

Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

Vicerrectorado de  
**INVESTIGACIÓN**

## **FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**RESISTENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* A CARBAPENEMES “IN VITRO”**

**COMPARADO CON EL SISTEMA AUTOMATIZADO**

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

**AUTOR:**

Sulca Huamani, Joseph Aurelio

**ASESOR:**

Guerrero Barrantes, Cesar Enrique

**JURADOS**

Medina Espinoza, Regina

Lagos Castillo, Morayma Angélica

Paredes Campos, Felipe Jesús

**Lima - Perú**

**2018**

Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes “in vitro” comparado con el  
Sistema Automatizado

Joseph A. Sulca Huamani

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO I PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>8</b>
1.1 Identificación y Descripción del Problema .....	8
1.2 Formulación de las preguntas generales y específicas .....	10
1.2.1 Problema general.....	10
1.2.2 Problemas específicos .....	10
1.3 Objetivos Generales y Específicos .....	10
1.3.1 Objetivo General .....	10
1.3.2 Objetivos Específicos .....	10
1.4 Justificación.....	11
<b>CAPITULO II MARCO TEORICO.....</b>	<b>12</b>
2.1 Antecedentes .....	12
2.2 BASES TEORICAS.....	15
2.1.1 Pseudomonas aeruginosa .....	15
2.1.3 Carbapenemes .....	19
2.1.4 Pruebas de Detección Fenotípica .....	23
2.2 Hipótesis.....	32

2.3	Términos básicos.....	32
<b>CAPITULO III MÉTODO .....</b>		<b>33</b>
3.1	TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	33
3.2	POBLACIÓN Y MUESTRA:.....	33
3.2.1	Población:.....	33
3.2.2	Muestras:.....	33
3.3	VARIABLES Y OPERACIONALIZACION .....	34
3.4	RECOLECCIÓN DE DATOS E INSTRUMENTOS:.....	34
3.5	PROCEDIMIENTOS: MATERIALES Y EQUIPOS.....	35
3.6	ANÁLISIS DE DATOS.....	35
3.7	ASPECTOS ÉTICOS.....	35
<b>CAPITULO IV RESULTADOS.....</b>		<b>36</b>
4.1	RESULTADOS:.....	36
<b>CAPITULO V DISCUSION, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>		<b>39</b>
<b>5.1 Discusión .....</b>		<b>39</b>
5.1	Conclusiones.....	40
5.3	Recomendaciones .....	41
<b>CAPITULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>42</b>
ANEXOS.....		45

## RESUMEN

El propósito del presente estudio fue determinar la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes “in vitro” comparando con el sistema automatizado Phoenix. La metodología empleada para su desarrollo fue descriptiva correlacional, de corte transversal, la población estuvo conformada por 46 cultivos positivos a *Pseudomonas aeruginosa*, de los cuales se seleccionaron 22 como muestra pues presentaron resistencia a los carbapenémicos según el sistema automatizado. Del total de mas muestras trabajadas 13 resultaron ser productoras de carbapenemasas, confirmadas por los bioensayos CMIC y Test de Hodge. Y en las 13 cepas se identificó carbapenemasas tipo metalobetalactamasa por los métodos inhibidores por EDTA y ácido borónico.

*Palabras claves:* Resistencia a Carbapenemes, *Pseudomonas aeruginosa*

## SUMMARY

The purpose of the present study was to determine the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenemes "in vitro" compared to the Phoenix automated system. The methodology used for its development was descriptive correlational, of cross section, the population consisted of 46 positive cultures to *Pseudomonas aeruginosa*, of which 22 were selected as sample because they showed resistance to carbapenems according to the automated system. Of the total of more samples worked, 13 turned out to be carbapenemase producers, confirmed by the CMIC and Hodge Test bioassays. And in the 13 strains carbapenemasas type metalloβ-lactamase was identified by the inhibitory methods by EDTA and boronic acid.

Key words Carbapenem resistance, *Pseudomonas aeruginosa*

## INTRODUCCION

Durante los últimos años el incremento de la resistencia de los diferentes microorganismos causantes de infecciones importantes ha sido significativo. De acuerdo con los Centers for Disease Control (CDC), lo más notorio en un periodo de 5 años es el aumento de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* al imipenem (23%) (Crespo, 2011).

Siendo uno de los microorganismos patógenos que más preocupa, pues presenta diversos mecanismos de resistencia, así como una elevada capacidad para adquirir nuevas formas de resistencia.

El número de cepas multiresistente ha tenido un aumento notable y ello ha hecho que se rescaten antibióticos, como la colistina que se dejaron de utilizar hace años por problemas de toxicidad, ya que en muchas ocasiones constituyen la única opción de tratamiento (Sánchez, 2004).

El laboratorio de microbiología tiene como una de las principales funciones el brindar la información para diagnosticar y tratar los procesos infecciosos, determinando la presencia del microorganismo patógeno y proporcionando la información del antibiótico indicado para el tratamiento.

Para alcanzar este propósito se conocen diferentes sistemas con los cuales se ha venido evaluando la sensibilidad de los antibióticos durante años, en la actualidad se cuenta con equipos automatizados para el diagnóstico clínico, pero aún se requiere la parte confirmatoria de la fase analítica y esto debe realizarse de forma manual en casos de alta resistencia como la que presenta *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes, por ello, ante todo se deben correlacionar los resultados obtenidos de la prueba de susceptibilidad y la experiencia clínica para determinar un diagnóstico adecuado.

## CAPÍTULO I PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Identificación y Descripción del Problema

La microbiología clínica se caracterizó por ser una disciplina manual a diferencia de otras áreas del laboratorio, en la actualidad, se puede contar con equipos automatizados que presentan aplicaciones en identificación microbiana y susceptibilidad, siendo de gran apoyo en el diagnóstico microbiológico. Pero implica una adaptación del personal profesional y técnico, para la interpretación correcta de los resultados obtenidos tanto en identificación del germen patógeno como en los resultados de susceptibilidad, (Bou, 2011).

Las tarjetas o paneles tienen un diseño no flexible de los antimicrobianos ensayados, y que no son aplicables a todas las bacterias. Presentan discrepancias con los métodos convencionales o están aún en evaluación, esto es válido para bacterias como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, y para algunos bacilos Gram negativos no fermentadores, para anaerobios y para algunos antimicrobianos específicos como cefepime en *Pseudomonas aeruginosa*, falsas resistencias o falsas susceptibilidades a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa*.

Es conocido también que algunas  $\beta$  lactamasas inducibles en bacilos Gram negativos requieren una incubación más prolongada para expresar la resistencia.

Respecto a estas discrepancias, la FDA ha recomendado que para errores mayores (que el sistema automatizado informe resistencia siendo la cepa susceptible), la tasa no sea mayor que 1,5%, que la concordancia sea a lo menos de 90% y que las fallas de crecimiento no superen el 10%. (García, 2002).



Es conveniente, por tanto, tener en cuenta la existencia de los mecanismos de resistencias, y estar alerta en la interpretación del antibiograma, sobre todo en especies en particular, siendo el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y su resistencia a Carbapenemes, ya que los sistemas automatizados presentan algunas limitaciones y fracasos en la detección y confirmación de carbapenemasas, debido a que estos aislamientos pueden presentar una aparente susceptibilidad basada en los puntos de corte de CLSI para estos antibióticos, pero en la práctica no responden en la mejora del paciente; Como también por lo observado puede presentar resistencia cuando es sensible al antibiótico.

La realización de este estudio, comprendió la evaluación de los métodos de sensibilidad aplicados a *Pseudomonas aeruginosa* in vitro, comparando con los resultados del equipo automatizado utilizado en nuestro hospital.

## 1.2 Formulación de las preguntas generales y específicas

### 1.2.1 Problema general

- ¿Cuál es la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes “in vitro” comparando con el sistema automatizado Phoenix?

### 1.2.2 Problemas específicos

- ¿En cuánto se difiere los resultados obtenidos por los bioensayos CMIC y Test de Hodge para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* con el sistema automatizado?
- ¿En cuánto se difiere los resultados obtenidos por los métodos inhibidores por EDTA y ácido borónico para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* con el sistema automatizado?

## 1.3 Objetivos Generales y Específicos

### 1.3.1 Objetivo General

- Determinar la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes in vitro y compararlo con el sistema automatizado Phoenix

### 1.3.2 Objetivos Específicos

1. Comparar los resultados obtenidos con los métodos de bioensayo CMIC y Test de Hodge para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* con el sistema automatizado.
2. Comparar los resultados obtenidos con los métodos inhibidores por EDTA y ácido borónico para la detección de resistencia Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* con el sistema automatizado.

#### **1.4 Justificación**

la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes es un problema alarmante en hospitales de Lima, En la práctica clínica hemos observado que cada vez es más frecuente el hallazgo de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a todos los antimicrobianos antipseudomonas disponibles, particularmente en las unidades de cuidados intensivos.

Los sistemas automatizados utilizados en los laboratorios de microbiología si bien son un gran avance para el diagnóstico acortando el tiempo, mejorando la sensibilidad analítica de los métodos, es decir, son capaces de detectar el desarrollo bacteriano en una suspensión, con y sin antimicrobianos, antes que el laboratorista pueda detectar turbidez, sin embargo, en los casos de resistencia es necesario verificar aplicando los métodos convencionales ya que en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se puede observar una resistencia a Carbapenemes con sensibilidad a colistina como única alternativa terapéutica, pero se ha observado que al realizar en forma convencional los cultivos. Si podemos encontrar sensibilidad a los Carbapenemes.

Es por tal motivo que se hace necesario aplicar este conocimiento en la interpretación de las lecturas automatizadas. Por lo expuesto, el presente estudio tiene como objetivo determinar la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes in vitro comparado con el sistema automatizado.

## CAPITULO II MARCO TEORICO

### 2.1 Antecedentes

Gómez, J. (2018), en España, realizó un estudio de casos y controles, cuyo objetivo fue determinar el significado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente y analizar los valores predictivos y pronósticos. La población estuvo conformada por 64 pacientes diagnosticados de infección nosocomial por *P. aeruginosa*, 32 de ellos por cepas sensibles y 32 por cepas multiresistente incluido los carbapenémicos (MDR/XDR-C), ingresados en un hospital de tercer nivel. Se realizó un seguimiento hospitalario hasta el alta o fallecimiento y un control a los 30 días. Se analizaron variables clínico-epidemiológicas y microbiológicas. Teniendo como resultado que la incidencia de cepas MDR/XDR-C fue de 2,3 por 1000 ingresos. Diez de las cuales fueron productoras de metalo- $\beta$ - lactamasa tipo VIM. Los factores predictivos asociados de forma independiente con MDR/XDR-C fueron: la estancia previa en UCI o reanimación, la aparición tras >20 días de estancia y la leucocitosis. Llegando a la conclusión, que los principales factores de riesgo asociados a infecciones por cepas MDR/XDR-C fueron la estancia previa en UCI o Reanimación, la aparición tras >20 días y la leucocitosis. La infección por cepas MDR/XDR-C no se asocia a un aumento de la mortalidad.

Gonzales-Escalante, E. y col. (2013), realizaron un estudio titulado Metallo- $\beta$ -lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Con el objetivo de detectar y caracterizar molecularmente las metalo- $\beta$ -lactamasas (M $\beta$ L) en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, Se evaluó 51 aislamientos de *P. aeruginosa*, con sensibilidad reducida a carbapenémicos. A través del método fenotípico se detectaron M $\beta$ L en el 15,7% de los

aislamientos, La descripción del primer reporte de M $\beta$ L en aislamientos de *P. aeruginosa* en el Perú dio la primera alerta a los equipos de vigilancia epidemiológica intrahospitalaria para promover su control y prevenir su diseminación.

Esparza, G., y col. (2015), realizaron un estudio para determinar estrategias para la implementación y reporte de los puntos de corte CLSI vigentes y pruebas fenotípicas confirmatorias para BLEE y carbapenemasas en bacilos Gram negativos en laboratorios clínicos de Colombia. El Instituto Americano de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) inició un proceso de revisión y actualización de los puntos de corte para microdilución y disco difusión para cefalosporinas (cefazolina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima, ceftazidima), monobactámicos (aztreonam) y carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem). Los cambios se basaron en modelos PK/PD que buscan predecir la respuesta clínica con el uso exclusivo de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y esquemas específicos de dosificación de forma independiente al mecanismo de resistencia expresado. Este nuevo paradigma eliminaría la necesidad de realizar pruebas fenotípicas para beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas para tomar decisiones terapéuticas y permitiría utilizarlas únicamente para fines epidemiológicos. Se hizo necesario generar recomendaciones para los laboratorios clínicos, con el fin de unificar los criterios para la realización de informes de los antibiogramas en bacilos Gram negativos, incluyendo la implementación de los puntos de corte actuales y la aplicación de las pruebas fenotípicas para la detección de BLEE y carbapenemasas.

Ramírez, A., & Joel, J. (2017), determinaron el perfil de resistencia bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. El estudio fue basado en la revisión de resultados de antibiogramas, los cuales fueron los siguientes, aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron 14, y para *Escherichia coli* 10, del total de cultivos positivos solicitados del servicio. Los antibióticos en los que se encontró mayor resistencia para *Pseudomonas aeruginosa* fueron: aztreonam 100%, ceftadizidima 92,3%, piperacilina/tazobactam 91,7%, levofloxacino 84,6%, ciprofloxacino 71,4%, meropenem 64,3%, imipenem/cilastatina 57,1%, a diferencia de cefepima 28,5%, tobramicina 21,4%, amikacina 7,1%, gentamicina 7,1%, colistina 0%, que muestran menor porcentaje de resistencia. En *Escherichia coli*, los antibióticos en los que se encontró mayor resistencia fue en el grupo de las quinolonas con un 90% para ciprofloxacino y 80% a levofloxacino; en las cefalosporinas se observa una resistencia del 100% para cefazolina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima. En los aminoglucósidos la resistencia fue del 100% para amikacina, 50% gentamicina; en sulfonamidas la resistencia fue del 90% para sulfametoxazol/trimetoprima. En las penicilinas el 100% ampicilina/sulbactam y 75% para ampicilina; en carbapenems en los 10 informes de laboratorio no se observó resistencia para ertapenem, imipenem/cilastatina y meropenem. Se encontró alta resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* a los antibióticos utilizados en pacientes de este servicio.

## 2.2 BASES TEORICAS

### 2.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Constituye un importante patógeno intrahospitalario ya que ocupa el tercer lugar (11 %) en frecuencia de aislamientos recuperados de pacientes hospitalizados, según el Sistema informático de Resistencia (SIR) 2016.

*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. Estas características le permiten adherirse y sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias, lo que favorece el inicio de infecciones intrahospitalarias.

La elección del tratamiento antimicrobiano empírico adecuado resulta difícil dada que, por un lado, *P. aeruginosa* es naturalmente resistente a muchos antimicrobianos de uso clínico, y por otro, presenta una elevada capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia que reducen aún más las posibilidades terapéuticas. (Ochoa, 2013)

#### ***A. Resistencia natural***

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo que presenta resistencia intrínseca a varios grupos de antimicrobianos. Durante años se ha invocado la baja permeabilidad de su membrana externa como el elemento clave para explicar esta resistencia natural.

La permeabilidad de *P. aeruginosa* para compuestos hidrófilos sólo es del 1-8% en comparación con la observada en *Escherichia coli*. Ello se debe, fundamentalmente, a que tanto la estructura como la capacidad funcional de la porina principal de *P. aeruginosa*

(OprF) son muy diferentes de las correspondientes a las porinas principales de *E. coli* y otras enterobacterias, limitando significativamente el paso de antimicrobianos.

En los últimos años se ha demostrado que la capacidad de esta bacteria para eliminar los antimicrobianos que penetran en la misma, empleando para ello sistemas de expulsión activa, es tan importante o más que la baja permeabilidad de su membrana externa. Además, la práctica totalidad de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* expresan una  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase C (AmpC, no inhibible por los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas habituales, como el ácido clavulánico) que contribuye a la resistencia a muchos de los  $\beta$ -lactámicos de uso clínico, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefamicinas y muchas de las cefalosporinas de tercera generación. Todo ello reduce notablemente las opciones terapéuticas frente a las infecciones causada por este agente. (Martinez, 2002).

## ***B. Resistencia adquirida***

La resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* a los carbapenems puede ser causada por mutaciones puntuales en determinados genes del cromosoma bacteriano, o bien por la adquisición horizontal de carbapenemasas.

### ***a. Resistencia en Pseudomonas aeruginosa por mutaciones***

Se ha considerado necesaria la combinación de los siguientes tres mecanismos moleculares:

Mutaciones en *oprD* que causen la inhibición de la producción de oprD, una porina que permite la entrada de varios carbapenems al interior de la célula.

Alteración a nivel genético en los reguladores de la expresión de las bombas de expulsión que provoquen una sobreexpresión de estos sistemas.



Mutaciones en los genes reguladores de la expresión de la cefalosporinasa cromosómica AmpC que ocasione la hiperproducción de esta enzima. (El Amin & cols, 2005)

Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos

- 1) Modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas;
- 2) Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa debido a la disminución en la expresión de porinas;
- 3) Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de flujo,
- 4) Modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico.

***a.-  $\beta$ -lactamasas involucradas en la resistencia a carbapenems***

Las dos betalactamasas que con mayor frecuencia pueden llevar a resistencia a los carbapenems son las del grupo AmpC y las carbapenemasas.

**$\beta$ -lactamasas tipo AmpC:** también llamadas cefalosporinasas, median la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefemicinas (cefoxotín y cefotetán) e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC presentan baja afinidad a los carbapenems; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplasmático permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se registre resistencia a los carbapenems.

**Betalactamasas tipo carbapenemasas:** Se han descrito dos tipos de carbapenemasas con base en estudios moleculares. Las primeras son enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual se han denominado carbapenemasas tipo serina. El segundo grupo

son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática; éstas últimas son las denominadas metalo- $\beta$ -lactamasas. (Walsh, Toleman, & cols, 2005)

***b.- Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa***

Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Los carbapenems llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión. Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenems. De esta manera, la velocidad de acumulación de los carbapenems en el espacio periplasmático disminuye notablemente. Normalmente, la pérdida de porinas no confiere una resistencia franca y sólo eleva los valores de la CIM para carbapenems sin superar los puntos de corte que determinan resistencia. (Hancock, 1997).

***c.- Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de bombas de flujo:***

Las bombas de flujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos. La expresión de estas bombas puede ser permanente (expresión constitutiva) o intermitente (expresión que puede inducirse). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna bomba de flujo capaz de expulsar al imipenem.

En *P. aeruginosa*, el sistema de flujo MexABOprM, es capaz de transportar meropenem y su expresión exagerada conduce a la elevación de la CIM del antibiótico. En Enterobacteriaceae no se ha reportado la participación de bombas de flujo en el desarrollo de resistencia a los carbapenems. (Grkovic, & cols. 2002)

### **Modificación del sitio blanco:**

El sitio blanco de los carbapenems, y de todos los  $\beta$ -lactámicos, son las proteínas unidoras de penicilinas (PUP), macromoléculas que hacen parte de la membrana citoplasmática y participan en la síntesis de la pared bacteriana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los  $\beta$ -lactámicos, pero que no afectan su actividad funcional. Aunque la producción de proteínas unidoras de penicilinas con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos no es un mecanismo de resistencia común entre los Gram negativos, el número de reportes se ha incrementado en los últimos años. (Vila & cols. 2002)

### **2.1.3 Carbapenemes**

Son un tipo de antibiótico betalactámico con amplio espectro de actividad bactericida y son sumamente resistentes a las betalactamasas. Esta clase de antibióticos fueron descubiertos originalmente del microorganismo *Streptomyces cattleya*, el cual, produce su propio antibiótico llamado tienamicina.

Las características que diferencian a los carbapenemas de las penicilinas y cefalosporinas, es que en su anillo presenta un átomo de carbono en la posición 1, en sustitución del átomo de azufre que comúnmente tienen la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, de ahí se deriva su nombre. Junto con ello, presentan una insaturación entre el carbono 2 y el carbono 3 del anillo

pentamérico. Además, su espectro de actividad frente a bacterias es el más amplio de todos los antibióticos betalactámicos, los cuales incluyen bacterias Gram positivas y gram negativas, pero no actúan sobre bacterias que se desarrollan intracelularmente como Chlamydia.

Su administración es únicamente por vía intravenosa, dado que su absorción por vía oral es muy poca. Se utilizan comúnmente en los hospitales para tratar infecciones severas. Sin embargo, se han investigado formas nuevas de administración de estos antibióticos, incluyendo la vía oral.

El grupo está conformado por:

- imipenem
- meropenem
- ertapenem
- faropenem
- doripenem
- panipenem
- panipenem/betamipron

#### **A.- IMIPENEM:**

Es un antibiótico betalactámico de uso intravenoso desarrollado en 1985. Pertenece al subgrupo de los carbapenems. Se deriva de un compuesto llamado tienamicina que es producido por la bacteria *Streptomyces scintillans*. El imipenem interfiere con la síntesis de la pared celular de las bacterias sensibles. Es un medicamento altamente resistente a la hidrólisis por betalactamasas. Debe ser administrada por vía intravenosa o intramuscular porque no es absorbida eficazmente en el tracto gastrointestinal.

El imipenem tiene un gran espectro antibacteriano que incluye bacterias Gram-negativas, tanto aerobias como anaerobias. Es especialmente potente contra *Pseudomonas aeruginosa*,

Acinetobacter y especies de Enterococcus. No es efectivo contra *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, *Enterococcus faecium*, *Clostridium difficile*, *Burkholderia cepacia* ni *Stenotrophomonas maltophilia*. Imipenem, como otros medicamentos del grupo carbapenems, son de uso restringido con el fin de evitar la aparición de resistencias bacterianas.

### **Mecanismo de Acción:**

Imipenem actúa como inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana en varias bacterias gram-negativas y gram-positivas. Es estable en presencia de betalactamasas (penicilinasas y cefalosporinasas) producidas por diferentes bacterias. Actúa como potente inhibidor de betalactamasas de bacterias gram-negativas que son resistentes a la mayoría de antibióticos betalactámicos. Su efecto neto se considera bactericida. Cuando se administra solo, el imipenem es degradado rápidamente por la enzima dehidropeptidasa I presente en los riñones. Este efecto se evita administrando cilastatina conjuntamente, que inhibe la enzima dehidropeptidasa I, evitando la inactivación de imipenem. Este efecto conlleva a un aumento de la concentración sérica del fármaco y, también, logra evitar efectos nefrotóxicos.

### **B.- MEROPENEM:**

Es un antibiótico de amplio espectro, utilizado para tratar una gran variedad de infecciones, como meningitis y neumonía. Es un antibiótico betalactámico y pertenece al subgrupo de los carbapenems, al igual que imipenem y ertapenem. Fue desarrollado originalmente por *Sumitomo Pharmaceuticals*, pero los acuerdos de comercialización, fuera de Japón los ha desarrollado Astra Zeneca. Fue aprobado por la FDA el 21 de junio de 1996,1 inicialmente para tratamiento de infecciones intraabdominales y meningitis bacteriana. Con anterioridad se había aprobado en Europa.

El meropenem penetra bien en diferentes tejidos y líquidos corporales, incluyendo líquido cefalorraquídeo, bilis, válvulas cardíacas, pulmón, líquido peritoneal.

**Mecanismo de Acción:**

Meropenem es bactericida excepto contra *Listeria monocytogenes* que es bacteriostático. Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana como otros antibióticos betalactámicos. Es altamente resistente a la degradación por betalactamasas o cefalosporinasas. Las resistencias pueden aparecer debido a mutaciones en las proteínas fijadoras de penicilina (en inglés PBP penicillin binding proteins), producción de o por resistencia a la difusión a través de la membrana externa bacteriana. Al contrario que imipenem, es estable ante la enzima renal dehidropeptidasa-1 humana (DHP-1) y por ello no precisa la coadministración de cilastatina.

**C.- ERTAPENEM:**

Es un antibiótico del grupo de los derivados carbapenems, muy similar a meropenem que posee un grupo 1-β-metilo.

Ertapenem es efectivo contra bacterias Gram negativas. No es activo contra *Staphylococcus aureus*, enterococos resistentes a ampicilina, *Pseudomonas aeruginosa* o especies Acinetobacter. Ertapenem también tiene utilidad clínica contra bacterias anaerobias.

Ertapenem se ha comercializado como primera línea de tratamiento contra infecciones adquiridas en la comunidad. No debe usarse como tratamiento empírico para infecciones adquiridas en medio hospitalario, debido a su falta de actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*. En la práctica, se reserva para utilizarlo contra gérmenes productores de betalactamasa de espectro extendido.

## 2.1.4 Pruebas de Detección Fenotípica

### A.- Prueba de disco de difusión

Este método de empleo rutinario en los laboratorios de microbiología, conocido también como antibiograma, emplea discos de papel absorbente impregnados con una concentración conocida del antibiótico estudiado. Estos discos se colocan en la superficie de una placa de agar Müller Hinton de 4mm de espesor, en la que se inocula una suspensión de la cepa bacteriana a testar, con una turbidez equivalente al 0,5 del nefelómetro de McFarland. Los antibióticos difundirán desde el papel filtro al agar de forma radial creando un gradiente de concentración, que va disminuyendo a medida que se aleja del disco. Luego de una incubación overnight a 35°C, el efecto bacteriostático de las diferentes moléculas testadas, determinará una zona de ausencia de crecimiento alrededor de los discos conocida como “halo de inhibición”, y su diámetro dependerá de la sensibilidad o resistencia de la bacteria testada frente al antibiótico contenido en los discos. (“CLSI Publishes Guideline for In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality...,” 2008).

Los valores actuales de susceptibilidad de las zonas de inhibición que rigen la prueba del antibiograma para Carbapenemes y enterobacterias, de acuerdo al Instituto de estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI 2013), son los siguientes:

Medidas de los halos de inhibición (mm) de Carbapenemes en enterobacterias.

Sustrato	Sensible	Intermedio	Resistente
Ertapenem	$\geq 22$	19 – 21	$\leq 18$
Imepenem	$\geq 23$	20-22	$\leq 19$
Meropenem	$\geq 23$	20-22	$\leq 19$

**Fuentes:** Manual de actualización de resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010.

## ***B.- Métodos de microdilución***

Estos métodos considerados por el CLSI como pruebas de referencias en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), se basa en la preparación de una serie de tubos o placas, con caldo o agar Müller Hinton, a los cuales se le agrega el antibiótico en distintas concentración decrecientes y seriadas (ejemplo: 1, 2, 4, 8, 16 ug/ml, etc); por lo que los valores de MIC reales de un determinado antimicrobiano se encuentra en algún valor situado entre la MIC experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior.(Cantón et al., 2000); Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas; G. Malbrán”, 2001, ClinicalLaboratoryStandardsinstitute. 2008; Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán”, 2012;).

En cada uno de los tubos o placas, se inocula una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio, partiendo de una turbidez 0.5 Mc Farland. Las pruebas se examinan después de una incubación de 18 a 24 horas a 35°C observando el crecimiento microbiano en cada una de las diluciones, y se interpreta la concentración inhibitoria mínima del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado de acuerdo a los parámetros de susceptibilidad (Sensible, Intermedio o resistente) recomendados por el CLSI. (Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá – Grebo, 2010).

En comparación con los métodos de difusión de dilución son técnicamente más complejos y casi más caros, en particular cuando se utilizan paneles comerciales de micro dilución con una gradiente de antibióticos para el estudio de MICs. (Oliver, & cols. 2000).

En este método(Cantón et al., 2000); Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán”, 2012) se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de



antimicrobiano. Las placas luego se inoculan con un replicador (inóculo bacteriano) una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. Se debe tener en cuenta que para cada serie de concentración se debe incluir placas de medio sin antimicrobiano que servirán para controlar el crecimiento y la posibilidad de contaminación durante el proceso de inoculación. El medio a utilizar en la mayoría de los casos es el agar Müller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario agregar algún suplemento.

El pH del medio, una vez sólido y con los suplementos que requieran, ha de estar entre 7.2 y 7.4. Inmediatamente será vertido en las placas Petri estériles con la finalidad de evitar la formación de burbujas que dificultaran la posterior inoculación. Para las placas circulares de 90mm de diámetro son necesarios 20 ml de medio con antimicrobiano (proporción 19 ml de medio por 1ml de solución antimicrobiano).

Posteriormente se dejan solidificar las placas, que se usarán inmediatamente o se almacenarán a 4.8°C. Tras retirarlas del frío, se deben dejar a temperatura ambiente unos treinta minutos antes de proceder a inocular.

Luego se dejarán a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo estén secas, posteriormente se incuban a 35°C durante 16 a 20 horas, procediendo luego a su lectura. La MIC será la menor concentración de antimicrobiano que inhiba completamente el crecimiento bacteriano (no se considera crecimiento a la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue).

Ya que la determinación de la MIC tiene una finalidad clínica, no es aconsejable presentar simplemente los valores absolutos obtenidos con cualquiera de los métodos expuestos. Resulta más útil traducir, mediante una categorización cualitativa, estos valores de MIC. De esta forma se pueden distinguir tres categorías clínicas: sensible, intermedio y resistente, de acuerdo a los

puntos de corte actualizados de la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos (en este caso carbapenems), determinados por el CLSI.

*MIC Interpretive Standards for Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrobial Agent	MIC Interpretive Criteria (µg/mL) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	S	I	R
Imipenem	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem	≤ 2	4	≥ 8

Leyenda: S: sensible, I: intermedio, R: resistente, MIC: concentración mínima inhibitoria

#### ***D.- Métodos automatizados***

La implementación y difusión de los sistemas automatizados, basados en la determinación del MIC, se debe a múltiples factores tales como la estandarización y reproducibilidad de resultados, sumado a ventajas tales como la disminución de errores post-analíticos, utilización de sistemas expertos con detección de múltiples patrones fenotípicos de resistencia, la obtención de estadísticas y la disminución de la carga de trabajo en comparación a los métodos de referencias (técnicas de dilución) de laborioso proceder (García C., 2002); (Jorgensen & Ferraro, 2009).

La FDA que los sistemas comerciales proporcionan resultados de susceptibilidad equivalentes a los resultados generados usando el método de referencia recomendado por CLSI para los microorganismos y agentes antimicrobianos descritos en el inserto de manufactura (Grupo para control de la resistencia bacteriana de Bogotá – Grebo, 2010).

En la actualidad son tres los principales sistemas automatizados, muy similares entre sí, utilizados en los laboratorios de microbiología que han logrado optimizar los procesos de identificación y estudio de sensibilidad antimicrobiana:

Sistemas Vitek de la compañía BioMérieux (Francia)

Phoenix de Becton Dickinson (U.S)

Sistema MicroScan de la compañía Siemens (Alemania).

Sistemas Vitek – Compañía BIOMÉRIEUX (FRANCIA)

### **PHOENIX DE BECTON DICKINSON (U.S.A)**

El sistema PHOENIX (BD Diagnostics (Becton and Dickinson Company), 2009; (Jorgensen & Ferraro, 2009), realiza también una serie de pruebas de identificación (ID) y pruebas de sensibilidad bacteriana (AST, por sus siglas en inglés) al mismo tiempo en paneles combinados. Cada panel es una bandeja de poli estireno moldeada, sellada y auto-inoculante, que posee ciento treinta y seis pocillos con reactivos liofilizados, incluyendo un lado para ID (cincuenta y un pocillos) con sustratos especializados en la identificación de bacterias y un lado para AST (ochenta y cinco pocillos) con concentraciones variables de antibióticos.

Las pruebas empleadas para la identificación son modificaciones de los métodos clásicos bioquímicos convencionales. Poseen pruebas para la fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos (cromogénicos o fluorogénicos), así como sustratos con fuentes de carbono, proceso que ocurre de forma similar en el sistema Vitek 2. Por otro lado, la prueba de sensibilidad bacteriana, versión miniaturizada de la técnica de micro-dilución en caldo (por diluciones dobles), se vale de nefelometría para la preparación del inóculo, además de utilizar un indicador redox para detectar el crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico. En este caso el equipo se encarga de realizar mediciones continuas del indicador, así como de la turbidez bacteriana para establecer el valor de la concentración mínima inhibitoria.

Este sistema permite la identificación bacteriana en un tiempo de lectura de dos a tres horas, y un tiempo de entre seis y diez horas para obtener resultados de susceptibilidad. Concede configurar

alertas de mecanismos de resistencias fundamentales en pacientes críticos y su sistema experto posee más de quinientas reglas de interpretación de resultados, cruzando información entre ID vs AST.

### **Equipo Phoenix**



Fuente: manual de equipos BD (BECTON DICKINSON)

### **Pruebas de confirmación fenotípicas**

#### ***A.- Test de Hodge***

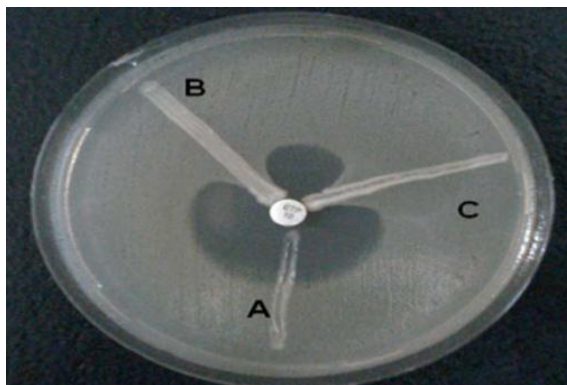
Se realiza de manera similar al procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos, se inocula una placa de agar Müller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (sensible a los Carbapenemes) en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de Macfarlán diluida al 1:10. Luego se coloca un disco de carbapenemo 10ug (imipenem, meropenem o ertapenem) en el centro de la placa, y se inoculan 3 – 5 colonias de la cepa problema (sospechosa de producir una carbapenemasa (repique fresco) formando una estría radial desde el disco de antibiótico central hacia el borde de la placa; la cual debe incubarse

a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16 – 20 horas antes de la lectura de los resultados. (Centers for Disease control and Prevención (CDC). (Calvo, et al. 2011).

El CLSI recomienda en esta prueba la utilización de meropenem y ertapenem; ya que señala que para ciertas bacterias (*Morganella* spp., *Proteus* spp. y *Providencia* spp.) el imipenem suele producir valores de MICS elevados para mecanismos diferentes a carbapenemasas, además de poseer baja performance para el tamizaje de estas enzimas.

Como resultado de esta prueba, se debe evidenciar la deformación del halo de inhibición justo en la proximidad de la estría de la cepa portadora de carbapenemasa. Esta deformación en el halo es debida a que la cepa de *E. coli* (sensible a carbapenems), aprovecha la producción de carbapenemasa por la cepa ubicada en la estría, para avanzar hacia el disco de antibiótico central.

### Test de Hodge



Fuente: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia (Bogotá)

- A. Control negativo *E. coli* ATCC 25922 (aislamiento no productor de carbapenemasas)
- B. Control positivo *K. pneumoniae* (aislamiento productor de carbapenemasa KPC-3)
- C. Aislamiento en estudio *K. pneumoniae* (resultado positivo para producción de carbapenemasa).

### ***B.- Prueba de sinergia con ácido borónico***

Diversos estudios, incluidos los del centro de referencia OPS para Sudamérica (INEI ANLIS “Dr. Carlos Malbrán” – Argentina) consideran esta prueba como una herramienta de gran utilidad para diferenciar correctamente las bacterias productoras de enzimas KPC, de aquellas productoras de MBL o de cualquier otra betalactamasa de espectro extendido. (Pasteran, & et al., 2009).

La técnica se apoya en la prueba de disco de difusión, en la sobre una placa de agar Müller-Hinton se extiende una suspensión del microorganismo sospechoso a estudiar de manera similar a la efectuada en un antibiograma; a partir de suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. Sobre la superficie del agar se colocan de manera indistinta dos discos de carbapenems (10ug – imipenem, meropenem o ertapenem) y enseguida al lado de cada uno de estos sustratos, se aplican discos de los mismos antibióticos, pero combinados con un inhibidor específico de carbapenemasas clase A o de enzima KPC, generalmente obtenidos de alguna casa comercial o por adición de un compuesto derivado del ácido borónico al disco de carbapenem. (Pasteran et al., 2009).

La lectura de la placa se realiza tras una incubación de 18 – 24 horas a 35 - 37°C, considerándose un resultado positivo la observación de un incremento  $\geq 5$ mm en el halo de inhibición del disco de antibiótico combinado con el derivado de ácido borónico, comparado con el disco de carbapenemo por sí mismo. (Pasteran et al., 2009).

Este aumento del diámetro del halo de inhibición es debido a la acción inhibidora del ácido borónico sobre la enzima KPC liberada por la cepa bacteriana. Es posible también observar esta sinergia con pruebas de aproximación de discos (1-2 cm), en las que el ácido borónico es colocado en un disco independiente (300 ug por disco). (Pasteran et al., 2009);(Nicola et al., 2012).

### ***C.- Test de doble Hodge modificado***

Este método diseñado por investigadores del centro de referencia OPS para Sudamérica, Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán” (Pasteran, et al., 2010), consiste en la adición de dos discos más a la prueba de MHT, uno a cada lado del carbapenem ubicado en la parte central del agar. Dependiendo qué enzima se enfoque en la detección, estos discos pueden estar compuestos por la combinación de un antibiótico más un inhibidor específico de determinado grupo de enzimas. Uno de los discos dirigidos a la detección de la enzima sospechosa y el otro dirigido a contrarrestar un posible resultado falso por la presencia de una enzima diferente. La elección de estos discos facilitará la visualización de la enzima sospechosa al generar o no una deformación de los halos de inhibición, tal y como sucede en la prueba del MHT.

### ***D. Método inhibidor EDTA***

Las MBLs necesitan de iones bivalentes,  $Zn^{++}$ , como cofactor para la reacción de hidrólisis de  $\beta$ -lactámicos, por tanto, estas enzimas pueden ser identificadas por test fenotípicos. Para la búsqueda en el laboratorio de las enzimas MBL se han propuesto ensayos fenotípicos basados principalmente en la acción de agentes quelantes como el etilendiaminotetracético (EDTA), capaces de interaccionar con el zinc necesario para la acción catalítica de dichas enzimas. Estos ensayos consisten en colocar un disco de imipenem (IM) y un disco de EDTA a una distancia de 15 mm de borde a borde y otro de meropenem (ME) contrapuesto al de IM.

## 2.2 Hipótesis

El presente estudio no plantea hipótesis por no ser experimental.

## 2.3 Términos básicos

- **Alginato:** Polisacárido capsular que permite a las bacterias infectantes adherirse a la superficie de las células y formar biopelículas que, a su vez, protegen a las bacterias de los antibióticos y del sistema inmune del huésped
- **Pili:** Apéndices de la superficie bacteriana que permiten su adherencia a receptores de gangliósido GM-1 localizados en la membrana de las células epiteliales del huésped.
- **Neuraminidasa:** Elimina los residuos de ácido siálico de los receptores gangliósido GM-1, lo que facilita la unión de los pilis.
- **Lipopolisacárido:** Exotoxina que causa síndrome de sepsis.
- **Exotoxina A:** Provoca destrucción tisular, inhibición de la síntesis proteica; interrumpe la actividad celular y la respuesta de los macrófagos.
- **Exoenzima S:** Inhibe la síntesis proteica.
- **Fosfolipasa C:** Destruye la membrana citoplasmática; desnaturaliza la sustancia tensoactiva pulmonar; inactiva las opsoninas.
- **Leucocidina:** Inhibe la función de neutrófilos y linfocitos.
- **Piocianinas:** Suprime a otras bacterias e interrumpe la actividad de los cilios respiratorios; produce daño oxidativo de los tejidos.



## CAPITULO III MÉTODO

### 3.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Por el tipo de investigación el presente estudio reúne las condiciones necesarias para ser denominada como, descriptivo – correlacional – transversal.

### 3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA:

#### Ámbito temporal y espacial:

En un Hospital de Lima, periodo de enero a marzo 2018

#### 3.2.1 Población:

Conformada por todos los cultivos positivos a *Pseudomonas aeruginosa*, aislados de enero a marzo del 2018.

#### 3.2.2 Muestras:

Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a Carbapenemes.

##### ➤ Marco muestral:

Se trabajará con la relación de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, registrada en el equipo automatizado PHOENIX del Área de microbiología del laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Hospital.

##### ➤ Diseño muestral:

El diseño muestral estará facilitado por el tipo de Muestreo por conveniencia.

##### ➤ Criterio de inclusión:

Todos los cultivos positivos a *Pseudomonas aeruginosa*.

##### ➤ Criterio de exclusión:

Todos los cultivos negativos *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.3 VARIABLES Y OPERACIONALIZACION

Variable	Indicador	Valores	Tipo de variable
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a Carbapenemes por el método automatizado.	Cepa resistente a Imipenem y Meropenem	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensible (<math>\leq 2</math> ug/mL)</li> <li>- Intermedio (4 ug/mL)</li> <li>- Resistente (<math>\geq 8</math> ug/mL)</li> </ul>	Nominal
Bioensayos CMIC	Inactivación del disco carbapenemico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Positivo</li> <li>- Negativo</li> </ul>	
Bioensayo Test de Hodge	Deformación del halo en la proximidad de la estria de la cepa problema.		
Método con inhibidores EDTA	Sinergismo entre los discos carbarbapemicos con el ácido borónico.		
Método con inhibidor ácido borónico	Sinergismo entre los discos carbarbapemicos con el EDTA.		

### 3.4 RECOLECCIÓN DE DATOS E INSTRUMENTOS:

DATA de un hospital de Lima de tercer nivel; DATA del EPI-CENTER de PHOENIX, cuadernos de registro del servicio de Microbiología

### **3.5 PROCEDIMIENTOS: MATERIALES Y EQUIPOS.**

- **Criterios de selección de Pseudomonas aeruginosa probable productora de carbapenemasas.**

Se seleccionarán las cepas que el equipo PHOENIX detecta como probable productor de Carbapenemasas pues presenta resistencia a Imipenem y Meropenem.

### **3.6 ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa computarizado MICROSOFT EXCEL 2010 el cual nos permitirá hacer uso eficiente de las herramientas cuantitativas principales existentes para evaluar la eficacia de las pruebas diagnósticas y contribuir a su uso racional, considerando un nivel de confianza del 95%.

### **3.7 ASPECTOS ÉTICOS**

Se tendrá en cuenta los códigos de ética vigente, y se mantendrá la reserva correspondiente de los resultados.

## CAPITULO IV RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS:

De los 46 cultivos positivos a *Pseudomonas aeruginosa*, procesadas en el sistema automatizado Phoenix, 22 cultivos presentaron resistencia a los Carbapenemes, lo que indica una posible producción de Carbapenemasas, de acuerdo a la sensibilidad presentada para Cefepime, se puede interpretar que 9 de los cultivos resistentes a Carbapenemes son AMPC, como se puede observar en la tabla 1.

**Tabla 1. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Carbapenemes, Sistema automatizado**

<b>I</b>	<b>M</b>	<b>FEP</b>	<b>Interpretación</b>	
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	S	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	S	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	S	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	S	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	I	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	S	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	
R	R	S	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	I	posible productor de carbapenemasa	<b>posible ampC por mostrar sencibilidad al cefepime</b>
R	R	R	posible productor de carbapenemasa	

Leyenda: I: Imipenem, M: Meropenem, FEP: Cefepime, R: Resistente, I: Intermedio, S: Sencible.

Fuente: Servicio de Microbiología de un Hospital de Lima de enero a marzo 2018

De acuerdo a los resultados obtenidos por el sistema automatizado comparado con los métodos de bioensayo CMIC y Test de Hodge, para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*, se confirmó que 13 de los 22 cultivos eran positivos a carbapenemasas, como se puede observar en Tabla 2.

**Tabla 2. Sensibilidad del método automatizado comparado con los métodos de bioensayo CMIC y Test de Hodge, para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa***

I	M	Interpretacion por el método automatizado	CMIC	Hodge	Interpretación
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-	
R	R	posible productor de carbapenemasa	+	+	productor de carbapenemasas

Leyenda: I: Imipenem, M: Meropenem, R: Resistente

Fuente: Servicio de Microbiología de un Hospital de Lima de enero a

De acuerdo a los resultados obtenidos por el sistema automatizado comparado con los métodos Inhibidores EDTA y ácido borónico, para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*, se confirmó que 13 de los 22 cultivos eran positivos a carbapenemasas, como se puede observar en la tabla 3.

**Tabla 3. Sensibilidad del método automatizado comparado con los métodos de inhibidores EDTA y Ac. Borónico para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa***

I	M	Interpretación del método automatizado	Ac. Borónico	EDTA
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	-
R	R	posible productor de carbapenemasa	-	+

Leyenda: I: Imipenem, M: Meropenem, R: Resistente

Fuente: Servicio de Microbiología de un Hospital de Lima de enero a marzo

## CAPITULO V DISCUSION, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Discusión

Según los datos obtenidos del estudio realizado por Gómez, J. 2018, en España, quien trabajo con una población de 64 pacientes diagnosticados con *Pseudomonas aeruginosa*, donde obtuvo 32 cepas multirresistente, de las cuales diez fueron confirmadas como productoras de metalo- $\beta$ -lactamasa. En nuestro estudio observamos resultados similares, nuestra población estuvo conformada por 46 pacientes diagnosticados con *Pseudomonas aeruginosa* de las cuales 22 cepas fueron resistentes a los Carbapenemes confirmándose 13 de ellas como productoras de metalo- $\beta$ -lactamasa.

Comparando el estudio realizado por Gonzales-Escalante, E. y col. (2013) en Lima, quienes en 51 cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems, identificaron 9 Metalo- $\beta$ -lactamasas, mientras que en nuestro estudio donde de un total de 42 cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Carbapenemes se identificó 13 Metalo- $\beta$ -lactamasas, concluimos que hay un mayor número de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes.

En este estudio, 22 cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron alarmas a posible presencia de carbapenemasas, para lo cual se procedió a realizar la confirmación por el método manual, obteniendo como resultado: 13 fueron carbapenemasas positivas. se confirmó utilizando las técnicas de bioensayos y los métodos inhibitorios. Los 9 restantes se evidencio sensibilidad a cefepime, sospechando la presencia de AMPC.

De esta manera se confirma las limitaciones de los sistemas automatizados en la detección de resistencias bacterianas.

## 5.1 Conclusiones

- De los 22 resultados positivos a *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Carbapenemes obtenidos por el sistema automatizado, sólo 13 resultaron realmente resistentes a Carbapenemes confirmados con los métodos “in vitro”.
- De acuerdo a los resultados obtenidos por el sistema automatizado comparado con los métodos de bioensayo CMIC y Test de Hodge, para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*, se confirmó que 13 de los 22 cultivos eran positivos a carbapenemasas, difiriéndose en 9 resultados.
- De acuerdo a los resultados obtenidos por el sistema automatizado comparado con los métodos Inhibidores EDTA y ácido borónico, para la detección de resistencia a Carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*, se confirmó que 13 de los 22 cultivos eran positivos a carbapenemasas, difiriéndose en 9 resultados.



### 5.3 Recomendaciones

- Las alertas de resistencias emitidos por el sistema automatizados deben ser confirmados con los métodos in vitro.
- Es conveniente, por tanto, tener en cuenta la existencia de los mecanismos de resistencias, y estar alerta en la interpretación del antibiograma, sobre todo en especies en particular, siendo el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y su resistencia a Carbapenemes.
- El empleo de sistemas automatizados implica una adaptación del personal profesional y técnico, para la interpretación correcta de los resultados obtenidos tanto en identificación del germen patógeno como en los resultados de susceptibilidad.
- Se debe tomar en cuenta las recomendaciones de la FDA respecto a las discrepancias, que indica para errores mayores (que el sistema automatizado informe resistencia siendo la cepa susceptible) la tasa no sea mayor que 1,5%, que la concordancia sea a lo menos de 90% y que las fallas de crecimiento no superen el 10%

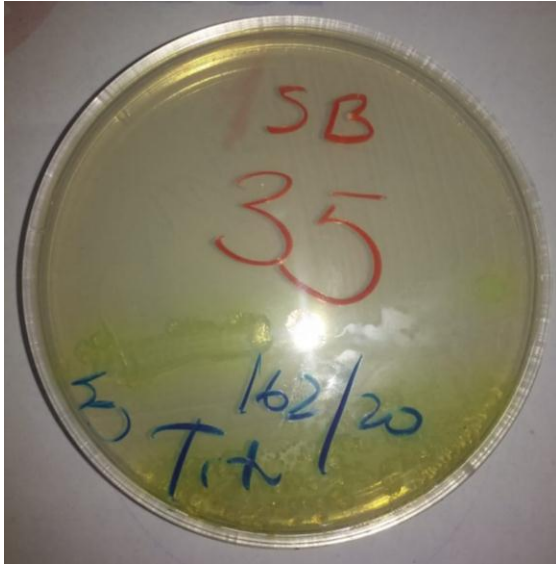
## CAPITULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barba, P., Paredes, D. O., Yauri, M. F., Riglos, M. R., Zurita, J., & Alcocer, I. (2017). Detección de genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs) en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 33(1-2), 46-56.
2. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969-976.
3. Crespo, M. D. P. (2011). La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla? *Infectio*, 9(1).
4. El Amin N., Giske C.G., Jalal S., Keijser B., Kronvall G., Wretling B. (2005) Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do-not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS*; 113(3): 187-96.
5. Esparza, G. F., Motoa, G., Robledo, C., & Villegas, M. V. (2015). Asociación Colombiana de Infectología.
6. Gómez, J. (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017.
7. Gómez-Garcés, J. L., Gil-Romero, Y., Sanz-Rodríguez, N., Muñoz-Paraíso, C., & Regodón-Domínguez, M. (2016). Actividad in-vitro de fosfomicina, sola o en

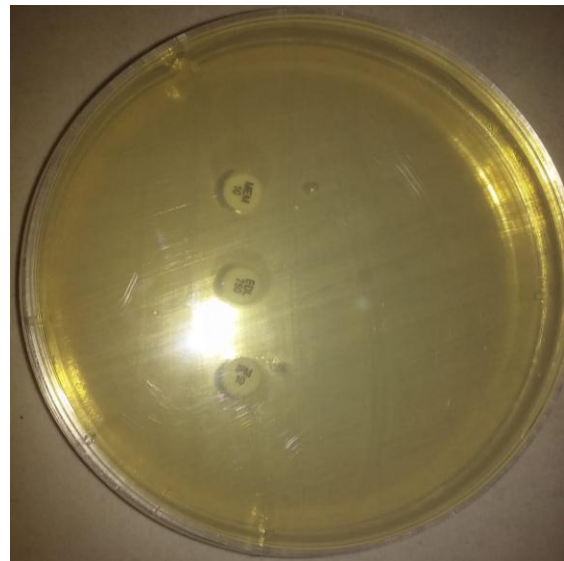
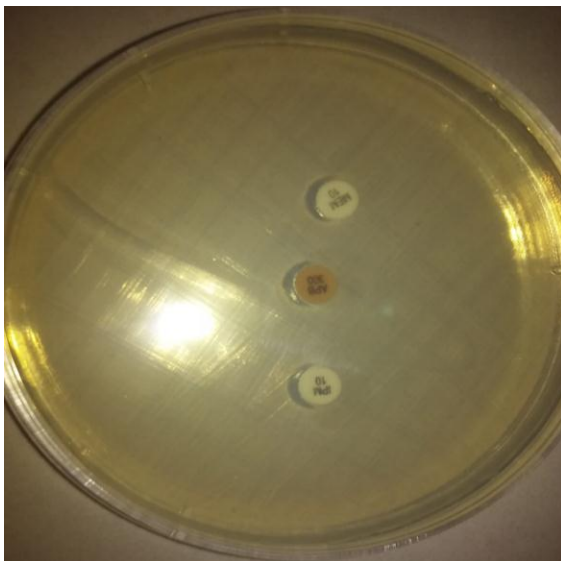
- combinaciones, frente a aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(4), 228-231.
8. Grkovic, S., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(4), 671-701.
  9. Hancock, R. E. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, 5(1), 37-42.
  10. Martínez, L. M., & Hernández, Á. P. (2002). Mecanismos de resistencia a las carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*.
  11. Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 29(7), 524-534.
  12. 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.
  13. Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., & Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288(5469), 1251-1253.
  14. Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., & Corso, A. (2009). Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 47(6), 1631-1639.

15. Ramírez, A., & Joel, J. (2017). Perfil de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, aisladas en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, octubre-diciembre 2016.
16. Sánchez, A., Salso, S., Culebras, E., & Picazo, J. J. (2004). Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimioter*, 17, 336-340.
17. Vila, J., & Marco, F. (2002). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(6), 304-312.
18. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo- $\beta$ -lactamasas: the quiet before the storm?. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 306-325.
19. Gonzales-Escalante, E., Vicente-Taboada, W., Champi-Merino, R., Soto-Pastrana, J., Flores-Paredes, W., Lovera-García, M., ... & León-Sandoval, S. (2013). Metallo- $\beta$ -lactamasas en aislamientos clínicos de *pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 30(2), 241-245.

## ANEXOS



Cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas en el hospital



Colocación de discos de imipenem y meropenem para las pruebas de sinergismo con EDTA y Ac.

MATRIZ DE CONSISTENCIA LOGICA

Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a Carbapenemes “in vitro” comparado con el Sistema Automatizado

Problema	Objetivo	Variable	Definición	Indicador	Escala/Valores
<p><b>Problema Principal</b> ¿Cuál es la resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a Carbapenemes in vitro comparando con el sistema automatizado Phoenix?</p>	<p><b>Objetivo principal</b> Determinar la resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a Carbapenemes in vitro comparando con el sistema automatizado Phoenix</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a Carbapenemes</p>	<p>Bacilo gram negativo, no fermentadora que presenta resistencia los Carbapenemes.</p>	<p>Característica fenotípica Color verde brillante</p>	<p>Sensible /Resistente</p>
<p><b>Problemas Especifico</b></p> <p>¿En cuánto se difiere los resultados obtenidos por el bioensayo CMIC para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con el sistema automatizado?</p> <p>¿En cuánto se difiere los resultados obtenidos por el bioensayo de Test de Hodge modificado para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con el sistema automatizado?</p> <p>¿En cuánto se difiere los resultados obtenidos por el método inhibidor por EDTA y ácido borónico para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con el sistema automatizado?</p> <p>¿En cuánto se difiere los resultados obtenidos por el método inhibidor por ácido borónico para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con el sistema automatizado?</p>	<p><b>Objetivos Especificos</b></p> <p>Determinar la sensibilidad del método automatizado comparado con el método de bioensayo CMIC, para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Determinar la sensibilidad del método automatizado comparado con el método de ensayo del Test de Hodge modificado, para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Determinar la sensibilidad del método automatizado comparado con el método inhibidor con ácido borbónico, para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Determinar la sensibilidad del método automatizado comparado con el método inhibidor con EDTA, para la detección de resistencia a Carbapenemes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>Presencia o no de enzimas responsables en la degradacion del carbapenem.</p>	<p>Mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción del agente antimicrobiano</p>	<p>Inactivación del disco de Imipenem.</p>	<p>Positivo Negativo</p>
		<p>Evidenciar la deformación del halo de inhibición justo en la proximidad de la estría de la cepa portadora de carbapenemasa</p>			
		<p>Evidenciar un sinergismo entre los discos carbapenémicos con el ácido borónico.</p>			
		<p>Evidenciar un sinergismo entre los discos carbapenémicos con el EDTA.</p>			
		<p>Productor de carbapenemasas tipo metolobetalactamasa o KPC</p>			