

Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS EN AISLAMIEN-
TOS CLÍNICOS DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUCTORAS DE
METALOBETALACTAMASAS, HNHU, 2017**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
TECNOLOGIA MEDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

AUTORES

ROSMERI MELANI HUAYHUA MIRANDA

JACKLYN KAREN TORRES LOPEZ

ASESORES

DRA. ROSA ANTONIA GUTIÉRREZ PAUCAR

LIC. TM ROKY GIOVANNI CHAMPI MERINO

JURADOS

- **MORAIMA ANGÉLICA LAGOS CASTILLO**
- **AMPARO JUANA GARAY BAMBAREN**
- **ERNESTO SOTO BRITO**

Lima - Perú

2018

DEDICATORIA

Dedicamos nuestro trabajo de tesis a nuestros padres por el apoyo incondicional y el tiempo brindado, a nuestro estimado asesor de tesis por la paciencia y conocimientos brindados.

ÍNDICE

RESUMEN	04
ABSTRACT	05
INTRODUCCIÓN	06
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.1. Planteamiento del problema.....	07
1.2. Formulación del problema.....	09
1.2.1. Problema general.....	09
1.2.2. Problemas específicos.....	09
1.3. Objetivos.....	10
1.3.1. Objetivo general.....	10
1.3.2. Objetivos específicos.....	10
1.4. Justificación.....	11
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes.....	13
2.2. Bases teóricas.....	18
2.3. Términos básicos.....	26
2.4. Hipótesis.....	27
CAPÍTULO III: MÉTODO	
3.1. Diseño del estudio.....	28
3.2. Población.....	28
3.2.1. Criterios de inclusión.....	28
3.2.2. Criterios de exclusión.....	28
3.3. Muestra.....	28
3.4. Operacionalización de variables.....	29
3.5. Recolección de datos y descripción de los instrumentos.....	31
3.6. Procedimientos, materiales y equipos.....	32
3.7. Análisis de datos.....	33
3.8. Aspectos éticos.....	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
4.1. Resultados.....	34
4.2. Discusiones.....	40
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	53

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno nosocomiales que ocasiona una amplia gama de infecciones como neumonía o bacteriemia. Esto se complica más debido a su resistencia intrínseca a diversos antibióticos y a su notable capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, asociándola a elevados índices de mortalidad y convirtiéndola en un serio problema de salud pública.

Objetivo: En este estudio se determinó la asociación entre los factores de virulencia y la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el HNHU en el 2017.

Materiales y Métodos: El presente trabajo de investigación es un estudio analítico, prospectivo de corte transversal. Para ello se recolectó 120 cepas distribuidas en 40 casos productoras de MBL y 80 controles de cepas no productoras de MBL. Se usó el programa estadístico de acceso libre EpiInfo para el análisis de asociación de acuerdo a la prueba exacta de Fisher con una significancia del 5 %.

Resultados: El 82.5 % (99/120) de las cepas consideradas en este estudio presentaron piocianina y el 18.5 % (22/120) produjeron biopelículas de moderado a fuerte. En cuanto al análisis de asociación, se encontró que no existe asociación significativa entre la producción de piocianina y presencia de MBL ($p>0.05$), pero si existe asociación entre la producción de biopelículas y presencia de MBL ($p<0.05$); y entre la producción de biopelículas y presencia de piocianina ($p<0.05$).

PALABRAS CLAVE: PSEUDOMONAS AUREGINOSA, BIOPELÍCULA, PIOCIANINA, METALOBETALACTAMASAS.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a nosocomial pathogen that causes a wide range of infections such as pneumonia or bacteremia. This is further complicated by its intrinsic resistance to various antibiotics and its remarkable ability to acquire new resistance mechanisms, associating it with high mortality rates and turning it into a serious public health problem.

Objective: In this study, the association between virulence factors and the presence of metallobetalactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the HNHU in 2017 was determined.

Materials and Methods: The present research work is an analytical, prospective, cross-sectional study. To this end, 120 strains distributed in 40 MBL-producing cases and 80 non-MBL-producing strains were collected. The free access statistical program EpiInfo was used for the association analysis according to Fisher's exact test with a significance of 5 %.

Results: 82.5 % (99/120) of the strains considered in this study presented pyocyanin and 18.5% (22/120) produced moderate to strong biofilms. Regarding the analysis of association, it was found that there is no significant association between pyocyanin production and presence of MBL ($p > 0.05$), but there is an association between the production of biofilms and the presence of MBL ($p < 0.05$); and between the production of biofilms and the presence of pyocyanin ($p < 0.05$).

KEY WORDS: PSEUDOMONAS AUREGINOSA, BIOFILM, PYOCYANINA, METALLOBETALACTAMASES.

INTRODUCCIÓN

La *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C. El principal problema es su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos (Ochoa y col., 2013).

La farmacorresistencia de este microorganismo, está relacionada a diferentes mecanismos tales como mutaciones cromosomales y adquisición de genes de resistencia. Ante estos cambios, la *Pseudomonas* es capaz de producir enzimas metalobetalactamasas (MBL) que le confieren resistencia a varios antimicrobianos (Driscoll y col., 2007). A esto se le suma, la presencia de factores de virulencia como la piocianina y la formación de biopelículas que en conjunto podría ocasionar fallas terapéuticas representando un problema de salud pública.

Muchos autores a nivel mundial han investigado sobre la prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* productora de MBL en diferentes instituciones hospitalarias. No obstante, pocos investigadores han tomado en cuenta el estudio de los diferentes factores de virulencia que podrían influir en la presencia de MBL en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*. Por eso, nuestra meta es determinar esa asociación.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista causante de frecuentes infecciones asociadas al cuidado de la salud, principalmente en pacientes inmunosuprimidos, quemados, personas con fibrosis quística y usuarios de unidades de cuidados intensivos (UCI). Se caracteriza por su resistencia a varias clases de antibacterianos, dificultando el tratamiento y asociándose a tasas mayores de mortalidad que incrementa el coste de la atención hospitalaria (Ossa-Giraldo y col., 2014).

Un estudio de vigilancia comparativa entre los servicios de UCI en Estados Unidos y América Latina (entre ellos, Perú), realizado por la Organización Internacional de Control de Infecciones Nosocomiales (INICC), reveló que la prevalencia *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de dispositivos médicos fue de 19 % y la resistencia a imipenem fue de un 37 % (Rosenthal VD, Aiquin J, & Guanche H, 2008). Sin embargo, la distribución es heterogénea. Por ejemplo, en un hospital peruano, se aisló 4 cepas *Pseudomonas aureginosa* de 121 estetoscopios médicos y dos de ellas (50 %) fueron resistentes a imipenen (Oliva-Menacho, Oliva-Candela, & Garcia-Hjarles, 2017).

Lamentablemente, la prevalencia en pacientes hospitalizados es más alta en comparación a los dispositivos médicos. A nivel internacional, es el cuarto más aislado en los pacientes hospitalizados en las UCI y salas generales, después de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (OPS, 2009). Mientras que en nuestro país, según el informe anual del Instituto Nacional de Salud, el 6 % (287/11207)

de aislamientos de pacientes hospitalizados en ocho establecimientos de salud en Lima y Arequipa correspondieron a *Pseudomonas aureginosa* (INS, 2007), considerándose en el sexto lugar después de *E.coli*, *S.aureus*, entre otros.

El nivel de resistencia de esta bacteria se debe a su amplia versatilidad metabólica, la cual le permite adaptarse a diferentes ambientes, pudiendo persistir a través de mecanismos que impulsan su virulencia como la formación de biopelículas y de piocianina. Estas bacterias se unen para formar ensambles entre ellas y sincronizar su expresión genética al formar una biopelícula (biofilm), ello aumenta su resistencia antibiótica y es capaz de producir un cuadro infeccioso crónico y severo de difícil tratamiento (Ochoa y col., 2013).

A estos hallazgos sobre los mecanismos de virulencia, se le suma la resistencia bacteriana a través la producción de enzimas como metalobetalactamasas cuya resistencia ha alcanzado a los antibióticos de amplio espectro como los carbapenémicos (imipenem y meropenem). A nivel internacional, el Programa Europeo para la Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos (EARS) publicó las tasas de resistencia a carbapenémicos mayores a 25 % en seis países del continente (EARS, 2007). Por otro lado, en Perú se encontró que la bacteria es resistente al 30 % de antimicrobianos disponibles en el mercado; una cifra que es realmente preocupante para la salud pública (INS, 2012).

Por lo expuesto, se ha llevado a cabo esfuerzos encaminados al estricto control y vigilancia de infecciones, enfocados en disminuir la diseminación de estos microorganismos e impactar de forma positiva en los desenlaces como morbilidad, mortalidad y estancia hospitalaria prolongada (MINSA, 2015). Debido a ello, se considera relevante el estudio de los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas, que son las que presentan mayor resistencia antibiótica.

1.2 Planteamiento y formulación del problema

Pregunta general

¿Existe asociación entre los factores de virulencia y la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el HNHU durante el año 2017?

Preguntas específicas

- ¿Cuál es la prevalencia de formación de biopelículas y pirocianina en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017?
- ¿Cuál es el nivel de asociación entre la formación de biopelículas y aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017?

- ¿Cuál es el nivel de asociación entre la producción de piocianina y aislamientos clínicos metalobetalactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas en el HNHU durante el año 2017?

1.3 Objetivos

Objetivo general

Determinar la asociación entre los factores de virulencia y la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el HNHU, durante el año 2017.

Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de formación de biopelículas y piocianina en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017.
- Determinar el nivel de asociación entre la formación de biopelículas y aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017.
- Determinar el nivel de asociación entre la producción de piocianina y aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017.

1.4 Justificación

El análisis de *Pseudomonas aeruginosa* es importante debido a su magnitud de resistencia hacia una amplia gama de antibióticos. Esto provoca fallas terapéuticas que implica no solo gasto en medicamentos, sino deteriorando la salud de los pacientes. Por eso representa un problema de salud pública que debe ser atendido y controlado. Para ello, es necesario promover investigaciones que permitan conocer y actualizar la patogénesis, mecanismos de virulencia y resistencia de esta bacteria.

En cuanto a los mecanismos de virulencia, algunos estudios como el de Salazar (2014) y Ochoa y col. (2013) concuerdan que la resistencia en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se ha asociado a la formación de biopelículas bacterianas. Y otros estudios también ha considerado la producción de piocianina como uno de los principales factores de virulencia producido por este organismo que penetra en las membranas celulares produciendo daño de amplio espectro en células humanas (Pastells, Pascual, Sanchez-Baeza, & Marco, 2016). Sin embargo, poco se ha estudiado sobre estos mecanismos a nivel nacional.

Con respecto al mecanismo de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*, muchos autores a nivel mundial han investigado sobre la producción de enzimas metalobetalactamasas (MBL) que le confiere resistencia a los medicamentos de amplio

espectro. No obstante, pocos investigadores han tomado en cuenta el estudio de los diferentes factores de virulencia que podrían influir en la presencia MBL. Por eso este estudio se enfocó principalmente en el nivel de asociación de formación de biopelículas y piocinina en aislamientos *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBL.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Ochoa y col (2013) determinaron las características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas en México. Realizaron ensayos de susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby-Bauer en 92 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. También determinaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) para imipenem (IMP) y meropenem (MEM). Los resultados indicaron que el 30.4 % (28/92) de las cepas de origen pediátrico fueron recuperadas de la sala de cirugía y el 50 % de muestras de orina. En cuanto a la resistencia, el 50 % fueron resistentes a 12 diferentes antibióticos. La MIC fue de 64 µg/ml, con 43.1 % (25/58) para MEM y 56.8 % (33/58) para IMP. Asimismo, la producción de MBL fue observada en 43 % (25/58) para MEM, 2 % (1/58) para IMP y 12 % (7/58) para ambas. Los análisis mostraron que 82 % (48/58) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos fueron altas formadoras de biopelículas.

Fuse y col. (2013) investigaron la capacidad de producción de piocianina de *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (MDR) y productora de MBL. Se recolectaron un total de 50 aislados clínicos, incluidas 20 cepas MDR, en 18 hospitales generales de Japón. Se midieron la cromaticidad y la luminosidad producidas por la piocianina en cada aislado. Las cepas MDR mostraron un color

amarillo verdoso brillante, mientras que no MDR las cepas tendían a mostrar un verde azul oscuro. Las cantidades de piocianina en cepas productoras de MBL y cepas no productoras fueron 0.015 ± 0.002 y 0.41 ± 0.10 lg, respectivamente. Cuando el gen MBL se transdujo a *Pseudomonas aeruginosa* y adquirió MDR, se demostró que la capacidad de producción de piocianina disminuyó. La patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* MDR productora de MBL puede ser menor que la de las cepas no MDR. Esto puede explicar por qué *Pseudomonas aeruginosa* MDR es poco probable que cause infección, sino que causa colonización subclínica solamente.

Saavedra y col. (2014) realizaron un estudio descriptivo de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos en Colombia. Para el estudio, recibieron 57 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* del Instituto Nacional de Salud. Las carbapenemasas se detectaron fenotípicamente con el test modificado de Hodge y la prueba de sinergia para MBL usando los inhibidores EDTA-SMA. De los 57 aislamientos remitidos, dos fueron sensibles a carbapenémicos y, de los 55 restantes, en 43 se confirmó la presencia de carbapenemasas. Estos 43 presentaron perfil de multirresistencia: 76,7 % fue positivo con el test modificado de Hodge y 79,1 % mostró sinergia con MBL.

Salazar (2014) determinó la presencia de los diferentes genotipos y factores de virulencia asociados en cepas clínicas de diferentes fuentes para *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudio descriptivo contó con 58 cepas provenientes de pacientes

hospitalizados aislados entre abril y octubre del 2012, en tres hospitales de Lima Metropolitana. Los resultados mostraron que la resistencia frente a antibióticos fue mayor para los carbapenems, para Imipenem fue el 74,1 % (43/58) y para Meropenem el 72,4 % (42/58), a la Ceftazidima también el 74,1 % (43/58), seguido por la Gentamicina 63,8 % (37/58). En cuanto a la distribución de genotipos, 25,9 % (15/58) presentaron sólo el gen *pilA* y el resto de muestras presentaron genes accesorios, así el *tfpO* lo presentaron el 19 % (11/58). La capacidad de formación de biopelículas fue abundante en 16 cepas (27,6 %), regular en 19 (32,8 %) y escasa en 23 (39,6 %).

González y col. (2014) caracterizaron molecularmente las metalobetalactamasas (MBL) en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en 6 hospitales de referencia en Lima. Para ello, examinaron 51 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a ceftazidima y con sensibilidad reducida a carbapenémicos. El ensayo fenotípico fue realizado con el método de aproximación de discos con sustratos (ceftazidima, imipenem y meropenem) y con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La detección de genes MBL fue realizada mediante la técnica PCR multiplex. Por otro lado, mediante el método fenotípico se detectaron MBL en el 15,7 % de los aislamientos, y en todos ellos la detección de genes mostró la presencia del gen *blaIMP*. El desarrollo de este mecanismo de farmacoresistencia en el Perú podría tener un grave impacto en el ámbito clínico y epidemiológico.

Oyola (2014) evaluó la influencia del meropenem en la formación de piocianina y alginato en *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biopelícula. Para ello, se recolectó 80 muestras provenientes de pacientes de los hospitales nacionales Edgardo Rebagliati Martins y Guillermo Almenara Irigoyen. Se detectó un 75 % (60/80) de cepas formadoras de biopelículas por el método de O'Toole – Kolter, de las cuales el 30.0 % (18/60) evidenciaron producción de piocianina en una concentración de 6.0 ug/mL a 6.5 ug/mL y el 36.6 % (22/60). Se evidenció producción de alginato en concentraciones de 6 ug/mL a 10 ug/mL expresado como ácido urónico en presencia de meropenem a la concentración de 10 µg . Sin embargo, en ausencia de meropenem se obtuvo una menor producción de piocianina y alginato, por lo que se comprobó que el pigmento de piocianina y la producción de alginato son mecanismos de virulencia que favorecen la supervivencia de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia del antibiótico.

Toribio-Jiménez y col. (2015) caracterizaron siete cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de superficies ambientales hospitalarias para evaluar su capacidad de producir diferentes concentraciones de metales pesados y resistencia a antibióticos, biosurfactantes, piocianinas y biopelículas. Al utilizar el método conocido como Kirby Bauer, las cepas mostraron resistencia a los antibióticos (ampicilina, amoxicilina, cefotaxima, ceftazidima, amikacina e imipenem). Se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), mostrando tolerancia a los metales en orden decreciente (As 5+> As 3+> Zn 2+> Pb 2+> Fe 3+> Cd 2+> Cu 2+> Cr 6+). Todas las cepas produjeron piocianina y algunas formaron biopelículas.

Por lo tanto, las cepas que producen biosurfactantes, piocianinas, forman biopelículas, muestran resistencia a antibióticos, metales pesados y metaloides.

Gonçalves y col. (2017) determinaron los factores de riesgo asociados de forma independiente con el desarrollo de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, la frecuencia de genes de virulencia en productores de MBL y su capacidad para producir biopelículas. Realizaron un estudio de casos y controles en la Universidad Federal de Uberlândia de Brasil. Entre las 157 cepas analizadas, 73.9 % fueron resistentes a múltiples fármacos, 43.9 % fueron resistentes a carbapenémicos, 16.1 % fueron fenotípicamente positivas para MBL, y de estas, 10.7 % fueron positivas para el gen blaSPM. El análisis multivariable mostró que la ventilación mecánica, las sondas enterales/nasogástricas y el tratamiento inadecuado fueron factores de riesgo independientes asociados con la bacteriemia. Todas las cepas probadas se caracterizaron como productores de biopelícula fuerte. Se encontró una mayor mortalidad entre los pacientes con bacteriemia por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Sin embargo, no fue evidente la asociación con la presencia de genes de virulencia y MBL.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

La *Pseudomonas aeruginosa*, es un bacilo Gram negativo no fermentador, bastante vinculado con la infección hospitalaria. Entre sus principales características están la tolerancia a una gran variedad de condiciones físicas y resistente intrínseco a un vasto número de antibióticos. Esta bacteria es un bacilo muy versátil que puede crecer a temperaturas superiores a 42 °C. *Pseudomonas aeruginosa* es un habitante común de agua, suelos y plantas. Cabe resaltar que también puede formar parte de la flora corporal normal, pero en escasas ocasiones causa alguna enfermedad en personas sanas (Gómez, Leal, Pérez, & Navarrete, 2005).

Estas bacterias sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo verdoso (piocianina y pioverdina). La degradación de los glúcidos lo realizan utilizando la ruta de Etner Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Esto produce un olor dulzón característico en cultivos. Algunas especies incluso sintetizan capsula de exopolisacárido que favorece la adhesión y la formación de biopelículas aumentando su patogenicidad. También presentan plásmidos que son responsables de la incorporación y desimación de los factores de resistencia a los medicamentos, desinfectantes y a condiciones adversas del ambiente (Brooks, Jawetz, Butel, & Morse, 2005).

Su implicancia clínica empieza cuando se aíslan en los hospitales, donde puede ser encontradas en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. En la mayoría de los casos, la infección inicia con alguna alteración de los mecanismos de defensa del huésped; esto puede involucrar la disrupción en la integridad de barreras físicas como catéteres urinarios, catéteres intravenosos, quemaduras extensas de piel o tubos endotraqueales que facilitan la colonización bacteriana (Perez E & Ferreira H, 2010).

La infección hospitalaria que produce suele presentarse en pacientes severamente comprometidos, generalmente en unidades de cuidados intensivos, donde prevalece una alta presión de selección de resistencia por parte de los antibióticos. Por otro lado, existen otras situaciones muy puntuales del huésped que comprometen los mecanismos de defensa específicos, como son la neutropenia, la inmunosupresión iatrogénica o adquirida y las patologías que cursan con deterioro del sistema inmunológico como cáncer, desnutrición y diabetes, que también son factores de riesgo para la infección (Gomez y col., 2005).

2.2.2 Mecanismos de resistencia

La *Pseudomonas aeruginosa* es resistente, ya sea de forma natural como adquirida, a una gran variedad de antibióticos, como son las cefalosporinas de primera

y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. Esto es gracias a las características de su membrana celular, que posee propiedades muy particulares de impermeabilidad. La resistencia a los antibióticos generalmente activos se desarrolla en el ambiente hospitalario, además se sabe que las cepas pueden transferirse entre ellas el material genético que facilita la resistencia, incluso a partir de otras bacterias Gram negativas como las enterobacterias (Driscoll et al., 2007)

Así tenemos los dos principales mecanismos de resistencias de la *Pseudomonas aeruginosa*: presencia de betalactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana desarrolladas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales (Gomez y col., 2005). Estos mecanismos de resistencia pueden ocurrir simultáneamente.

- a) **Betalactamasas:** Son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos, de esta manera destruyen el sitio activo del antibiótico e impiden su actividad. De acuerdo al subgrupo betalactámico, reciben las denominaciones como penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas. Asimismo, estas enzimas son susceptibles a inhibidores como el ácido clavulánico clavulanato, sulbactam y tazobactam, aunque no todas son susceptibles ni responden de igual forma a esta inhibición. *Pseudomonas aeruginosa* posee puede producir tres clases de betalactamasas: Amp-C, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Luján, 2014)

La clase Amp-C, está codificada en el cromosoma de la bacteria y tiene la capacidad de ser inducida por los propios betalactámicos como la mayoría de penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y en forma variable a aztreonam. El grado de resistencia, depende del grado de represión de la Amp-C. El problema radica en que esta enzima es inducida en cuestión de días; por tanto, antes del tratamiento, los β -lactámicos parecen servir, pero clínicamente el paciente no mejora y se descubre posteriormente la inducción completa de la enzima (Gómez y col., 2005)

Las BLEE son enzimas que viabilizan la resistencia a penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam. A menudo están localizadas en plásmidos (DNA extracromosomal) y son transferibles de una cepa a otra. Tales enzimas se encuentran con mayor frecuencia en enterobacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, y a baja frecuencia en *Pseudomonas aeruginosa*. La dificultad de detección de BLEE en estas cepas se debe a que no solo tiene una enzima AmpC inducible, sino que también tiene un grado de impermeabilidad mucho mayor que las enterobacterias, así como resistencia mediada por flujo de salida. (Jiang y col., 2006).

Otro de los mecanismos de resistencia adquiridos es la producción de las carbapenemasas, entre ellas las metalobetalactamasas (MBL) codificadas por elementos genéticos móviles. Estas enzimas, exceptuando al aztreonam, hidrolizan a todos los betalactámicos disponibles. Para su actividad enzimática requieren cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactores, por eso son universalmente

inhibidas por agentes quelantes tales como el EDTA. Actualmente son conocidas cinco clases: VIM, IMP, SPM, GIM y SIM. Las dos primeras son las más frecuentes (Gonzales-Escalante, 2012).

- b) **Bombas de expulsión:** Las bombas forman un sistema eficiente de expulsión de los antibióticos. En *Pseudomonas aeruginosa*, las bombas de eflujo pertenecen a la familia resistance-nodulation-division (RND) donde dos sistemas de eflujo ya han sido caracterizados y entre ellos el sistema MexAB-oprM ha sido uno de los más estudiados. Este complejo llamado MexAB- OprM, se compone de una proteína bomba en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa. Tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y contra un gradiente de concentración. Este es el responsable de la expulsión de betalactámicos (excepto imipenem), fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprima y sulfonamidas (Poole, 2001).
- c) **Porinas de membrana:** Las porinas son proteínas transmembranales que se ubican en la membrana externa de las bacterias y cumplen diversas funciones. La *Pseudomona* produce diversas porinas tales como OprC, OprD, OprE, OprF y OprG. Entre estas, OprF es la que se presenta en mayor número y es la que permite una difusión de solutos muy lenta e inespecífica. OprD es otra porina que permite la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa. Esta porina es capaz de permitir la entrada de carbapenémicos, aunque no de otros

betaláctamicos. La afinidad y la capacidad de difusión de Imipenem a través de esta porina es casi 70 veces más alta que la de Meropenem. El Imipenem tiene la capacidad de seleccionar durante el tratamiento cepas que muestran mutaciones en la porina OprD, que demuestran disminución de la afinidad y el transporte de este antibiótico a través de esta proteína (Sugawara, Nagano, & Nikaido, 2012).

2.2.3 Factores de virulencia

La *Pseudomonas aeruginosa* posee una patogénesis que puede ser descrita como multifactorial; ya que produce una amplia variedad de factores de virulencia. Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias (pili), matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas, biopelículas y la formación de piocianina (Luján, 2014). A continuación detallaremos las más importantes:

- a) **Formación de biopelículas:** Durante las últimas décadas se ha estudiado ampliamente el crecimiento en biopelículas de los microorganismos, especialmente, en *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con infección nosocomial o adquirida en la comunidad. Esto debido a que contribuye con la patogenicidad de la bacteria por dificultar la penetración de los antibióticos (Gonçalves y col., 2017).

De forma global, el componente mayoritario de las biopelículas es el agua, el cual representa hasta un 97 % del contenido total. Además de agua y células bacterianas, la matriz de las biopelículas es un complejo formado principalmente por

exopolisacáridos. Otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias se encuentran en menor cantidad. Entre estas últimas destacan los ramnolípidos, moléculas surfactantes producidas por *Pseudomonas aeruginosa* que desempeñan un papel en el mantenimiento de canales en la estructura de la biopelícula (Høiby y col, 2010).

Se ha demostrado que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida y que presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, incluso hasta las zonas más profundas. Su existencia no evita, sin embargo, que dentro de su estructura se produzcan distintos ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH y oxígeno es diferente y en el que es fácil la diversificación (Cantón y col., 2011).

La etapa inicial del proceso de formación de biopelículas es la adherencia sobre una superficie; una vez que se produce la adherencia, comienza la división bacteriana y se extienden formando microcolonias. En una etapa posterior se secreta un exopolisacárido, matriz de la biopelícula, y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observan canales. Las biopelículas confieren una resistencia de las bacterias a la acción de los antimicrobianos (Ramsey & Wozniak, 2005).

En las infecciones agudas, las bacterias pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, mientras que en las infecciones asociadas a biopelículas no se consigue por completo la erradicación y se producen episodios recurrentes. Esto

se debe a: la barrera de difusión física y química que impide penetración de los antimicrobianos, el lento crecimiento de las bacterias en las biopelículas debido a la limitación de nutrientes, y la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de fenotipos hipermutadores que favorece el desarrollo de mutantes resistentes. Además, el crecimiento en biopelículas hace que a largo plazo se produzca una estabilización de los morfotipos y fenotipos de resistencia a los antimicrobianos (Cantón y col., 2011).

b) Formación de piocianina

Pseudomonas aeruginosa tiene muchos metabolitos secundarios que son secretados a lo largo de su crecimiento, los cuales forman parte de los factores de virulencia entre ellos se indica a las toxinas, proteasas, hemolisinas y fenazina. La piocianina es el principal compuesto producido por la fenazina, la cual es el principal factor de virulencia. Esta fenazina producida en fibrosis quística inhibe la función ciliar de células epiteliales respiratorias y pueden alterar el sistema inmune del huésped y la respuesta inflamatoria, provocando la apoptosis de los neutrófilos (Liang y col., 2011).

La producción del pigmento piocianina, que es un compuesto redox muy activo que produce múltiples efectos citopáticos en las células de los mamíferos, y que es producida únicamente por *Pseudomonas aeruginosa*. Además de la piocianina, *Pseudomonas sp.* producen distintos pigmentos como la pioverdina (un pigmento

fluorescente de color amarillo-verdoso), piorubina (*Pseudomonas aeruginosa*, color rojo similar al óxido), oxiclorafina (*Pseudomonas aureofaciens* y *Pseudomonas chlororaphis*, color naranja) y clororafina (*Pseudomonas chlororaphis*, color verde) (Ruiz, 2007).

2.3. Definición de términos básicos

- **PIOCIANINA:** pigmento azul o verde azulado que puede ser extraído de *Pseudomonas aeruginosa*.
- **METALOBETALACTAMASAS:** son enzimas que hidrolizan una gran cantidad de antibióticos betalactámicos.
- **BIOPELICULA:** es un ecosistema microbiano altamente organizado conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte.
- **VIRULENCIA:** es el grado de patogenicidad de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.
- **RESISTENCIA INTRÍNSECA:** es aquella que se desarrolla en forma natural en ausencia de mecanismos ya que no hay una exposición previa de mecanismos.
- **BETALACTAMASAS:** son enzimas producidas por bacterias con peptidoglucano, utilizadas para defenderse de antibióticos betalactámicos.

2.4. Hipótesis

- **Hipótesis alterna:** Los factores de virulencia se asocian significativamente a la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el HNHU durante el año 2017.
- **Hipotesis nula:** Los factores de virulencia no se asocian significativamente a la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el HNHU durante el año 2017.

CAPÍTULO III MÉTODO

3.1 Tipo y diseño de estudio

Estudio analítico, prospectivo de corte transversal y diseño no experimental.

3.2 Población y Muestra

Población

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* recolectadas de marzo a junio del 2017 en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.

Muestra

120 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* distribuidos en dos grupos:

- Casos: 40 *Pseudomonas aeruginosa* productoras de Metalobetalactamasas. Representa la totalidad de los casos positivos desde marzo a junio del 2017 en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.
- Controles: 80 *Pseudomonas aeruginosa* no productoras de Metalobetalactamasas. Es el doble del número de los casos porque la prevalencia actual de *Pseudomonas aeruginosa* productora de MBL es menor al 10% (INS, 2011) y se quiere evadir la intervención del azar en la asociación que se está evaluando.

3.3 Variables y operacionalización

Variables independientes

Variable	Definición	Indicador	Tipo
Formación de biopelículas	Se refiere a la capacidad de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para la formación de biopelículas	Leve Moderado Fuerte	Cualitativo politémico
Formación de piocianina	Se refiere a la capacidad de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para la formación de piocianina	Negativo Positivo	Cualitativo dicotómico
Metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de MBL en las muestras obtenidas en el hospital de estudio.	Si/No	Cualitativa dicotómico

Variable dependiente

Variable	Definición	Indicadores	Tipo
Nivel de asociación de MBL y piocianina	El resultado del análisis estadístico del nivel de asociación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y la formación de piocianina	Si/No	Cualitativa
Nivel de asociación de MBL y formación de biopelículas	El resultado del análisis estadístico del nivel de asociación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y la formación de biopelículas	Si/No	Cualitativa

3.4 Recolección de datos e instrumento

Se recolectaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de aislamientos clínicos (secreciones, hemocultivos y urocultivos) reportadas en la base de datos del área de Microbiología Clínica del Hospital Nacional Hipólito Unanue. Para ello, se utilizó un formato de recolección de datos simple que no necesitó ser validado (ver ANEXO 1).

3.5 Procedimientos, Materiales y equipos

Se recibieron las muestras de *Pseudomonas aeruginosa* recolectadas de diferentes muestras biológicas como: secreciones, orina y sangre; correspondientes a pacientes atendidos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante marzo a junio del 2017. De acuerdo a las pruebas realizadas se seleccionaron todas las cepas positivas a MBL que resultaron ser 40. Mientras que por una tabla de número aleatorios se seleccionaron 80 cepas de *Pseudomonas* no productoras de MBL como control.

Las cepas aisladas se conservaron en microviales con agua destilada a temperatura ambiente para ser procesadas después de la recolección total de datos. El procesamiento de las muestras para determinar piocianina se basó en la técnica del estudio de Callicó y col., (2004) y para la cuantificación de biopelículas, en la técnica validada por Champi R (2014).

a) Detección de carbapanemasas

“Modified Carbapenem Inactivation Method for Suspected Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae” CLSI 2017 M100

- Se sembraron las cepas resistentes a carbapenémicos (imepenem y meropenem) en medios de agar sangre y se procedió a incubar durante 24 horas.
- En crioviales se añadió 2 ml de TSB con un disco de meropenem 10 µg. Se inoculó las cepas resistentes a carbapenémicas sembradas en agar sangre. Se incubó durante 4 hrs ± 15 minutos a una temperatura de 35° C ± 2° C.

- Se realizó una suspensión de *E. coli* ATCC® 25922 a 0.5 en la escala de Mc Farland en solución salina.
- Se sembró en una placa de MHA la suspensión con *E. coli* ATCC® 25922, según el procedimiento del CLSI M02.
- Se retiró el disco de meropenem de cada suspensión de TSB-meropenem, eliminando el exceso de TSB, procediendo a colocarlo en la placa de MHA previamente inoculada con la cepa de *E. coli* ATCC® 25922.
- Se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 – 24 horas.
- Se interpretó según CLSI M02, carbapenemasas positivo, intermedio y negativo. Ver ANEXO 5.

b) Detección de Metalobetalactamasas

- Se usó el Método de Doble Disco Difusión en Agar Muller Hinton según norma del CLSI.
- Se colocó un disco de EDTA en el centro de la placa de Muller Hinton inoculada con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* a investigar.
- Se colocó los discos de imipenem y meropenem opuestos al EDTA.
- Se llevó a incubar las placas en posición invertida a una temperatura de 37°C por un tiempo de 24 horas.
- Se interpretó los resultados como positiva con la observación del agrandamiento de la zona de inhibición del desarrollo de la cepa investigada alrededor de los

discos de imipenem o meropenem hacia el disco de EDTA (conocido como efecto huevo).

- Se consideró como negativo cuando no se observó agrandamiento de la zona de inhibición del desarrollo de la cepa investigada alrededor de los discos de imipenem o meropenem hacia el disco de EDTA.

c) Detección cualitativa de piocianina

- Se preparó dos baterías, una de 40 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBL y la otra de 80 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no productoras de metalobetalactamasas.
- Se inoculó a las cepas en 5 mL de agar King A (Agar para Pseudomonas).
- Luego se incubó a 37°C por 24h para observar la producción de piocianina.
- Luego se agregó 1mL de cloroformo para maximizar la visualización de la producción de piocianina e interpretar como positivo (azulado) y negativo. Ver ANEXO 2 y 3.

d) Detección cuantitativa de biopelículas

- Las cepas aisladas y la cepa control se inocularon en 10 mL de caldo tripticasa de soya glucosado al 1 %, incubación 37°C por 24 horas.
- Los cultivos y el control se diluyeron 1:100 con medio fresco.

- En pocillos individuales estériles de fondo plano de poliestireno se llenaron con 200 μ L del cultivo diluido. Incubación 37°C por 24 horas.
- Se utilizó como control negativo el caldo tripticasa estéril. Incubación 37°C por 24 horas.
- Se eliminó el contenido de cada pocillo, luego se lavó con 0.2 mL de PBS (pH 7.2) por cuatro veces.
- Fijación con una solución de acetato de sodio al 2 % y coloración con cristal violeta al 0.1 %.
- Se removió el exceso de colorante con agua desionizada y se dejó secar.
- Usando un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm, se leyó la densidad óptica (OD) del biopelículas adherido y coloreado. Ver ANEXO 3.
- La experiencia se realizó por triplicado.
- La interpretación de la producción de biopelículas se realizó de acuerdo a los criterios de Stepanović y col., (2007). Ver ANEXO 4.

3.6 Análisis de datos

Luego de terminar con el procesamiento de las muestras y el cálculo de sus resultados, se procedió al llenado de las fichas de las muestras. Estos datos fueron transcritos en una hoja Excel con el control de calidad de datos ingresados (consistencia y depuración), Ver ANEXO 5 y 6. Luego fueron ingresados al programa estadístico de

acceso libre EpiInfo para el análisis de frecuencias y análisis de asociación según Fisher y chi-cuadrado con una significancia del 5%. Además se elaboró el diagrama de barras y/o diagrama circular.

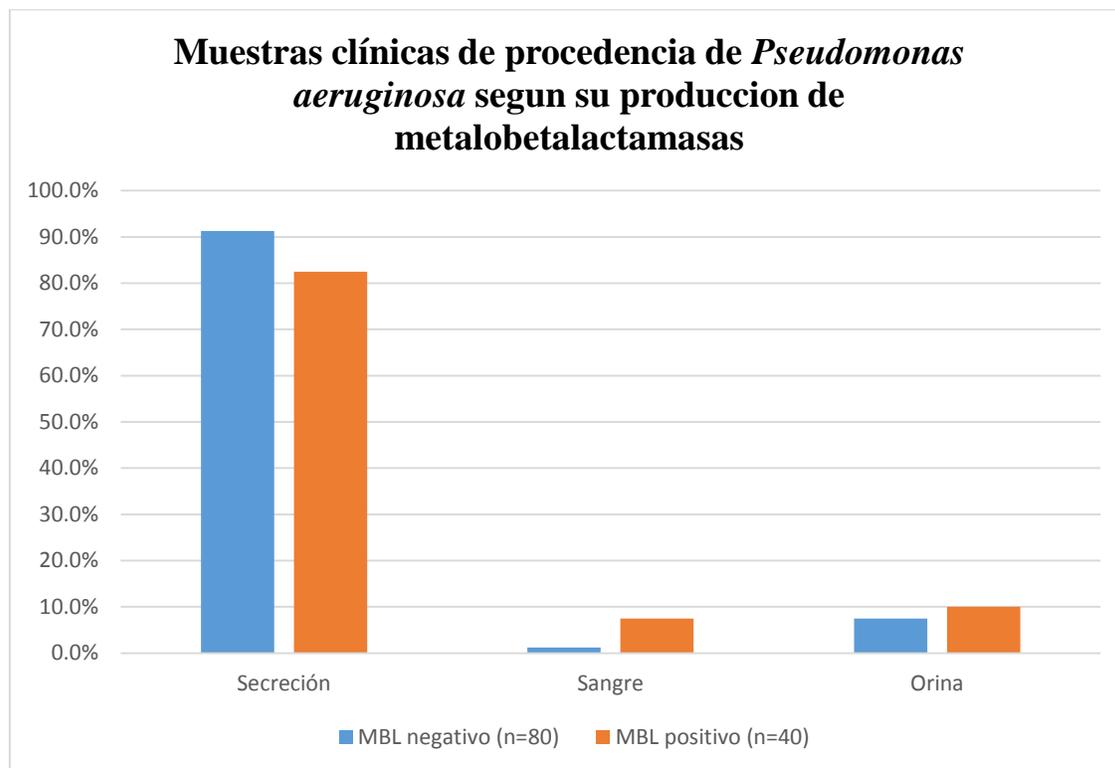
3.7 Aspectos éticos

La realización del presente estudio se consideró exento de revisión debido a que no se consideró identificadores personales del paciente en el análisis de los datos. Además todos los datos físicos se resguardaron en un escritorio de uso exclusivo para estudio y el resto de los datos se guardaron en una computadora con contraseña de acceso restringido solo a los investigadores principales. De esta forma se mantuvo la confidencialidad de los resultados.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

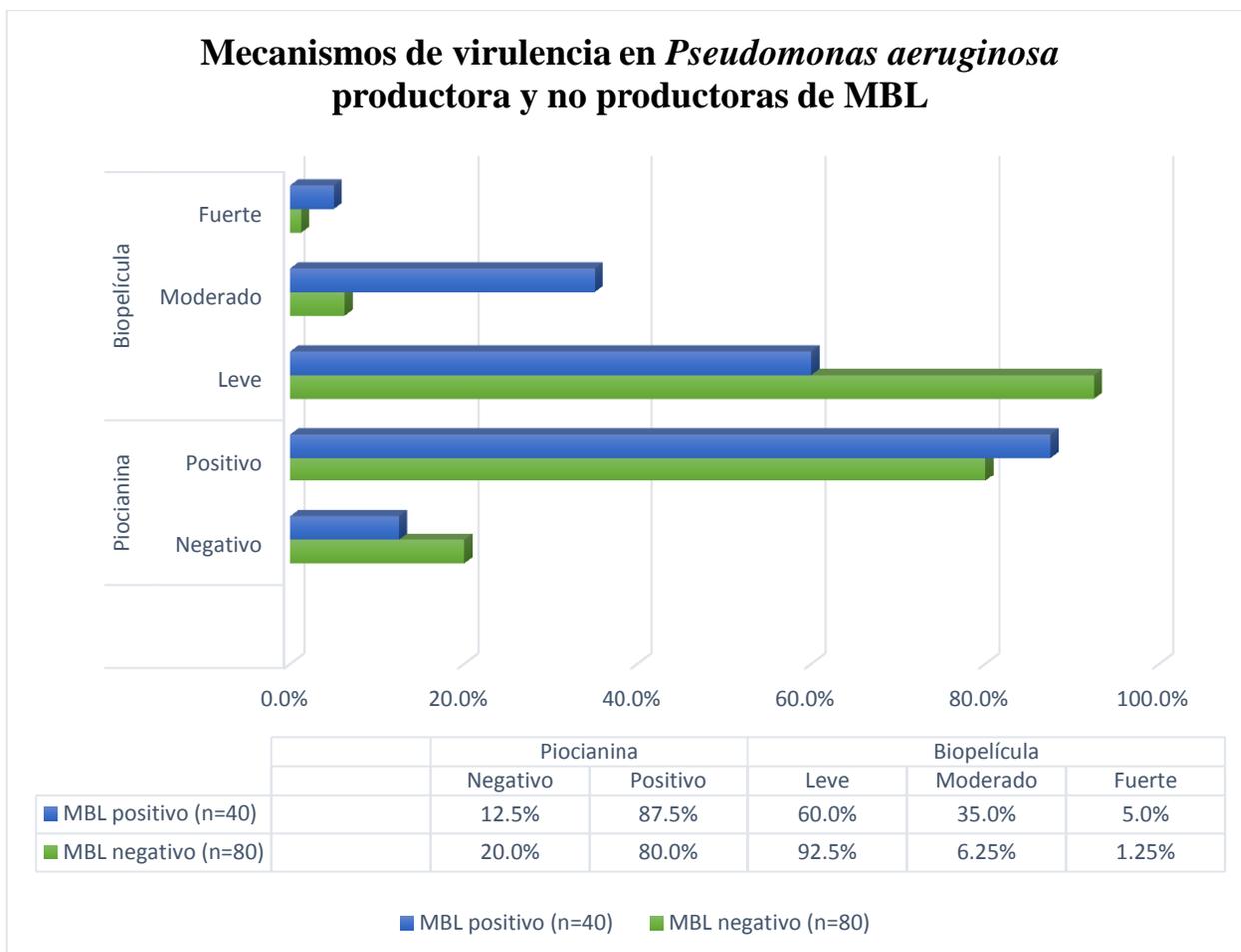
4.1 Resultados:

GRÁFICO N°1



Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* proceden principalmente de secreciones. Del total de 40 cepas productoras de MBL, el 91.3% provienen de secreciones y de las 80 cepas no productoras de MBL es el 82.5%. Las secreciones pueden provenir de aspirado bronquial, esputo, herida operatoria, líquido cefalorraquídeo, tejido, absceso, líquido biliar, líquido peritoneal, catéter endovenoso, y herida no operatoria.

GRÁFICO N°2



Las frecuencias de píocianina son muy parecida independientemente de la presencia de MBL en los aislamientos de *Pseudomonas aureginosa*. Mientras que en la producción de biopelículas, si se observa diferencia en su intensidad con respecto a la presencia de MBL. Lo más resaltante es la categoría de moderado en formación de biopelículas que tiene el 35% y 6.25% en las cepas MBL positivas y MBL negativas respectivamente.

TABLA N°1

Cruce de frecuencias entre la presencia de piocianina y formación de biopelículas en las 120 cepas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa*

Relacion de Biopelículas y piocianina	Piocianina Negativa (n=21)	Piocianina Positiva (n=99)
Leve (n=98)	100.0%	77.8%
Moderado (n=19)	0.0%	19.2%
Fuerte (n=3)	0.0%	3.0%

Del total de 120 cepas, 99 fueron positivas a piocianina y 22 presentaron formación de biopelículas de moderado a fuerte. La presencia del factor de virulencia piocianina aumenta la intensidad de la formación de biopelículas aparentemente, mientras que su ausencia disminuye la intensidad de producción de biopelículas a 0% en este estudio.

TABLA N°2

**PRUEBA EXACTA DE FISHER PARA MEDIR ASOCIACIÓN DE PIOCIANINA
CON LA PRODUCCION DE METALOBACTAMASAS EN *Pseudomonas aureginosa***

TABLA 2 X 2

Piocianina	MBL negativo	MBL positivo
Negativo	16	5
Positivo	64	35

Prueba exacta de Fisher	p=0.225	Nivel de confianza 95%
--------------------------------	----------------	-------------------------------

Para dos variables cualitativas dicotómicas se prefiere usar la prueba exacta de Fisher. Al realizar el análisis con el programa estadístico EpiInfo se obtuvo un $p > 0.05$ que indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre la producción de piocianina y la presencia de MBL en las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*.

TABLA N°3

PRUEBA EXACTA DE FISHER PARA MEDIR ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS CON LA PRODUCCION DE METALOBACTAMASAS EN *Pseudomonas aeruginosa*

TABLA 2 X 2

Biopelículas	MBL negativo	MBL positivo
Leve	74	24
Moderado a fuerte	6	16

Prueba exacta de Fisher	p<0.001	Nivel de confianza 95%
--------------------------------	-------------------	-------------------------------

Para fines prácticos se unió las categorías de moderado y fuerte en la formación de biopelículas debido a que los valores menores a 5 invalidan el chi-cuadrado. Ahora al tener dos variables cualitativas dicotómicas se prefiere usar la prueba exacta de Fisher. Al realizar el análisis con el programa estadístico EpiInfo se obtuvo un $p < 0.05$ que indica que existe asociación estadísticamente significativa entre la producción de biopelículas y la presencia de MBL en las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*.

TABLA N°4

PRUEBA EXACTA DE FISHER PARA MEDIR ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS CON LA PRODUCCION DE PIOCIANINA EN *Pseudomonas aeruginosa*

TABLA 2 X 2

Biopelículas	Piocianina negativa	Piocianina positiva
Leve	21	77
Moderado a fuerte	0	22

Prueba exacta de Fisher	p<0.001	Nivel de confianza 95%
--------------------------------	-------------------	-------------------------------

Como en la tabla anterior, se unió las categorías de moderado y fuerte en la formación de biopelículas debido a que los valores menores a 5 invalidan el chi-cuadrado. Ahora al tener dos variables cualitativas dicotómicas se prefiere usar la prueba exacta de Fisher. Al realizar el análisis con el programa estadístico EpiInfo se obtuvo un $p < 0.05$ que indica que existe asociación estadísticamente significativa entre la producción de biopelículas y la presencia de piocianina en las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Discusiones:

El presente estudio nos ha permitido conocer el nivel de asociación existente entre la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* productora de MBL y sus mecanismos de virulencia que incluye formación de biopelículas y piocianina. Estas cepas se aislaron de muestras de pacientes atendidos en el Hospital Hipólito Unanue entre marzo y junio del 2017. En este estudio se procesaron las muestras para determinar presencia de piocianina y capacidad de formación de biopelículas. La presencia de MBL se obtuvo de los registros del laboratorio de microbiología.

De las 40 cepas productoras de MBL, el 91.3% procedían de secreciones (aspirado bronquial, esputo, herida operatoria, catéter intravenoso, entre otros); mientras que de las 80 cepas no productoras de MBL fue el 82.5%. Comparado con un hospital nacional, el 59% las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, provino de secreciones (Salvador, 2017). Estos resultados concuerdan con la localización de la bacteria en las unidades de cuidados intensivos encontrándose principalmente en superficies inertes, como los tubos endotraqueales, o también en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística (Bolaños & Iannacone, 2016; Driscoll y col., 2007). Sin embargo, en otros hospitales la principales fuente de *Pseudomonas* que en la orina (Díaz, 2008; Ochoa y col., 2013). Esto se debe principalmente al grupo poblacional atendido.

También se realizó un análisis de frecuencia de la presencia de piocianina en cepas productoras de MBL y no se observó diferencia sustancial en los porcentajes. La positividad de piocianina aparentemente es independiente a la producción de MBL. Este resultado es controversial debido a que no hay muchos estudios que hayan determinado la asociación de estas variables. Un estudio indica que las cepas más resistentes producen una cantidad significativamente menor de piocianina porque existe disminución de la capacidad proliferativa (Fuse y col., 2013). Otro estudio que concuerda con nuestro resultado indica que la diferencia en la producción de piocianina se debe a variaciones genéticas y no necesariamente a la producción de MBL (Toribio-Jiménez y col., 2015).

En cuanto al análisis de frecuencia entre la formación de biopelículas en cepas productoras de MBL, se observó una relación en los porcentajes. El 60% de las cepas productoras de MBL presentan biopelículas leves y un 35% moderadas; mientras que en las cepas no productoras de MBL presentan en el 92.5% y 6.25% respectivamente. En otras palabras la presencia de MBL parece estar intensificando la producción de biopelículas en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha premisa es similar a otro estudio donde el 82% (48/58) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos fueron altas formadoras de biopelículas (Ochoa y col., 2013).

En general, el 82.5% (99/120) de las cepas consideradas en este estudio presentaron piocianina y el 18.5% (22/120) produjeron biopelículas de moderado a fuerte. Al

cruzar los datos, se evidenció que ante la ausencia del factor de virulencia piocianina, disminuye la intensidad de producción de biopelículas a 0%. Por otro lado, ante la presencia de piocianina, el 22% de las biopelículas son moderadas a fuertes. En otro estudio, de las cepas formadoras de biopelículas, el 30.0% (18/60) evidenciaron producción de piocianina (Oyola, 2014). Esto puede indicarnos el trabajo en conjunto de los distintos mecanismos de virulencia de la pseudomona.

El análisis de asociación entre la producción de piocianina y presencia de MBL corrobora lo indicado en el GRAFICO 2, debido a que no se puede rechazar la hipótesis nula. Según Fisher, no existe asociación significativa entre piocianina y MBL ($p > 0.05$). Entre las razones que explicarían este resultado están la influencia de otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo que impiden la revelación del color característico de la piocianina en el laboratorio y variaciones genéticas entre las distintas cepas independientemente a su producción de MBL (Toribio-Jiménez y col., 2015). En este caso, es necesario seguir investigando para determinar con exactitud el nivel de asociación.

En el caso del análisis de asociación entre la producción de biopelículas y presencia de MBL aplicando la prueba exacta de Fisher, confirma lo indicado líneas arriba sobre el aumento de la intensidad de producción de biopelículas en presencia de MBL (nivel de asociación $p < 0.05$). Esto se podría deber a que la producción de biopelículas funciona como una barrera para la acción antimicrobiana debido a su estructura altamente

organizada y que las bacterias dentro de las biopelículas son más resistentes a cambios físicos y químicos por diversos agentes quimioterapéuticos; comparado con bacterias en su fase de crecimiento platónico (Sommerfeld & Fiegel, 2012).

Por último, se realizó un análisis de asociación entre la producción de biopelículas y presencia de piocianina. Aplicando la prueba exacta de Fisher, confirma lo indicado en la TABLA N°1, sobre el nivel de asociación entre la presencia de piocianina y la intensidad de producción de biopelículas ($p < 0.05$). Esto es, porque la piocianina y otros surfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* actúan como precursores en la producción de biopelículas. Dicha capacidad es importante para la colonización crónica de los tejidos humanos, lo que lleva a la persistencia de los implantes médicos y a la contaminación de las superficies ambientales del hospital (Vallet y col., 2004)

CONCLUSIONES

- ❖ De las 40 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBL, el 91.3% procedían de secreciones (aspirado bronquial, esputo, herida operatoria, catéter intravenoso, entre otros); mientras que de las 80 cepas no productoras de MBL fue el 82.5%.
- ❖ El 82.5% (99/120) de las cepas consideradas en este estudio presentaron piocianina y el 18.5% (22/120) produjeron biopelículas de moderado a fuerte.
- ❖ No existe asociación significativa entre la producción de piocianina y presencia de MBL de acuerdo a la prueba exacta de Fisher ($p>0.05$).
- ❖ Existe asociación estadísticamente significativa entre la producción de biopelículas y presencia de MBL, aplicando la prueba exacta de Fisher ($p<0.05$).
- ❖ Existe asociación estadísticamente significativa entre la producción de biopelículas y presencia de piocianina, aplicando la prueba exacta de Fisher ($p<0.05$).

RECOMENDACIONES

- ❖ La vigilancia epidemiológica e investigación de los mecanismos de virulencia y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* es necesaria. El laboratorio clínico cumple un importante rol en el reporte de esta bacteria, por ende como profesionales en este campo se recomienda mayor productividad científica en búsqueda de mejoras en la salud del paciente.
- ❖ Es recomendable realizar estudios con mayor tamaño de muestra que brinde más fuerza al estudio. Esto aumentara la posibilidad de intervenir exitosamente con bases sólidas.
- ❖ Para mejor interpretación de resultados, se aconseja el uso de historias clínicas de pacientes para encontrar factores de riesgo asociados a la infección por *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❖ Es importante la búsqueda de financiamientos sobre todo para investigaciones en el área de microbiología que puede limitar en ciertos aspectos. Como en este estudio que solo nos enfocamos en dos mecanismos de virulencia.

CAPÍTULO V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolaños, C., & Iannacone, J. (2016). Patrones fenotípicos de resistencia en pseudomonas aeruginosa de muestras clínicas a nivel de Sudamérica. *Cátedra Villarreal, 1*.
<https://doi.org/10.24039/cv20164164>
- Brooks, G. F., Jawetz, E., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2005). *Microbiología médica*. El Manual Moderno.
- Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pino, Y., Callís, A. H., & Esnard., S. C. (2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa. *Vaccimonitor, 13*(3), 1-9.
- Cantón, R., Fernández, A., Gómez, E., Del Campo, R., & Meseguer, M. (2011). Infección bronquial crónica: el problema de Pseudomonas aeruginosa. *Archivos de Bronconeumología, 47*, 8-13. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(11\)70029-1](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(11)70029-1)
- Champi R. (2014). *Evaluación de métodos para la detección de biofilm en catéteres intravasculares de pacientes hospitalizados. Hospital Nacional Hipólito Unanue en Abril – Setiembre 2014* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Díaz, J. (2008). Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en Pseudomonas aeruginosa resistentes a los carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Recuperado a partir de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/243>

- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs*, *67*(3), 351-368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. (2007). Reporte anual del programa Europeo para la Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos. Recuperado 3 de febrero de 2018, a partir de <https://ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-networks-and-laboratory-networks/ears-net-data>
- Fuse, K., Fujimura, S., Kikuchi, T., Gomi, K., Iida, Y., Nukiwa, T., & Watanabe, A. (2013). Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *19*(1), 82-88. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0457-9>
- Gómez, C., Leal, L., Pérez, M., & Navarrete. (2005). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: understanding a dangerous enemy. *Revista de la Facultad de Medicina*, *53*(1), 27-34.
- Gonçalves, I. R., Dantas, R. C. C., Ferreira, M. L., Batistão, D. W. da F., Gontijo-Filho, P. P., Ribas, R. M., ... Ribas, R. M. (2017). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(2), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>
- Gonzales-Escalante, E. (2012). Metalo- β -lactamasas: ¿el fin de los β -lactámicos? *Revista Peruana de Epidemiología*, *16*(3). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=203125431002>
- Gonzales-Escalante, E., Vicente-Taboada, W., Champi-Merino, R., Soto-Pastrana, J., Flores-Paredes, W., Lovera-García, M., ... León-Sandoval, S. (2014). Metalo- β -

- lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(2). Recuperado a partir de <http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/198>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Instituto Nacional de Salud. (2007). Informe de la resistencia antimicrobiana en hospitales en Perú - 2007. INS. Recuperado a partir de http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/Informe_Resistencia_2007.pdf
- Instituto Nacional de Salud. (2012). Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario- 2012. INS. Recuperado a partir de http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/cnsp_resanti_informesdevigilancia/INFORME_RESISTENCIA_ANTIMICROBIANA_2012.pdf
- Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F., & Lu, Y. (2006). Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2990-2995. <https://doi.org/10.1128/AAC.01511-05>
- Liang, H., Duan, J., Sibley, C. D., Surette, M. G., & Duan, K. (2011). Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 1), 22-34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.022350-0>
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474.

- Ministerio de Salud. (2015). Lineamientos para la vigilancia, prevención y control de las infecciones asociadas a la atención de salud. Biblioteca Central del Ministerio de Salud.
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., ... Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 136-150.
- Oliva-Menacho, J., Oliva-Candela, J., & Garcia-Hjarles, M. (2017). Bacterias patógenas multidrogoresistentes aisladas en estetoscopios de médicos en un hospital de nivel III. *Revista Medica Herediana*, 28(4), 242. <https://doi.org/10.20453/rmh.v28i4.3224>
- Organización Panamericana de la Salud. (2009). Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. OPS. Recuperado a partir de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=14877&Itemid=270&lang=en
- Ossa-Giraldo, A. C., Echeverri-Toro, L. M., Santos, Z. M., García, M. G., Agudelo, Y., Ramírez, F., & Ospina, S. (2014). Factores de riesgo para infección por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente en un hospital de alta complejidad. *Revista chilena de infectología*, 31(4), 393-399. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000400003>
- Oyola, G. (2014). Evaluación de la influencia del meropenem en la formación de piocianina y alginato en *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biopelícula. *Repositorio de*

Tesis - UNMSM. Recuperado a partir de
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3881>

Pastells, C., Pascual, N., Sanchez-Baeza, F., & Marco, M.-P. (2016). Immunochemical Determination of Pyocyanin and 1-Hydroxyphenazine as Potential Biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Analytical Chemistry*, 88(3), 1631-1638.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03490>

Perez E, & Ferreira H. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. *Rev Panam Infectol*, 12(2), 40-50.

Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 255-264.

Ramsey, D. M., & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology*, 56(2), 309-322.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x>

Rosenthal VD, Aiquin J, & Guancho H. (2008). Mortality, Length of Stay and Bacterial Resistance of Device-Associated Infections in 107 Intensive Care Units of 19 Developing Countries (pp. 1-2). Presentado en 48th Annual Scientific Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C: American Society for Microbiology. Recuperado a partir de
<http://www.inicc.org/media/docs/ICAAC-Mortality,LOSandBacterialResistanceofDAI19DevelopingCountries-2008.pdf>

- Ruiz, L. (2007). «*Pseudomonas aeruginosa*»: *Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos* (Tesis Ph.D.). Universitat de Barcelona. Recuperado a partir de <http://www.tdx.cat/handle/10803/2521>
- Saavedra, S. Y., Duarte, C., González, M. N., & Realpe, M. E. (2014). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica*, 34(Sup1), 217-223. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685>
- Salazar, M. (2014). Prevalencia de genotipos de pili tipo IV y factores de virulencia asociados en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Repositorio de Tesis - UNMSM*. Recuperado a partir de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3797>
- Salvador, G. (2017). Identificación de genes de Metalo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* de aislados clínicos hospitalarios 2016. *Repositorio de Tesis - UNMSM*. Recuperado a partir de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6206>
- Sommerfeld, S., & Fiegel, J. (2012). Nutrient dispersion enhances conventional antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(2), 177-181. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.015>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et*

Immunologica Scandinavica, 115(8), 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

Sugawara, E., Nagano, K., & Nikaido, H. (2012). Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *The FEBS Journal*, 279(6), 910-918. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08481.x>

Toribio-Jiménez, J., Aguirre Noyola, J., Romero, Y., Barrera M.A, R., Román, R., Ramos, G., ... Velazquez Aradillas, J. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to antibiotics and heavy metals, producing biosurfactant, pyocyanin and biofilm from surfaces hospital environment. *Bothalia Journal*, 45, 36-45.

Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Cámara, M., Ventre, I., Lory, S., ... Filloux, A. (2004). Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2880-2890.

ANEXOS

ANEXO 1 FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

Datos recolectados en: Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue

Período: Marzo a junio 2017

Elaborado por:

- Rosmeri Melani Huayhua Miranda
- Jacklyn Karen Torres Lopez

1. FECHA: _ / _ / _

2. CODIGO N° _____

3. TIPO DE MUESTRA: _____

4. RESULTADO:

a. Bacteria(s) Aislada (s): *Pseudomona aureginosa*

b. Sensibilidad Antibiótica:

- Productora de MBL
- No productora de MBL

c. Producción de biopelículas

- Leve *lectura de Elisa
- Moderada _____
- Fuerte _____

d. Producción de piocianina

- Negativo
- Positivo

ANEXO 2

IMAGEN DEL PRODUCTO FINAL DE LA TÉCNICA PARA DETERMINAR CEPAS *Pseudomonas aeruginosa* PRODUCTORAS DE PIGMENTO PIOCIANINA



La interpretación de la producción de piocianina se determinó de forma cualitativa.

Aquellas cepas que a simple vista formaban un pigmento verde azulado o azul se calificaba como POSITIVO a piocianina.

ANEXO 3

IMAGEN DEL PRODUCTO FINAL DE LA TÉCNICA PARA DETERMINAR CEPAS *Pseudomonas aeruginosa* PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULAS



La interpretación de la producción de biopelículas se determinó de forma cuantitativa a través de un lector de placas de Elisa y luego se categorizó los resultados en leve, moderado y fuerte de acuerdo a puntos de corte (Stepanović y col., 2007) .

ANEXO 4

INTERPRETACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA POR MÉTODO DE PLACA DE CULTIVO

Valor promedio de la Densidad Óptica	Producción de Biofilm
$\leq DOc / DOc < o \leq 2x DOc$	Negativo / Débil
$2x_DOc < o \leq 4x DOc$	Moderado
$> 4x DOc$	Fuerte

(Cut-off) Valor de corte de la Densidad Optica (DOc)= Promedio DO del control negativo + 3x desviación estándar del control negativo.

ANEXO 5

INTERPRETACION DE CARBAPENEMASAS

CARBAPENEMASA POSITIVO	CARBAPENEMASA INTERMEDIO	CARBAPENEMASA NEGATIVO
<p>Zone 6–15 mm or presence of colonies within a 16–18 mm zone. If the test isolate produces carbapenemase, the meropenem in the disk will be hydrolyzed and there will be no inhibition or limited growth inhibition of the meropenem-susceptible <i>E. coli</i> ATCC® 25922.</p>	<p>Zone 16–18 mm. The presence or absence of a carbapenemase cannot be confirmed (see Notes).</p>	<p>Zone 19 mm. If the test isolate does not produce carbapenemase, the meropenem in the disk will not be hydrolyzed and will inhibit growth of the meropenem-susceptible <i>E. coli</i> ATCC® 25922.</p>

CLSI – 2017 – M100

ANEXO 6

CONSOLIDADO DE DATOS DEL PROCESAMIENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* PRODUCTORAS DE METALOBETALACTAMASAS

CARBAPENEMASAS TIPO METALOBETACTAMASAS (+)					
Nº	MUESTRA	CODIGO	PIOCIANINA	BIOFILM	OD ELISA
1	SECRECIÓN	S-2451	(+)	DEBIL	0.045
2	SECRECIÓN	S-4586	(+)	DEBIL	0.095
3	SANGRE	H-2628	(+)	MODERADO	0.107
4	SECRECIÓN	S-2758	(+)	MODERADO	0.174
5	SECRECIÓN	S-1767	(+)	DEBIL	0.085
6	SECRECIÓN	S-1757	(+)	DEBIL	0.052
7	SANGRE	H-1183	(+)	MODERADO	0.109
8	SECRECIÓN	S-3484	(+)	DEBIL	0.099
9	SECRECIÓN	S-3022	(+)	DEBIL	0.093
10	SECRECIÓN	S-3027	(+)	DEBIL	0.094
11	ORINA	U-5754	(-)	DEBIL	0.096
12	SECRECIÓN	S-3073	(+)	DEBIL	0.064
13	SECRECIÓN	S-2651(1)	(+)	DEBIL	0.05
14	SECRECIÓN	S-2259	(+)	MODERADO	0.12
15	SECRECIÓN	S-2863	(+)	DEBIL	0.058
16	SECRECIÓN	S-4677	(+)	DEBIL	0.06
17	SECRECIÓN	S-4908	(+)	DEBIL	0.082
18	SECRECIÓN	S-1833	(+)	DEBIL	0.073
19	ORINA	U-5724	(-)	DEBIL	0.089
20	SECRECIÓN	S-2088	(+)	DEBIL	0.085
21	SECRECIÓN	S-2977	(+)	DEBIL	0.049
22	SECRECIÓN	S-3844	(-)	DEBIL	0.087
23	SECRECIÓN	S-3121	(+)	FUERTE	0.301
24	SECRECIÓN	S-1910	(-)	DEBIL	0.063
25	ORINA	U-6916	(+)	DEBIL	0.09
26	SECRECIÓN	S-2316	(+)	MODERADO	0.179
27	SANGRE	H-1227	(-)	DEBIL	0.067
28	SECRECIÓN	S-3001	(+)	MODERADO	0.123
29	SECRECIÓN	S-2824	(+)	DEBIL	0.078
30	SECRECIÓN	S-4647	(+)	MODERADO	0.153
31	SECRECIÓN	S-7232	(+)	MODERADO	0.13
32	SECRECIÓN	S-3516	(+)	FUERTE	0.204
33	SECRECIÓN	S-3331 (1)	(+)	MODERADO	0.156
34	ORINA	U-6796	(+)	DEBIL	0.084
35	SECRECIÓN	S-3463	(+)	MODERADO	0.121
36	SECRECIÓN	S-2477	(+)	DEBIL	0.066
37	SECRECIÓN	S-2712	(+)	MODERADO	0.104
38	SECRECIÓN	S-3090	(+)	MODERADO	0.113
39	SECRECIÓN	S-1832	(+)	MODERADO	0.128
40	SECRECIÓN	S-1765	(+)	MODERADO	0.121

ANEXO 7

CONSOLIDADO DE DATOS DEL PROCESAMIENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* NO PRODUCTORAS DE METALOBETALACTAMASAS

PSEUDOMONA METALOBETACTAMASAS (-)					
Nº	MUESTRA	CODIGO	PIOCIANINA	BIOFILM	OD ELISA
1	ORINA	U-9157	(+)	DEBIL	0.051
2	SECRECIÓN	S-2754	(+)	DEBIL	0.092
3	SECRECIÓN	S-2927	(+)	DEBIL	0.051
4	SECRECIÓN	S-2829	(+)	DEBIL	0.055
5	SECRECIÓN	S-9422	(+)	DEBIL	0.056
6	SECRECIÓN	S-2672	(-)	DEBIL	0.056
7	SECRECIÓN	S-2765	(+)	DEBIL	0.052
8	SECRECIÓN	S-2047	(+)	DEBIL	0.051
9	SECRECIÓN	S-3024	(+)	DEBIL	0.05
10	SECRECIÓN	S-3104	(+)	DEBIL	0.078
11	SECRECIÓN	S-2585	(+)	DEBIL	0.055
12	SECRECIÓN	S-3277	(+)	DEBIL	0.057
13	SECRECIÓN	S-3195	(+)	DEBIL	0.052
14	SECRECIÓN	S-3178	(+)	DEBIL	0.046
15	SANGRE	H-1237	(-)	DEBIL	0.068
16	SECRECIÓN	S-2139	(-)	DEBIL	0.055
17	SECRECIÓN	S-2137	(+)	DEBIL	0.054
18	SECRECIÓN	S-2158	(+)	MODERADO	0.119
19	SECRECIÓN	S-2613	(+)	DEBIL	0.049
20	SECRECIÓN	S-2516	(-)	DEBIL	0.101
21	SECRECIÓN	S-2517	(-)	DEBIL	0.066
22	SECRECIÓN	S-2392	(+)	DEBIL	0.067
23	SECRECIÓN	S-2111	(+)	DEBIL	0.053
24	SECRECIÓN	S-1954	(+)	DEBIL	0.054
25	SECRECIÓN	S-2337	(-)	DEBIL	0.047
26	SECRECIÓN	S-2446	(+)	DEBIL	0.052
27	ORINA	U-4533	(+)	DEBIL	0.092
28	SECRECIÓN	S-2006	(+)	DEBIL	0.084
29	SECRECIÓN	S-2368	(-)	DEBIL	0.07
30	SECRECIÓN	S-2456	(-)	DEBIL	0.052
31	SECRECIÓN	S-2834	(-)	DEBIL	0.049
32	SECRECIÓN	S-3011	(+)	DEBIL	0.072
33	ORINA	U-5036	(+)	DEBIL	0.066
34	SECRECIÓN	S-2258	(+)	DEBIL	0.076
35	SECRECIÓN	S-2890	(+)	DEBIL	0.047
36	SECRECIÓN	S-2646	(+)	DEBIL	0.052
37	ORINA	U-7127	(+)	DEBIL	0.065
38	ORINA	U-7150	(+)	DEBIL	0.061
39	SECRECIÓN	S-1727	(+)	DEBIL	0.049

40	SECRECIÓN	S-1663	(+)	DEBIL	0.092
41	SECRECIÓN	S-1667	(+)	DEBIL	0.066
42	SECRECIÓN	S-1737	(+)	FUERTE	0.365
43	SECRECIÓN	S-1739	(+)	DEBIL	0.061
44	SECRECIÓN	S-1808	(-)	DEBIL	0.057
45	SECRECIÓN	S-1777	(-)	DEBIL	0.056
46	SECRECIÓN	S-1878	(+)	DEBIL	0.089
47	SECRECIÓN	S-1968	(+)	DEBIL	0.052
48	SECRECIÓN	S-3825	(+)	DEBIL	0.05
49	SECRECIÓN	S-3089	(-)	DEBIL	0.049
50	SECRECIÓN	S-4396	(+)	DEBIL	0.067
51	SECRECIÓN	S-4459	(+)	DEBIL	0.061
52	SECRECIÓN	S-2835	(+)	DEBIL	0.077
53	SECRECIÓN	S-2840	(+)	DEBIL	0.055
54	SECRECIÓN	S-4513	(+)	DEBIL	0.046
55	SECRECIÓN	S-4393	(+)	MODERADO	0.148
56	SECRECIÓN	S-4708	(+)	MODERADO	0.107
57	SECRECIÓN	S-2372	(-)	DEBIL	0.058
58	SECRECIÓN	S-1779	(+)	DEBIL	0.062
59	SECRECIÓN	S-3356	(+)	DEBIL	0.05
60	SECRECIÓN	S-3040	(+)	DEBIL	0.056
61	SECRECIÓN	S-2257	(-)	DEBIL	0.068
62	SECRECIÓN	S-4511	(+)	DEBIL	0.057
63	SECRECIÓN	S-4522	(+)	DEBIL	0.097
64	SECRECIÓN	S-4607	(+)	MODERADO	0.107
65	SECRECIÓN	S-2390	(-)	DEBIL	0.07
66	SECRECIÓN	S-4397	(+)	DEBIL	0.064
67	SECRECIÓN	S-4458	(+)	DEBIL	0.065
68	SECRECIÓN	S-2983	(+)	DEBIL	0.077
69	SECRECIÓN	S-4585	(+)	DEBIL	0.056
70	SECRECIÓN	S-3096	(+)	DEBIL	0.06
71	SECRECIÓN	S-2462 (1)	(+)	DEBIL	0.08
72	SECRECIÓN	S-3377	(+)	DEBIL	0.057
73	SECRECIÓN	S-3506	(+)	DEBIL	0.052
74	SECRECIÓN	S-3173	(+)	DEBIL	0.054
75	SECRECIÓN	S-3505	(+)	DEBIL	0.053
76	SECRECIÓN	S-4663	(+)	DEBIL	0.059
77	SECRECIÓN	S-2264	(+)	DEBIL	0.064
78	SECRECIÓN	S-3454	(+)	DEBIL	0.054
79	ORINA	U-3890	(+)	MODERADO	0.144
80	SECRECIÓN	S-3891	(+)	DEBIL	0.095

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	MÉTODO
<p>Problema general ¿Existe asociación entre los factores de virulencia y la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el HNHU durante el año 2017?</p> <p>Problemas específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál es la prevalencia de formación de biopelículas y piocianina en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017? • ¿Cuál es el nivel de asociación entre la formación de biopelículas y aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017? • ¿Cuál es el nivel de asociación entre la producción de piocianina y aislamientos clínicos metalobetalactamasas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de metalobetalactamasas en el HNHU durante el año 2017? 	<p>Objetivo General Determinar los factores de virulencia asociados a la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el HNHU durante el año 2017.</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la prevalencia de formación de biopelículas y piocianina en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017. • Determinar el nivel de asociación entre la formación de biopelículas y aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017. • Determinar el nivel de asociación entre la producción de piocianina y aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de metalobetalactamasas en el HNHU, durante el año 2017. 	<p>Hipótesis de investigación (Hi) Los factores de virulencia se asocian significativamente a la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el HNHU durante el año 2017.</p> <p>Hipótesis de nula (Ho) Los factores de virulencia no se asocian significativamente a la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el HNHU durante el año 2017.</p>	<p>Variable dependiente: Nivel de asociación entre MBL y factores de virulencia</p> <p>Variable independiente: Formación de biopelículas Presencia de piocianina Presencia de MBL</p>	<p>Tipo de investigación: Analítico, prospectivo de corte transversal</p> <p>Diseño de estudio: no experimental</p> <p>Muestra: 120 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> distribuidos en dos grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Casos: 40 productoras de MBL. Representa la totalidad de los casos positivos desde marzo a junio del 2017. • Controles: 80 cepas no productoras de MBL. Es el doble del número de los casos porque la prevalencia actual de <i>P. aeruginosa</i> productora de MBL es menor al 10% (INS, 2011) y se quiere evadir la intervención del azar en la asociación que se está evaluando <p>Técnicas e instrumentos: Ficha de recolección de datos y lector de Elisa.</p> <p>Análisis de datos: Uso del programa estadístico de acceso libre EpiInfo para el análisis de asociación según Fisher y chi-cuadrado con una significancia del 5%.</p>

