,30}.

6.4.1. Extracción de DNA

Cada una de las cepas de *P. aeruginosa* se sembró en caldo infusión- cerebro-corazón (BHI) y se incubaron a 37°C por 18 -22 h. De cada tubo se extrajo una alícuota de 150 µL y se colocó en microtubos. Se obtuvo el concentrado bacteriano

a través de centrifugación y se adicionó una solución NaCl-EDTA (NaCl 75mM, EDTA 25mM). A continuación se incubaron los microtubos a 50°C. Posteriormente, se prepararon los bloques con agarosa al 1%, para lo cual se tomó una alícuota de 150µL de agarosa al 1% y se vierte dentro del microtubo que se encontraba a incubación y se mezcla, luego se tomó una alícuota de este microtubo y se colocó en un molde especial, se dejó enfriar para que gelificará la agarosa y así obtener un bloque bacteriano, se realizaron dos bloques por aislamiento. Realizados los bloques se colocaron en microtubos y se sometieron a lisis de pared celular con una disolución de lisozima (Tris 6mM, NaCl 1M, EDTA 0.1M, Brij58 0.5%, Desoxicolato de sodio 0.4%, Sarkosyl 0.5% y 20µL de Lisozima a 50mg/mL), a 37°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se cambió la solución de lisozima por una solución de proteinasa K (EDTA 0.5M, Sarkosyl al 1%; pH 9.0 y 25µL de Proteinasa K a 20mg/mL), para realizar la lisis de membrana celular y demás componentes celulares que contengan proteína, esta disolución se incubó a 50°C por 22 h. Posteriormente, se realizaron seis lavados con TE1X (Tris 0.5 mM, EDTA 0.5mM; pH 7.5) y tres lavados con TE0.1X (Tris 0.05 mM, EDTA 0.05mM; pH 7.5), esto con la finalidad de remover todos los residuos de los componentes celulares y de las disoluciones de lisis. Por último, se colocaron los bloques en TE0.1X y se conservaron a 4°C, para su posterior utilización.

Del mismo modo se realizó la extracción de DNA a la especie, *Salmonella entérica* subespecie Enterica serovar *Braenderup* ATCC BAA-664, la cual se utilizó como marcador de talla molecular ³¹.

6.4.2. Restricción de DNA

Para realizar la digestión del DNA contenido en el bloque de agarosa, se utilizó la enzima de restricción, Spe I, que reconoce dos secuencia CTAGT y TGATC, en donde realizó el corte del DNA. Mientras que para *S. entérica* subespecie Enterica serovar *Braenderup* ATCC BAA-664 se utilizó la enzima XbaI, la cual reconoció los sitios CTAGA y AGATC. Se colocó en un microtubo la mezcla de reacción que contenía XbaI o SpeI, dependiendo la especie bacteriana a digerir, y se colocó la

mitad de un bloque de agarosa dentro de la mezcla y se sometieron los microtubos a incubación por 37°C, en agitación constante por 22 h.

6.4.3. Electroforesis

Una vez digerido el DNA bacteriano, se preparó una solución amortiguadora TBE 5X de la cual se realiza una dilución 1:10, obteniendo una solución amortiguadora TBE 0.5X.

Se utilizó el equipo de campos pulsados CHEF DRIII con las siguientes condiciones de corrimiento electroforético; 6 V/cm, pulsos de 5s a 40s, por 21 h a 14°C.

Después de llevarse a cabo el corrimiento se reveló el gel con Bromuro de etidio (10mg/mL) y fotografiado bajo luz ultravioleta.

Los fragmentos de patrones de DNA generados por PFGE, fueron interpretados con base en los lineamientos de Tenover ³².

7. Resultados

Se analizaron 105 aislamientos de *P. aeruginosa*.

En la figura 4, se observa el número de aislamientos reportados con resistencia a carbapenémicos de enero 2017 a abril de 2018. El mayor número de aislamientos se obtuvieron en enero del 2018.

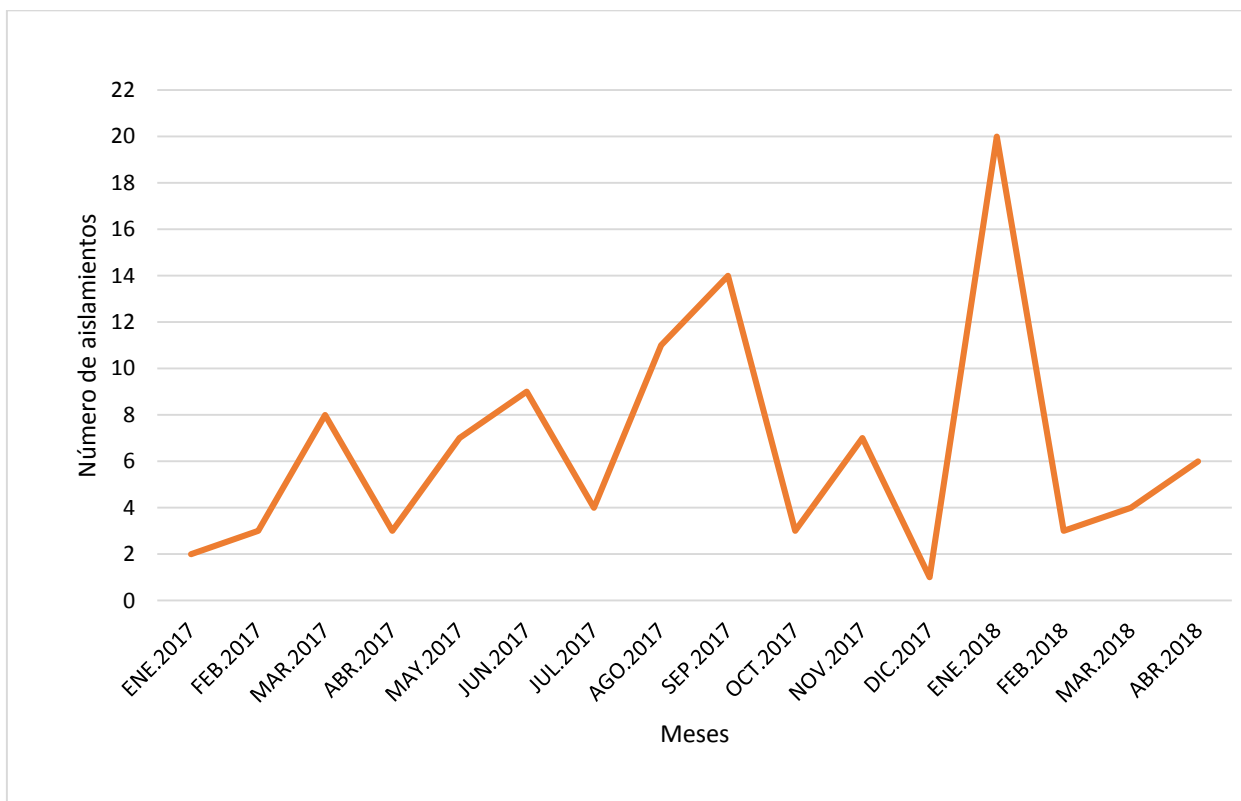


Figura 4. Frecuencia de aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos durante el periodo de enero de 2017 a abril 2018.

En la figura 5, se observa la distribución de los aislamientos de acuerdo al tipo de muestra. Las muestras más frecuentes son las obtenidas de vías respiratorias Bajas (VRB) con un 43%, en las cuales se agruparon aspirados bronquiales y traqueales, al igual que líquido bronquioalveolar; con un 17% tenemos las muestras de hemocultivos, mientras que con 12% se encuentran las muestras de secreción intraabdominal y orina. Entre las menos frecuentes tenemos secreciones de herida con 9%; con un 5% observamos las muestras clasificadas como otras, en las que se incluyen secreciones diferentes a la de herida o intraabdominal, muestras de líquido cefalorraquídeo y de exudado ocular y ótico; por último, con 2% las que provienen de líquido peritoneal.

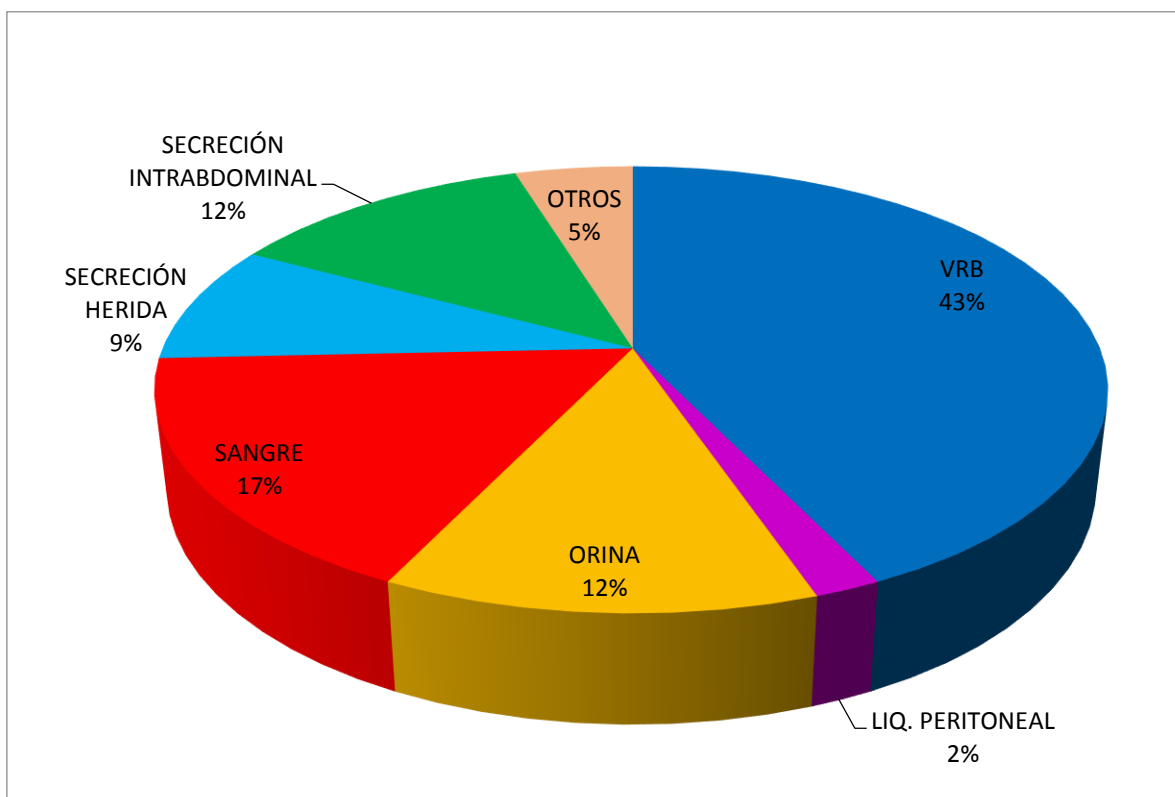


Figura 5. Frecuencia de aislamientos de *P. aeruginosa* por tipo de muestra

En la figura 6, se observa el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *P. aeruginosa*. Para la cefalosporina ceftazidima, el 51% de los aislamientos son sensibles, el 10% presenta susceptibilidad intermedia y el 39% son

resistentes; mientras que para cefepime se encontró que el 46% son sensibles, el 16% presentan sensibilidad intermedia y el 38% son resistentes. En el caso de los carbapenémicos, para meropenem se obtuvo una sensibilidad de 1%, el 9% presentó una sensibilidad intermedia y el 90% resistencia; mientras que en el caso de imipenem el 4% fue sensible, el 2% presentó susceptibilidad intermedia y el 94% fue resistente. Para la combinación betalactámico/inhibidor de betalactamasa como fue en el caso de piperacilina/tazobactam se observó una susceptibilidad de 46%, el 30% presentó susceptibilidad reducida y el 24% fue resistente. Para las fluoroquinolonas, el ciprofloxacino presentó sensibilidad de 53%, el 12% presento sensibilidad intermedia y el 35% fue resistente, por otro lado, el levofloxacino fue 45% sensible, 10% se con sensibilidad intermedia y 45% presenta resistencia. Por último, el perfil de susceptibilidad de los aminoglucósidos fue para la amikacina el 69% fue sensible, el 7% presenta sensibilidad reducida y el 24% fue resistente, por otra parte para la gentamicina el 55% de los aislamientos fue susceptible, el 9% presento susceptibilidad intermedia y el 36% fue resistente.

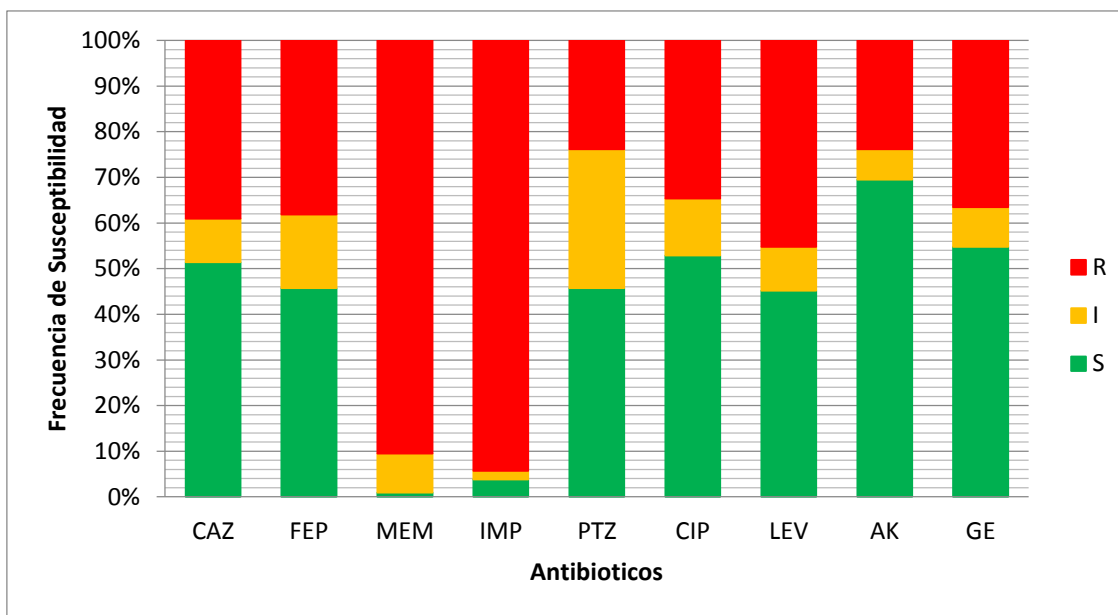


Figura 6. Perfil de susceptibilidad de los aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. R: resistente, I: intermedio, S: sensible.

En la figura 7, observamos los aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, de los cuales, el 16.19% (n=17) presenta resistencia por producción de carbapenemasas, mientras que en el 83.81% (n=88) la resistencia se debe a otro mecanismo.

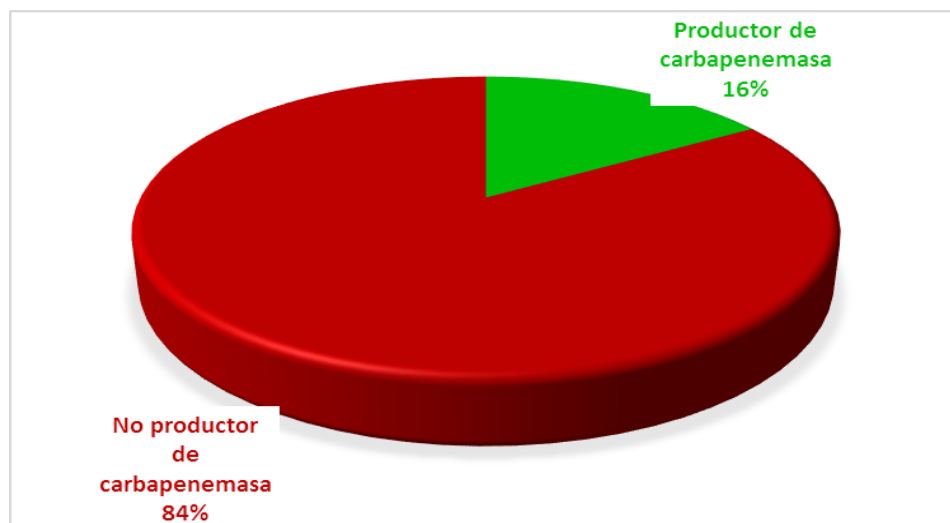


Figura 7. Aislamientos de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas

En la figura 8, se muestran los resultados obtenidos para la prueba de carba NP y mMIC. Para la prueba Carba NP y mMIC, el 16.19% (n= 17) dio positiva mientras que el 83.81% (n=88) fue negativa.

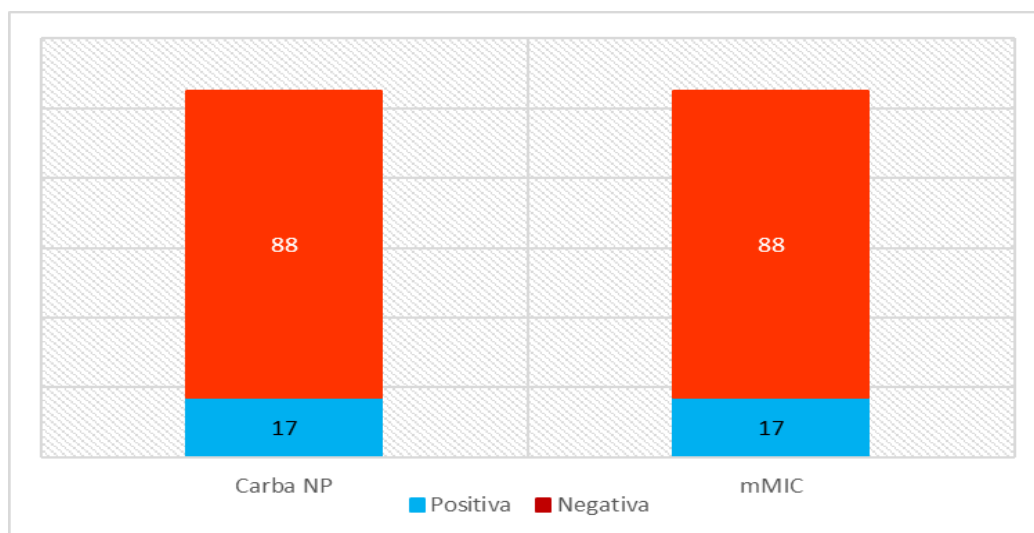


Figura 8. Resultados de las pruebas fenotípicas Carba NP y mMIC para la detección de carbapenemasas.

En la figura 9, observamos las carbapenemasas presentes en los aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos por mes, durante el periodo de enero 2017 a abril de 2018. Se encontraron dos tipos de carbapenemasas, VIM e IMP. En el caso de VIM se encontró en un aislamiento de mayo y de noviembre del 2017. Por otro lado IMP estuvo presente en un aislamiento en los meses de junio, agosto y noviembre de 2017 y en cuatro aislamientos en el mes de septiembre del mismo año, también se encontró en siete aislamientos de enero y en un aislamiento de abril del 2018. Cabe destacar que las dos carbapenemasas encontradas en el mes de noviembre 2017, están presentes en el mismo aislamiento.

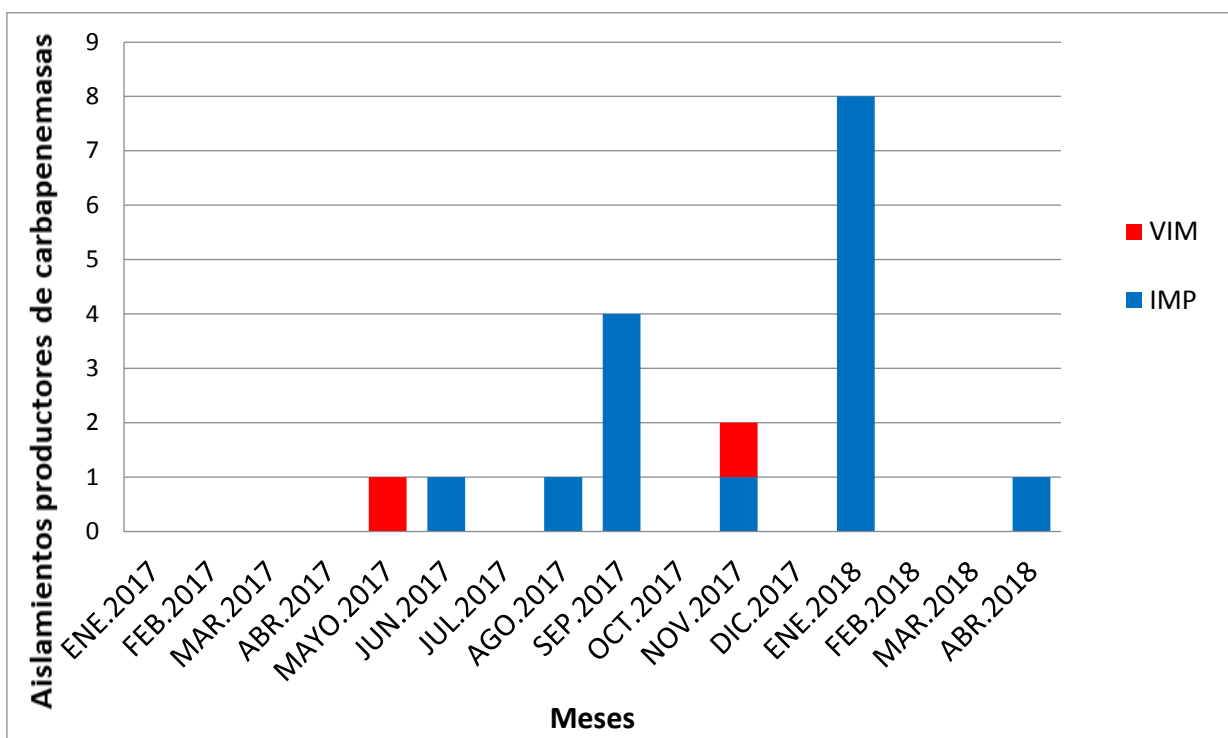


Figura 9. Carbapenemasas encontradas en aislamientos resistentes a carbapenémicos durante el periodo de enero 2017 a abril 2018.

En la tabla 9 se muestra que los aislamientos de *P. aeruginosa* se distribuyeron de la siguiente manera: seis pertenecen a la clona 1; diez, a la clona 2 aunque seis de ellos fueron cercanamente relacionados; cuatro a la clona 3; en las clonas 4, 5, 7 y 10 se agruparon tres aislamientos y en las clonas 6, 8, 9 y 11 se agruparon dos

aislamientos en cada una. Veintiséis aislamientos no estuvieron relacionados; mientras que en cuarenta aislamientos no se les realizó campos pulsados o existieron problemas en la tipificación por campos pulsados.

Se observó la producción de carbapenemasas en 10 aislamientos que se agruparon en la clona 2;2 que no tuvieron relación clonal y en 5 que no se pudieron tipificar.

Tabla 9. Distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa*

Clonas	Numero de Aislamientos	Aislamientos productores de Carbapenemasas	
		Numero de aislamientos	Fecha y total de aislamientos
Clona 1	6	Ninguna	No aplica
Clona 2	10	10 (todas IMP)	Un aislamiento junio (2017) Dos aislamientos septiembre (2017) Seis aislamientos enero (2018) Un aislamiento abril (2018)
Clona 3	4	Ninguna	No aplica
Clona 4	3	Ninguna	No aplica
Clona 5	3	Ninguna	No aplica
Clona 6	2	Ninguna	No aplica
Clona 7	3	Ninguna	No aplica
Clona 8	2	Ninguna	No aplica
Clona 9	2	Ninguna	No aplica
Clona 10	3	Ninguna	No aplica
Clona 11	2	Ninguna	No aplica
Sin relación clonal	26	2(1 IMP,1 VIM)	Un aislamiento mayo (2017) VIM Un aislamiento agosto (2017) IMP
No tipificación	40	5(4 IMP, 1IMP/VIM)	Dos aislamientos septiembre (2017) IMP Un aislamiento noviembre (2017) IMP/VIM Dos aislamientos enero (2018) IMP

En la figura 10 observamos los pulsotipos que permitieron la agrupación seis aislamientos dentro de la clona 1 y diez aislamientos en la clona 2.

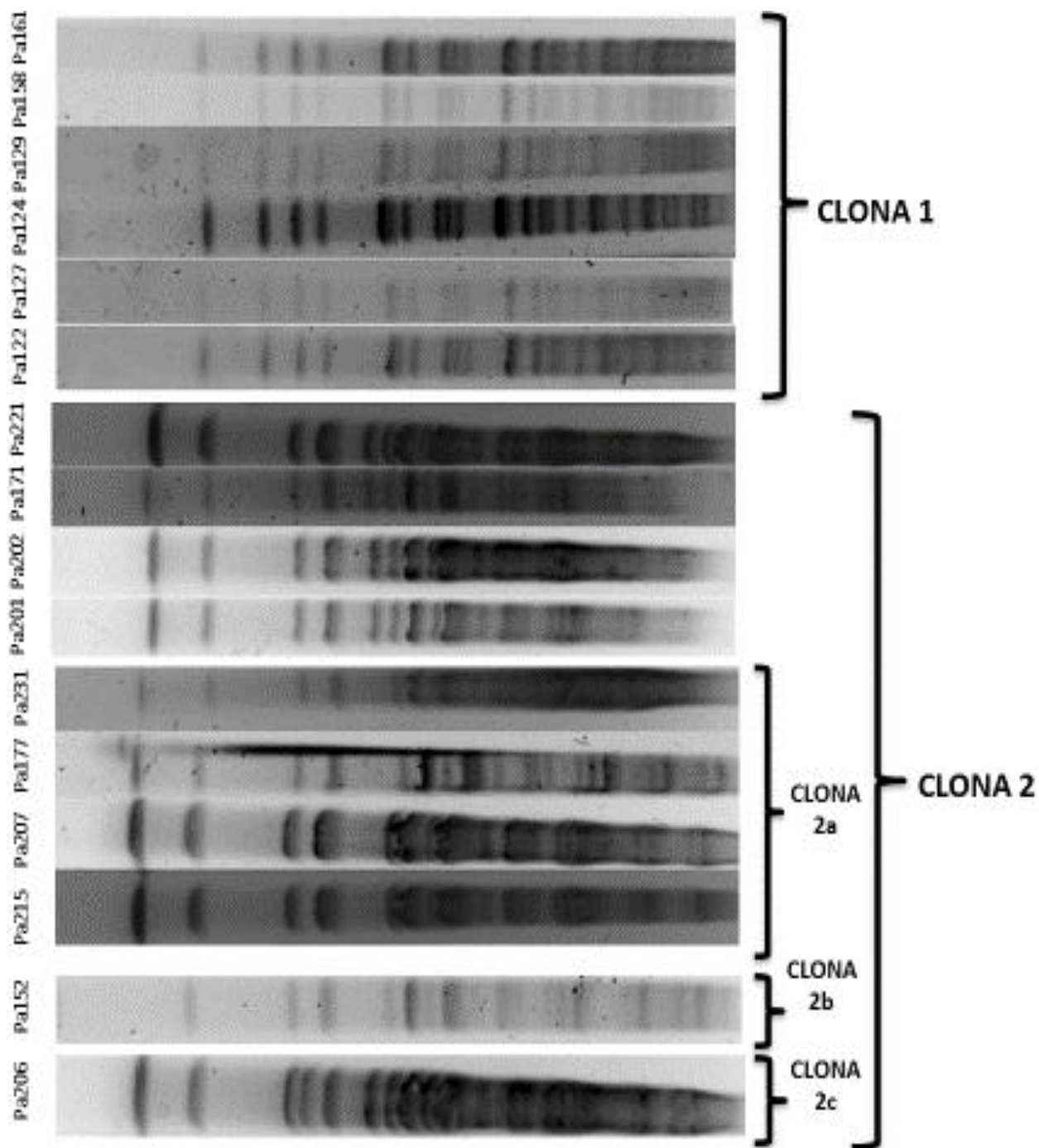


Figura 10. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de *P. aeruginosa* agrupados en clona 1 y 2.

En la figura 11 observamos los pulsotipos que permitieron agrupar los aislamientos de *P. aeruginosa* de la siguiente manera: con cuatro aislamientos a la clona 3, con 3 aislamientos a la clona 4, con tres aislamientos a la clona 5 y con 2 aislamientos a la clona 6.

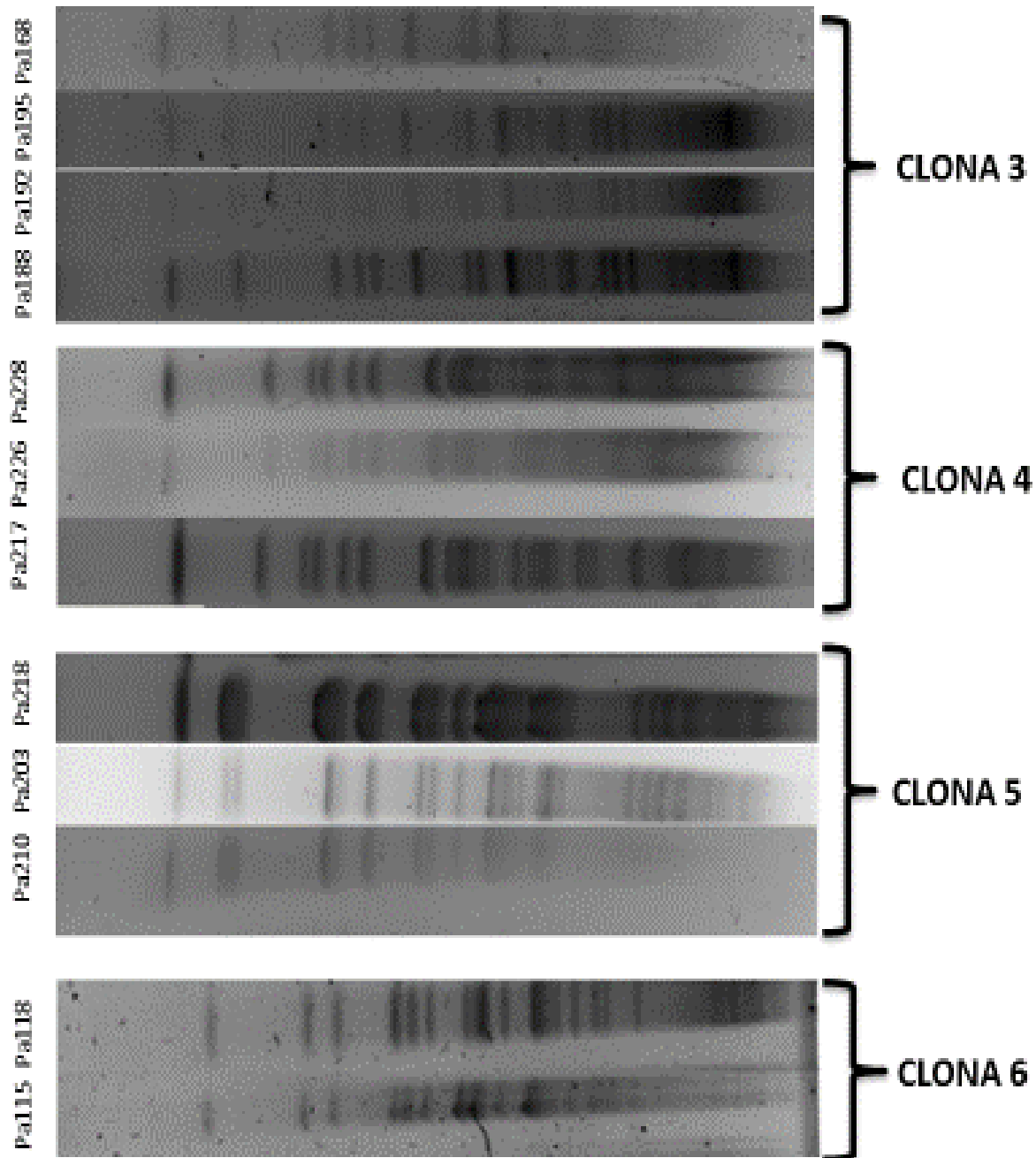


Figura 11. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de *P. aeruginosa* agrupados dentro de las clonas 3, 4, 5 y 6.

En la figura 12 podemos observar que en la clona 7 se agruparon tres aislamientos, en la clona 8 dos aislamientos, en la clona 9 dos aislamientos, en la 10 tres aislamientos y en la clona 11 dos aislamientos.

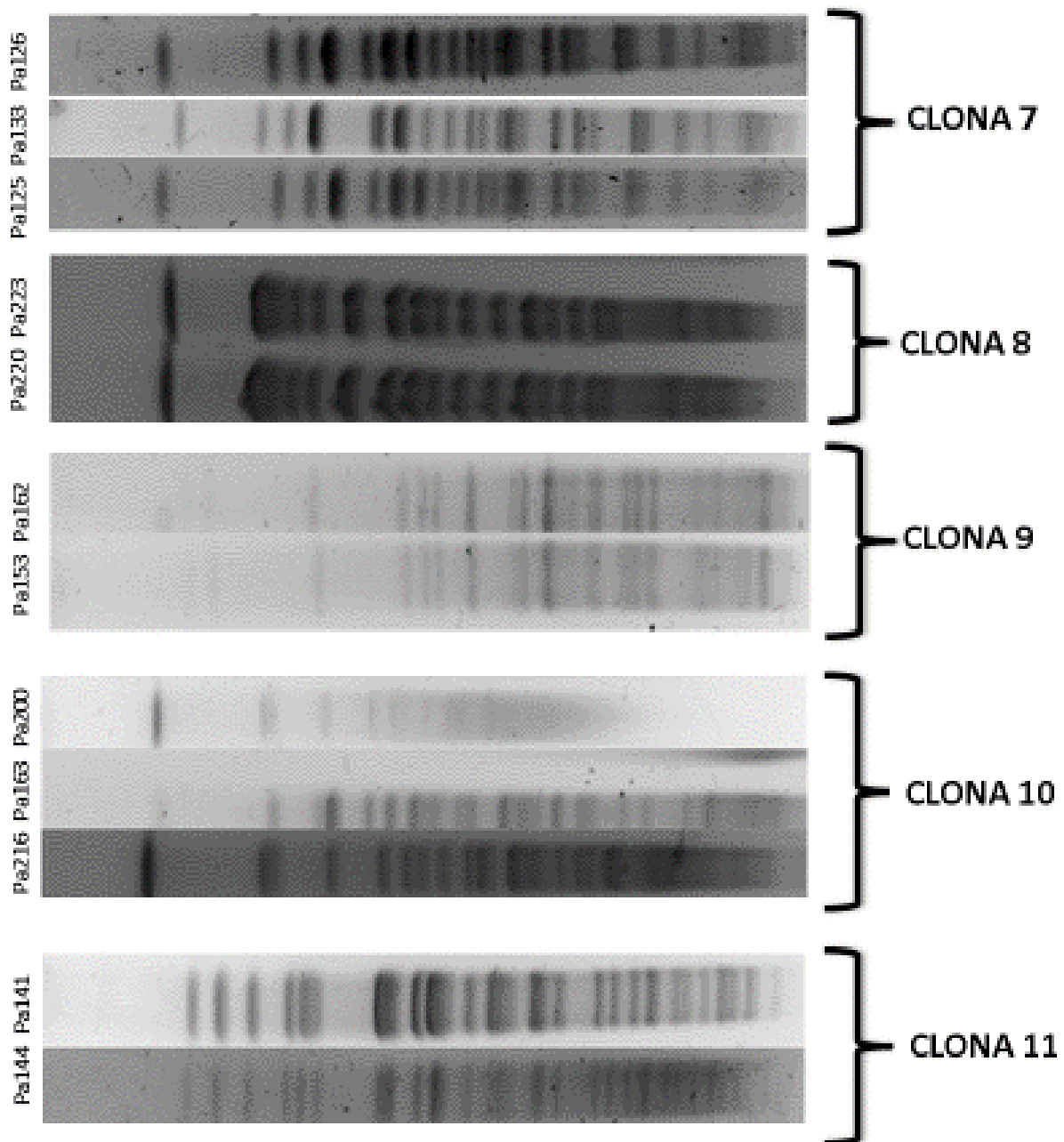


Figura 12. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de *P. aeruginosa* que se distribuyeron en las clonas 7, 8, 9, 10 y 11.

En la figura 13, se muestran los pulsotipos de los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, que no fueron agrupados en ninguna clona.

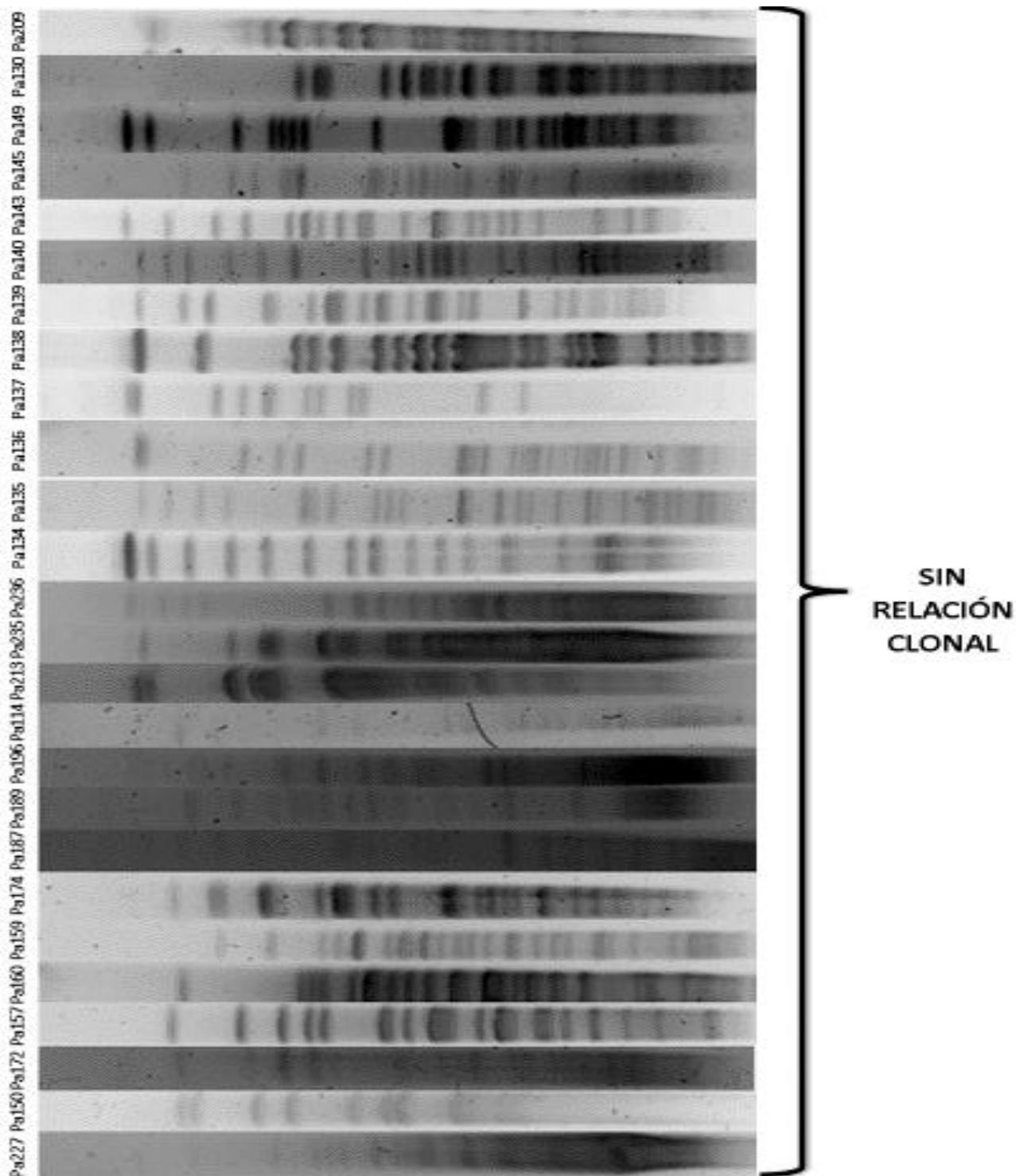


Figura 13. Electroforesis en gel por campos pulsados de los aislamientos de *P. aeruginosa* no agrupados.

8. Discusión de resultados.

Los rangos de aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos durante el período de enero 2017 a abril 2018, fue de dos a ocho aislamientos por mes; sin embargo, en agosto y septiembre del 2017 y enero 2018 se observa un incremento en la frecuencia lo cual nos sugiere la presencia de un brote. Por este motivo, la vigilancia de este microorganismo es importante, ya que cuando se aísla un cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos se deben tomar ciertas medidas como el lavado de manos, restringir el contacto del paciente, uso de guantes, bata exclusiva para la revisión del paciente ³⁴.

El mayor número de muestras fueron de vías respiratorias bajas, lo cual era un resultado esperado ya que las neumonías por *P. aeruginosa*, son la primera o segunda causa de infecciones asociadas al cuidado de la salud en pacientes pediátricos ^{7,35}.

Haber aislado *P. aeruginosa* en muestras de sangre, orina y secreciones también era esperado; puesto que este microorganismo también está asociado a bacteriemia, infecciones intrabdominales y asociadas a cirugía y del tracto urinario ^{3,13, 15, 36}.

En un trabajo realizado en 300 hospitales de atención a pacientes pediátricos en EE.UU. durante un periodo de 1999 a 2012 se aislaron 77,349 *P. aeruginosa*, las muestras del tracto respiratorio encabezaron los resultados con una frecuencia del 61.49%, seguido de este resultado se encontraron las muestras de orina con un 19.86%, las obtenidas de secreción de herida con 15.35% y por último las muestras de sangre y piel con 2.71% y 0.59%, respectivamente ⁴. Estos resultados son muy similares a los nuestros, pues también obtuvieron alta frecuencia para las muestras de vías respiratorias, orina y secreción de herida; aunque existen pequeñas diferencias en cuanto a los valores como los de muestras sanguíneas; lo cual era esperado pues la frecuencia de muestras dependerá de la zona geográfica, la patología de base y el tipo de población cada hospital.

Es muy importante realizar una interpretación correcta del antibiograma para obtener el perfil de susceptibilidad, considerando la eliminación de los antimicrobianos a los que *P. aeruginosa* es resistente intrínsecamente, ordenarlos

por familias, observar los métodos sugeridos para la determinación de susceptibilidad en el CLSI ³³. Esto con la finalidad de utilizar las primeras líneas de tratamiento, optimizar combinaciones de antimicrobianos de utilidad para aumentar el éxito terapéutico y minimizar el uso de antimicrobianos de última línea como carbapenémicos y colistina, así como los de rescate como la piperacilina/tazobactam.

Cabe destacar que a pesar de que el 90% de los aislamientos de *P. aeruginosa* presentan resistencia a uno o ambos carbapenémicos, aún poseen sensibilidad a cefalosporinas de tercera (51%) y cuarta generación (46%); y a piperacilina/tazobactam (46%).

En esta colección se observó que el 53% fueron sensibles para ciprofloxacina y 45% para levofloxacina debe considerarse que el uso de fluoroquinolonas en edad pediátricas es restringido debido a su asociación con efectos adversos musculoesqueléticos como artritis, artropatía, tendinopatía; otros eventos adversos asociados con las fluoroquinolonas incluyen trastornos del sistema nervioso central, fotosensibilidad, trastornos de la homeostasis de la glucosa, prolongación del intervalo QT con casos raros de arritmia ventricular letal, disfunción hepática y erupciones cutáneas ^{37,38}.

A pesar de que los aminoglucósidos son los que presentan mayor susceptibilidad contra *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, su uso debe ser vigilado ya que frecuentemente se presentan fallas terapéuticas y no se deben usarse en monoterapia ^{41,42}.

La producción de carbapenemasas se presentó en el 16.2% de los aislamientos, lo que nos indica que no es el principal mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos; sin embargo, la vigilancia de este mecanismo es indispensable en los hospitales debido a su fácil diseminación por medio de plásmidos, su detección oportuna permite tomar las medidas de control de infecciones para evitar brotes ³⁴. La frecuencia encontrada de carbapenemasas en este trabajo es similar a la de un estudio realizado en 26 centros médicos en seis ciudades de América Latina en donde monitorearon 750 *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos de 2012

a 2015, reportaron la resistencia por producción de carbapenemasas en 110 aislamientos que representan el 14.7% ⁸.

Sin embargo, la frecuencia en este trabajo es muy parecido a un trabajo realizado en 202 centros médicos en 40 ciudades de varias partes del mundo en donde incluyeron 2139 *P. aeruginosa* resistencia a carbapenémicos aisladas de 2012 a 2014, solo se encontró la producción de carbapenemasas en 308 aislamientos observando una frecuencia de 14.4% ⁶.

Al realizar la comparación de las frecuencias de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas con otros trabajos, se observa que a nivel local, América Latina y a nivel global, este no es principal mecanismo involucrado en la resistencia a carbapenémicos y se deben revisar otros mecanismos ³⁴.

La prueba de Carba NP tiene una sensibilidad mayor al 90% para la mayoría de las carbapenemasas; las enzimas difíciles de detectar son principalmente las familias GES y OXA-48; es por ello que la Carba NP se usó conjuntamente con la prueba mMIC ya que esta presenta sensibilidad mayor al 98% para la detección de todas las carbapenemasas a excepción de OXA-181 ^{33,39}.

La carbapenemasa más frecuente fue IMP con el 88.9%, en otros estudios como el presentado por López-García y colaboradores encontraron 24 aislamientos productores de carbapenemasas, en los cuales IMP se presentó una frecuencia del 70.83% ¹². Este no es el único reporte sobre el hallazgo en mayor frecuencia de IMP, pues en el trabajo presentado por Garza-Ramos y colaboradores mencionan la existencia de clonas de *P. aeruginosa* portadora de variantes de la carbapenemasa IMP, como endémicas de un Hospital Universitario de Nuevo León ⁴⁰.

Aunque en este estudio solo se encontró la presencia de las carbapenemasas IMP y VIM, no se debe dejar de vigilar este mecanismo de resistencia, pues si bien México no es endémico, podría existir la introducción de una nueva enzima, para evitar su diseminación y tomar las medidas de control de infecciones adecuadas para evitar brotes epidemiológicos.

Los aislamientos de *P. aeruginosa* se agruparon en un gran número de clonas y muchos aislamientos se clasificaron como no relacionado, lo cual era un resultado esperado ya este microorganismo posee un genoma con mucha plasticidad ²⁹.

De los diecisiete aislamientos de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas, diez se agruparon en la clona 2 y seis de ellos fueron aislados en el mes de enero 2018, lo que nos indica que el incremento en el número de aislamientos de este mes fue debido a la transmisión de un paciente a otro.

9. Conclusiones

La resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* limita las opciones terapéuticas; sin embargo, aún se observan aislamientos con sensibilidad a antibióticos de primera elección como cefalosporinas de tercera y cuarta generación, ceftazidima y antibióticos de rescate como piperacilina/tazobactam.

La producción de carbapenemasas se observó en 16% de los aislamientos, lo que señala que este no es el principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos en los aislamientos del INP.

Entre los aislamientos se observó una baja clonalidad; sin embargo, aquellos que eran productores de carbapenemasas se agruparon en una clona.

10. Perspectivas

La producción de carbapenemasas se detectó en el 16% de los aislamientos, lo que señala que el resto tienen un mecanismo de resistencia diferente; por lo que esta tesis abre una línea de investigación para estudiar mecanismos como sobreexpresión de bombas de eflujo y disminución en la producción de porinas.

Por otra parte, podrían utilizarse otras técnicas de tipificación que permitan el análisis epidemiológico de los aislamientos y realizar comparaciones de estos a nivel regional, nacional y global.

11. Referencias

1. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7 :39.
2. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:1–20.
3. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodríguez C, et al. Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol.* 2017; 8 :313.
4. Logan LK, Gandra S, Mandal S, Klein EY, Levinson J, Weinstein RA, et al. Multidrug- and Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Children, United States, 1999-2012. *J Pediatr Infect Dis Soc.* 2017; 6 :352–9.
5. Ullah W, Qasim M, Rahman H, Jie Y, Muhammad N. Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. *J Chin Med Assoc JCMA.* 2017; 80 :173–7.
6. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:1067–78.
7. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Flamm RK. Frequency and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria isolated from patients with pneumonia hospitalized in ICUs of US medical centres (2015-17). *J Antimicrob Chemother.* 2018;73 :3053–9.
8. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Bouchillon SK, de Jonge BLM, Stone GG, Sahm DF. In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against Clinical Isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Collected in Latin American Countries: Results from the INFORM Global Surveillance Program, 2012-2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63:e01814-18.
9. Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Taherikalani M, Jabalameli F, Emaneini M. Determination of carbapenem resistance mechanism in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, in Tehran, Iran. *J Epidemiol Glob Health.* 2017; 7:155-159.
10. Zhang Y, Chen X-L, Huang A-W, Liu S-L, Liu W-J, Zhang N, et al. Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerg Microbes Infect.* 2016; 5 :e27.
11. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context.* 2018; 7 :212527.
12. López-García A, Rocha-Gracia R del C, Bello-López E, Juárez-Zelocualtecal C, Sáenz Y, Castañeda-Lucio M, et al. Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in

carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican Hospital. *Infect Drug Resist.* 2018; 11 :1523-1536.

13. Kim HS, Park BK, Kim SK, Han SB, Lee JW, Lee D-G, et al. Clinical characteristics and outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in febrile neutropenic children and adolescents with the impact of antibiotic resistance: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2017; 17:500.

14. Rossi Gonçalves I, Dantas RCC, Ferreira ML, Batistão DWDF, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Braz J Microbiol.* 2016; 48:211-217.

15. Dantas RCC, Silva RTE, Ferreira ML, Rossi Gonçalves I, Araújo RF, Campos PA, et al. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. *PloS One.* 2017; 12:e0176774.

16. Lee CH, Su TY, Ye JJ, Hsu PC, Kuo AJ, Kia JH. Risk factors and clinical significance of bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa* resistant only to carbapenems. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017; 50:677-683.

17. Arroyo AEG, Moreno-Espinosa S, Zamboni D de la R, Martínez BL, Castellanos-Cruz M del C, Parra-Ortega I, et al. Identification of extensive drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: New clone ST1725 and high-risk clone ST233. *PloS One.* 2017; 12 :e0172882.

18. Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:1265-1272.

19. Horna G, López M, Guerra H, Saénz Y, Ruiz J. Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2018; 8:16463.

20. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, Sierra P, et al. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:3978-3986.

21. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 2015; 5 :61.

22. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *Biomed Res Int.* 2018; 26:9519718.

23. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee C-R, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci.* 2015; 16 :9654-9692.

24. Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60 :561-588.

25. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010; 10:866-875.
26. López-Canovas L, Martínez Benitez MB, Herrera Isidron JA, Soto EF. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Anal Biochem.* 2019; 573:17-29.
27. Titilayo OA, Samuel AO, David OO, Adewunmi TI. Genetic variations among three major ethnic groups in Nigeria using RAPD. *Mol Biol Res Commun.* 2018; 7:51-58.
28. Schütte UME, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 80:365-380.
29. Grosso-Becerra MV, Santos-Medellín C, González-Valdez A, Méndez JL, Delgado G, Morales-Espinosa R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics.* 2014; 15:318.
30. Azimi L, Alaghebandan R, Asadian M, Alinejad F, Lari AR. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* circulation in a burn hospital, Tehran, Iran. *GMS Hyg Infect Control.* 2019; 14 : Doc 01.
31. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3:59-67.
32. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2233-2239.
33. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
34. Implementation manual to prevent and control the spread of carbapenem-resistant organisms at the national and health care facility level. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/UHC/SDS/2019.6). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
35. Ashkenazi-Hoffnung L, Ari A, Bilavsky E, Scheuerman O, Amir J, Prais D. *Pseudomonas aeruginosa* identified as a key pathogen in hospitalised children with aspiration pneumonia and a high aspiration risk. *Acta Paediatr.* 2016; 105:e588-e592
36. Ponce- de-Leon A, Rodríguez-Noriega E, Morfín-Otero R, Cornejo-Juárez DP, Tinoco JC, Martínez-Gamboa A, et al. Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacilli isolated from intra-abdominal and urinary-tract infections in Mexico from 2009 to 2015. Results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART). *PLoS ONE.* 2018; 13: e0198621.
37. Jackson MA, Schutze GE, Aap committee on infectious diseases. The Use of Systemic and Topical Fluoroquinolones. *Pediatrics.* 2016; 138:e20162706

38. Committee on Infectious Diseases. The Use of Systemic Fluoroquinolones. *Pediatrics*. 2006; 118:1287-92.
39. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71 :274-6.
40. Garza-Ramos U, Barrios H, Reyna-Flores F, Tamayo-Legorreta E, Catalán-Nájera JC, Morfin-Otero R. Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 81 :135-137.
41. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017; 15 :519-526.
42. Phe K, Bowers DR, Babic JT, Tam VH. Outcomes of empiric aminoglycoside monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019; 93 :346-348.
43. The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy. ResistanceMap: Antibiotic resistance. 2019. <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>. Date accessed: Ene 10, 2019.