



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

**DETECCIÓN DE MECANISMOS DE
RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS EN
Pseudomonas aeruginosa AISLADAS EN EL
HOSPITAL NACIONAL EDGARDO
REBAGLIATI MARTINS EN EL PERIODO
JUNIO - JULIO 2018**

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR
EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**

Lic. TM. PURIZACA FARFÁN ROSA LINA

LIMA- PERÚ

2018

ASESOR

Dr. TAMARIZ ORTÍZ JESÚS HUMBERTO

DEDICATORIA

A mis hijas: Pamela Alejandra y Lesly Fiorella.

A mi hijo Miguel Angel (†).

A “Sundari”.

AGRADECIMIENTOS

Al Ser Supremo, por darme la fortaleza necesaria en todo momento.

A mi asesor: Dr. Jesús Humberto Tamariz Ortíz, gracias por su valioso tiempo, sus conocimientos, orientación y constante apoyo durante la elaboración del presente proyecto.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por otorgar la oportunidad a los profesionales de seguir desarrollándose.

A todos los integrantes del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, con quienes he compartido la mayor parte de mi vida profesional, gracias por su colaboración, por su gran compañerismo y/o valiosa amistad.

A mis seres queridos: a mi mamá Lina, por sus cuidados y sabios consejos; a mis padres, por el cariño y apoyo que siempre me brindan; a mis hijas, por su amor, colaboración y especialmente por su comprensión, y a “Sundari”, por su compañía, sobre todo en mis largas noches de estudio.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.
- Universidad Peruana Cayetano Heredia.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Justificación	2
1.3. Antecedentes a nivel mundial	3
1.4. Antecedentes en América Latina	5
1.5. Antecedentes a nivel nacional	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Carbapenemes	7
2.1.1. Mecanismo de acción	8
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.2.1. Mecanismos de resistencia	9
2.2.1.1. Mecanismos de resistencia intrínsecos	10
2.2.1.2. Mecanismos de resistencia adquiridos	11
2.2.1.3. Mecanismos de resistencia adaptativos	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. Diseño del estudio	14
4.2. Población	14
4.3. Criterios de elegibilidad	15
4.3.1. Criterios de inclusión	15
4.3.2. Criterios de exclusión	15
4.4. Muestra	15
4.4.1. Universo de estudio	15
4.4.2. Tamaño de muestra	15
4.5. Variables	15
4.6. Procedimientos y Técnicas	16
4.6.1. Procesamiento de las muestras	16
4.6.2. Identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobiana	17
4.6.2.1. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenémicos.	17
4.6.2.2. Detección genotípica de mecanismos de resistencia a carbapenémicos.	19
4.7. Plan de análisis	21
4.8. Aspectos éticos	21
5. BIBLIOGRAFÍA	22
6. PRESUPUESTO	26
7. CRONOGRAMA	27

DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS EN *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS EN EL HOSPITAL NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS EN EL PERIODO JUNIO - JULIO 2018.

Resumen

Pseudomonas aeruginosa, patógeno oportunista y nosocomial, presenta resistencia intrínseca a diversos antibióticos, adquiere, transmite e induce resistencia a éstos; es responsable de infecciones nosocomiales con altos índices de morbi-mortalidad. El tratamiento de elección generalmente, en cepas multirresistentes, son los carbapenémicos, presentándose ya resistencia en este grupo de antibióticos, se hace necesario estudiar los mecanismos implicados en dichas resistencias.

El objetivo del presente trabajo es identificar fenotípica y genotípicamente los mecanismos de resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en muestras clínicas en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, en el período junio – julio del 2018. Se realizará un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal; estudiándose los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* que presenten multirresistencia, resistente extrema y panresistencia, a partir de muestras clínicas. La identificación y pruebas de sensibilidad serán realizadas con metodología automatizada. Mediante la interpretación del antibiograma se deducirán los posibles mecanismos de resistencia, se realizará la identificación fenotípica de la resistencia debido a sistemas de eflujo utilizando el inhibidor carbonyl cyanide 3-clorofenilhidrazona; para la detección de carbapenemasas, se realizará el método modificado de inactivación del carbapenémico y el método de sinergia de doble discos, empleándose: imipenem, meropenem, ácido etilendiaminotetraacético/mercaptopacetato de sodio, ácido 3-aminofenilborónico y cloxacilina. Esta detección fenotípica será confirmada genotípicamente, mediante técnicas moleculares, lo cual será realizado por PCR convencional.

La identificación de mecanismos de resistencia a carbapenémicos será de gran ayuda para el tratamiento, prevención y control de la diseminación de este patógeno. Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, multirresistencia, resistencia extrema, panresistencia, mecanismos de resistencia, carbapenemes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La resistencia a carbapenémicos es un problema a nivel mundial. La OMS publicó el 27 de febrero del 2017, la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la cual *P. aeruginosa*: resistente a carbapenémicos fue categorizada como “Prioridad 1: Crítica”, dicha categoría incluye a las bacterias que son consideradas con mayor resistencia y especialmente peligrosas en hospitales (1).

P. aeruginosa es la especie más importante en patología humana, presentando cepas multirresistente (MDR), con resistencia extrema (XDR) y panresistentes (PDR) (2).

La gravedad de las infecciones causadas por este microorganismo depende del tipo de paciente, localización de la infección, enfermedad de base, antibioticoterapia, entre otras (3). Genera una gran morbi-mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, de las unidades de cuidados intensivos (UCIs) (neumonías asociadas a ventilación mecánica), con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o con fibrosis quística (donde es el patógeno más prevalente), así como también en infecciones en pacientes quemados, entre otros (4-6).

Los carbapenémicos están incluidos dentro de los antibióticos que presentan mayor espectro de actividad frente a las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Diversos mecanismos de resistencia afectan a este grupo de antimicrobianos, pudiendo ser de origen cromosómico, producto de mutaciones en determinados genes o debido a la adquisición, mediante transferencia horizontal, de enzimas llamadas carbapanemasas (7-10).

La caracterización de los mecanismos de resistencia es de gran importancia para orientar el tratamiento antimicrobiano, así como para conocer la diversidad genética

(11) y provee información para implementar las medidas de prevención y control del grave problema de la resistencia antibiótica.

1.2. Justificación

El Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM) es una de las instituciones de salud más grande del país, presta atención ambulatoria y de hospitalización (+1,800 camas); cuenta con diversos servicios, entre ellos la unidad de cuidados intensivos, que incluye las especialidades de medicina general, neurocirugía, cardiovascular, pediatría y neonatología. La complejidad de la institución de salud, permite que la administración de antimicrobianos revista también una complejidad similar, lo que se refleja en elevados niveles de resistencia.

El presente estudio identificará los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en *P. aeruginosa*, aisladas de muestras clínicas, información que permitirá conocer la distribución de los mecanismos de resistencia por muestras clínicas, servicio de hospitalización y características demográficas de los pacientes, a fin de implementar las medidas de prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones ocasionadas por el patógeno; así mismo, la implementación de protocolos de terapia antibiótica específicos, lo que ha demostrado mayor efectividad.

Cabe señalar que antibióticos como la colistina, que ingresó como medicamento en los años 50, pero que se discontinuó en los años 80 debido a su nefrotoxicidad, ha vuelto a ser introducida (reduciéndose las complicaciones que presentaba anteriormente) para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* XDR (12), sin

embargo, su aplicación terapéutica dependerá del mecanismo específico que presente la bacteria.

Conocer los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* más frecuentes en el HNERM, permitirá predecir las posibilidades de las nuevas opciones terapéuticas, como es el caso del ceftalozano-tazobactam y la ceftazidima - avibactam (13), el primero de ellos ya disponible en nuestro medio y que puede ser empleado en infecciones abdominales e ITUs complicadas en bacterias productoras de BLEE, pero no en productoras de carbapenemasas, siendo en la actualidad la cefalosporina con mayor actividad frente a *P.aeruginosa* ya que es estable en presencia de betalactamasas AmpC y no se ve afectado por la pérdida de porinas de membrana externa (OprD) o por la presencia de bombas de expulsión activa.

Por consiguiente, la elección del tratamiento antibiótico más adecuado, no solo depende de los resultados de la prueba de sensibilidad *in vitro*, es necesario conocer los mecanismos de resistencia implicados, lo que contribuye a evitar la selección de cepas mutantes y su diseminación, así como a disminuir las posibilidades de fracaso terapéutico. Adicionando a lo mencionado, la implementación de programas de uso adecuado de antibióticos en base a esta información, recomendados por el CDC en el 2014 (10), contribuirá al control de la resistencia a los antimicrobianos.

1.3. Antecedentes a nivel mundial

En el año 2007, la presencia de carbapenemasas en *Pseudomonas* detectadas en hospitales españoles, era relativamente baja, un estudio multicéntrico en el que se analizaron 236 cepas (aisladas entre 2003 y 2007), encontró que la resistencia a carbapenemes era por mutaciones cromosómicas, sólo una cepa (0.4%) era

productora de carbapenemasa (VIM-2). En el 2008, otro estudio multicéntrico, mostró que la prevalencia habría aumentado presentándose un 4% de resistencia a imipenem (VIM-2), detectándose también nuevas variantes (VIM -13) (4).

Según datos presentados en el “VIII Curso de Actualización en Infecciones Nosocomiales realizado en México – 2013”, *P. aeruginosa*, presentaba una resistencia al imipenem en: Europa 17.4%; Asia- Pacífico 18.1%; América del Norte: 15.1% y América Latina 35.8% (Fuente: www.testsurveillance.com - 07 Enero 2009) (14).

En el 2015, Hong D J y col. (15) realizaron una recopilación bibliográfica de la epidemiología global con informes publicados de 50 países, encontrándose alrededor del 50% de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. En Canadá y República Dominicana, se encontró la menor tasa de resistencia (3.3% y 8% respectivamente); por el contrario, en Brasil, Perú, Costa Rica, Rusia, Grecia, Polonia, Irán y Arabia Saudita, esta fue superior al 50%. Resaltaron la importancia de los estudios epidemiológicos y la caracterización molecular debido a que los genes de las metalo - β - lactamasas (MBL) pueden encontrarse en el cromosoma o en elementos móviles (integrones, transposones, plásmidos), los cuales facilitan su propagación entre diferentes géneros y especies bacterianas a través de una transferencia horizontal, codificando resistencia no solo a carbapenémicos sino también a otros antimicrobianos.

Un estudio realizado en España en el Hospital San Pedro Logroño, por Estepa V. y col. en el 2016 (16), señala que durante los años 2008 al 2011, a partir de 60 pacientes se obtuvieron 85 aislamientos de *P. aeruginosa* que presentaban

resistencia a carbapenémicos, 61 cepas fueron seleccionadas para dicho estudio, todas mostraron un fenotipo de multirresistencia, pero en ninguna se detectó genotípicamente la presencia de carbapenemasas, lo que indica que la resistencia no era debido este mecanismos, se demostró que la resistencia era debida al alto polimorfismo en el gen OprD y a la presencia de elementos de inserción que inactivarían la porina OprD.

1.4. Antecedentes en América Latina

El año 2011, en Argentina, se reportó que la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, puede deberse a la interacción de diferentes mecanismos de resistencia, posteriormente en un estudio retrospectivo realizado entre diciembre del 2004 al 2005 en el Hospital Eva Perón de Buenos Aires, 20 aislamientos de *P. aeruginosa* caracterizados como productoras de MBL (IMP-13), solo 5 fueron resistentes a carbapenemes, en los cuales se presentó un déficit de OprD, ratificando lo mencionado (8).

En Brasil, en un reporte del 2011, se menciona que los mecanismos de resistencia a carbapenemes están generalmente relacionados a la producción de MBL (SPM-1), pérdida de porina OprD y sobreexpresión de bombas de eflujo (17).

En Colombia, el año 2014, fueron estudiados 57 aislamientos de *P. aeruginosa*, provenientes de siete regiones, 55 de los cuales, presentaron resistencia a carbapenémicos, siendo 43 de ellos productores de carbapenemasas con un perfil de multirresistencia, encontrándose 33 positivos para el gen *blaVIM*, 9 para el gen *blaKPC* y uno para ambos genes (18).

En Venezuela el año 2015, se realizó un estudio en el Complejo Hospitalario Universitario “Ruiz y Páez”, Ciudad Bolívar, evaluando la relación clonal de 10 aislamientos *P. aeruginosa* productoras de MBL, aisladas entre los años 2008 al 2014, comprobándose la multirresistencia y la presencia de MBL de tipo VIM, en todas ellas (19).

En Chile el 2015, el Instituto de Salud Pública, refiere que presentan resistencia o resistencia intermedia al imipenem el 38.5% de 2,494 y al meropenem el 36.8% de 2,023 cepas estudiadas (20).

1.5. Antecedentes a nivel nacional

En el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en el año 2008, se reportó que en 186 aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes o con sensibilidad disminuida a imipenem y meropenem, (recolectados de enero a octubre del mismo año), se detectó fenotípicamente la presencia de MBL en 13 aislamientos (6.99%) (21).

En diciembre del 2009, en Lima-Perú, se llevó a cabo la reunión anual de la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos con la participación de representantes de 21 países de la Región de las Américas. El Instituto Nacional de Salud, presentó la evaluación del desempeño de 40 instituciones, laboratorios participantes en la red de vigilancia de la resistencia, pertenecientes a 11 departamentos de nuestro país. Observándose desde aquellos años que *P. aeruginosa*, presentaba un perfil de multirresistencia, con porcentajes de 68% y 63% para imipenem y meropenem respectivamente, no indicándose los mecanismos de resistencia implicados (22).

El Ministerio de salud, presenta en el 2012, el perfil de resistencia en *P. aeruginosa* aisladas en pacientes hospitalizados con una multirresistencia por encima del 30%,

siendo los porcentajes para imipenem y meropenem de 60 y 56% respectivamente; como en años anteriores no indican los mecanismos de resistencia implicados (23).

En el 2013, en un estudio en seis hospitales de Lima, de un total de 51 aislamientos (recolectadas en agosto del 2011), los cuales presentaron resistencia a ceftazidima y sensibilidad disminuida a carbapenémicos, el 15.7% eran carbapenemasas de tipo metalo- β -lactamasas (24).

Un estudio realizado en el servicio de cuidados críticos del Hospital de Lambayaque, durante diciembre del 2014 a julio del 2015, reportó 29 aislamientos de *P. aeruginosa*; en 03 (10%) de éstos, se detectó fenotípicamente la presencia de MBL (25).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Carbapenemes

Los carbapenemes, antibióticos β -lactámicos, poseen un amplio espectro de actividad tanto para bacterias grampositivas y para gramnegativas, aerobias y anaerobias; son indispensables en la terapia contra las bacterias gramnegativas multirresistente. Fresnadillo y col. (26) los definen de la siguiente forma:

“El anillo carbapenem es un azobiciclo formado por la condensación de un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Posee en posición 1, un átomo de carbono (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Todos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo en configuración trans que protege al anillo β -lactámico de muchas serino- β -lactamasas y en posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al β -lactámico” (p54).

Las sustituciones en C1 y C2, situados en el anillo pirrolidínico confieren la diferencia a los carbapenémicos. Entre los que encontramos: imipenem (N-formimidoil-tienamicina), el cual se empieza a usar a partir del 1985, es susceptible a la enzima renal dehidropeptidasa 1 (DPH -I), causa de nefrotoxicidad; se utiliza con la cilastatina (1:1) la cual es un inhibidor de dicha enzima. Meropenem, autorizado por FDA a partir de 1996 y doripenem a partir del 2009, son estables a la DPH-I, siendo éste último menos alcalino que los anteriores y más activo contra *P. aeruginosa* (26).

2.1.1. Mecanismo de acción

Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular durante la última etapa de la síntesis del peptidoglicano: la transpeptidación, uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), debilitando la pared celular, ocasionando la lisis celular, debido a la presión osmótica intracelular, causando la muerte bacteriana; para que esto suceda es necesario que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación (26).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo no fermentador, citocromo oxidasa positivo, aerobio, pudiendo en ocasiones crecer en forma anaeróbica. Pueden producir pigmento difusible (piocianina, fluoresceína, piorrubina). Ocasionalmente sus colonias pueden presentar un aspecto mucoso debido a la abundancia de polisacáridos capsulares (pacientes con fibrosis quística) (27). Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes, crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C, tolerar condiciones bajas de oxígeno, debido a esto puede adaptarse a diversos ambientes (hábitats marinos, plantas y animales), interactuar con otros microorganismos: compitiendo, comunicándose (*quorum sensing*) y compartiendo con ellos (28).

Subsiste en superficies inertes, ambientes húmedos. En los hospitales, puede encontrarse en los equipos, instrumentos, antisépticos, jabón, fregaderos, trapeadores, etc. (29). Forma biopelículas bacterianas (*biofilms*), las cuales se asocian a la resistencia a carbapenémicos (10).

El tamaño y la complejidad del genoma de *P. aeruginosa* (cepa PAO1: tiene cerca de 6,3 millones de pares de bases siendo uno de los genomas bacterianos más grande que ha sido secuenciado), le proporciona: adaptación evolutiva, versatilidad y resistencia antimicrobiana (30).

Produce una diversidad de factores de virulencia, que pueden ser estructurales (cápsula, pili, flagelo, lipopolisario, piocianina, pioverdina), mediante producción de toxinas y enzimas (exolisina A, exotoxinas: A, S, T, U, Y; elastasas: LasA, LasB; proteasa alcalina, hidrolasa epoxida, fosfolipasas: A, C, D; proteasa: clase IV, ramnolípido), debido a esto la patogenicidad podría ser descrita como multifactorial. (25, 30, 31).

Dichos factores se verán involucrados, dependiendo del sistema inmunitario del paciente, lugar de la infección, enfermedad de base, comorbilidades, procedimientos y técnicas invasivas, servicio de hospitalización, antibioticoterapia, entre otros, en menor o mayor grado, convirtiéndose así, en unos de los patógenos más preocupantes del entorno hospitalario.

2.2.1. Mecanismos de resistencia

P. aeruginosa presenta un elevado nivel de resistencia intrínseca a diversos antibióticos y también es capaz de adquirir o inducir nuevas resistencias, reduciendo enormemente las opciones terapéuticas (4).

2.2.1.1. Mecanismos de resistencia intrínsecos

La resistencia intrínseca puede deberse a: baja permeabilidad de la membrana externa, debido a la mutación de porinas, presencia de la β -lactamasa de clase C, cromosómica inducible tipo Amp C (cefalosporinas) y la acción de las bombas de expulsión (especialmente; MexAB-OprM). En conjunto contribuyen a la resistencia de penicilina, aminopenicilinas (incluyendo las combinaciones con inhibidores de β -lactamasas), cefalosporinas de primera y segunda generación, ceftriaxona y cefotaxima (cefalosporinas de tercera generación), cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina, novobiocina, ácido nalidixico (32) y ertapenem (26, 33).

La proteína de membrana OprD, permite el ingreso de aminoácidos, pequeños péptidos y carbapenémicos, la pérdida de ésta ocasionaría disminución en la sensibilidad a dichos antimicrobianos (34). Si se adiciona la hiperproducción de las β - lactamasas cromosómica AmpC o sobreexpresión de bombas de eflujo se está determinando finalmente la resistencia a carbapenémicos (4).

Las bombas de eflujo son estructuras proteicas, transportadoras de membrana, que expulsan de la bacteria compuestos tóxicos incluyendo antibióticos. Estos sistemas de expulsión activa pertenecen a cinco superfamilias, siendo la familia RND (Resistance Nodulation Division) la que tiene la mayor cantidad de sistemas de eflujo en *Pseudomonas aeruginosa* (10), siendo cuatro los más frecuentes: Mex AB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM, teniendo éstos tres componentes: una proteína localizada en la membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF y MexY), siendo la bomba en sí, con amplia especificidad de sustrato; una lipoproteína enlazadora que se encuentra en el espacio periplasmático (MexA,

MexC, MexE y MexX) y una proteína (porina) de salida situada en la membrana externa (OprM, OprJ, OprN y OprM) (7).

2.2.1.2. Mecanismos de resistencia adquiridos

Conocida como “transferencia horizontal de determinantes de resistencia”, debido a que es adquirida a través de elementos móviles como plásmidos, integrones, transposones o fagos, los cuales transportan los genes de resistencia antibiótica (antibióticos: antipseudomonales, aminoglucósidos y β -lactámicos), a diferentes especies y/o géneros bacterianos, encontrándose entre estos, los genes que codifican las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, las β -lactamasas de espectro extendido, MBL, y las metilasas 16S rRNA, siendo de suma importancia debido a su rápida diseminación.

En relación con el tema en estudio, se ampliará el mecanismo enzimático relacionado con la producción de carbapenemasas.

Las carbapenemasas, son enzimas implicadas en la resistencia a β -lactámicos incluyendo carbapenémicos, (34) están clasificadas: según la clasificación de Ambler (molecular) en las clases A, B o D y según la clasificación de Bush&Jacobi (funcional) en las clases 2f, 3a y 2df respectivamente (35).

Las β -lactamasas de clase A encontradas en *P. aeruginosa* incluyen: KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenmasa), KPC-5 y GES-2 (Guiana Extended-Spectrum) (4).

Las β -lactamasas de clase B, generalmente conocidas como MBL, son de gran importancia clínica y epidemiológica, debido al escaso arsenal terapéutico para enfrentarlas y su ubicación en elementos móviles (generalmente en genes casetes ubicados en integrones tipo 1, en plásmidos o transposones), lo cual desarrollaría

su capacidad de diseminación, además de estar asociados a otros genes de resistencia en los mismos casetes, dando como resultado cepas resistente a múltiples antibióticos (11, 36). Se caracterizan por el requerimiento en su centro activo del ion zinc como cofactor para la reacción de hidrólisis de los betalactámicos; no hidrolizan a los monobactámicos, no se inhiben con ácido clavulánico, ni tazobactam siendo inhibidas por el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Se han identificado, entre otras: IMP (imipenemasa), VIM (Verona Imipenemasa), SPM (Sao Paulo Metallo- β -lactamase), GIM (German IMipenemase) (24) y NDM (New Delhi Metallo- β -lactamasa) (13); de las cuales, las que se encuentran ampliamente distribuidas geográficamente son IMP y VIM (4).

Las β -lactamasas de clase D, conocidas también como oxacilinasas, cuyos genes pueden estar localizados en plásmidos o integrones; poseen un espectro hidrolítico heterogéneo. Se ha encontrado la OXA-40 en cepas de *P aeruginosa* resistentes a imipenem (4).

Entre los mecanismos de resistencia adquiridos, también tenemos las resistencias mutacionales, las cuales alterarían la expresión y/o función de los mecanismos codificados cromosómicamente, dando lugar a una sobreproducción de mecanismos intrínsecos. Mutaciones en la expresión de los genes mexR o mex Z, ocasionarían una hiperproducción de los sistemas de eflujo MexAB-OprM, MexXY-OprM, ocasionando una susceptibilidad disminuida al antibiótico respectivo, o podrían inducir a la producción de otros sistemas de eflujo como MexCD-OprJ y MexEF-OprN (no producidos naturalmente), los cuales se expresan en respuesta a mutaciones en los genes nfxB y nfxC, ocasionando resistencia a

varios antibióticos. Las mutaciones también pueden ser dadas en las porinas o en el sitio de acción, pudiendo ocasionar una resistencia de alto nivel en el caso de una interacción sinérgica entre diferentes resistencias mutacionales. La acumulación gradual de varias mutaciones de bajo nivel, podría ocasionar resistencia de alto nivel, esto es denominado “*creeping baselines*”, observado en pacientes con fibrosis quística, pudiendo encontrarse también en estos paciente las cepas conocidas como hipermutables o “mutadores”, las cuales son el resultado de mutaciones a nivel del ADN. Los “mutadores” adquieren resistencia y multirresistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, en menor tiempo que las cepas no mutantes (10).

2.2.1.3. Mecanismos de resistencia adaptativos

Es un conjunto de mecanismos de resistencia para uno o más antimicrobianos, los cuales se presentan debido a la inducción, después de la exposición de factores desencadenantes como concentraciones subinhibitorias de agentes antimicrobianos, cambios de las condiciones ambientales como pH, atmósfera, niveles de cationes y *biofilms*; es no mutacional, no heredable y de naturaleza transitoria.

Al ser inducida este tipo de resistencia, desregula uno o más genes de resistencias, ocasionando alteración de la función en la permeabilidad de la membrana, sistemas de eflujo (ej. sobreexpresión del gen que codifica el transportador MexY del sistema de eflujo MexXY-OprM, después de la exposición a aminoglucósidos) y / o actividad enzimática (ej. inducción de las β -lactamasas codificadas por el gen AmpC en respuesta a la exposición a algunos β -lactámicos) (10).

3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Estimar la frecuencia de los mecanismos que codifican resistencia a carbapenémicos en los aislamientos de *P. aeruginosa* aisladas en muestras clínicas en el HNERM en el período junio - julio del 2018.

Objetivos específicos

- Especificar la frecuencia de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos según tipo de muestra.
- Evaluar la correlación entre los resultados de las pruebas fenotípicas y los métodos moleculares empleados en la identificación de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos en los aislamientos de *P. aeruginosa* en las muestras clínicas estudiadas.
- Estimar la frecuencia de mecanismos de resistencia por grupos etarios y servicios hospitalarios.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

Diseño transversal de periodo, para la caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, aisladas de muestras clínicas en el HNERM, durante los meses de junio y julio del 2018.

4.2. Población

Todas las *P. aeruginosa* aisladas en hemocultivos, urocultivos, cultivos de: líquidos biológicos, secreciones bronquiales, heridas y tejidos identificadas en el Servicio

de Microbiología del HNERM, correspondientes a los meses de junio y julio del 2018.

4.3. Criterios de elegibilidad

4.3.1. Criterios de inclusión

Todos los aislamientos de *P. aeruginosa*, no sensibles (intermedio o resistente, según criterios del CLSI) (33), para imipenem y/o meropenem, obtenidas de muestras de pacientes hospitalizados en el HNERM, seleccionando el primer aislamiento del paciente hospitalizado, dándose prioridad a las muestras de sitios estériles.

También se tomará en cuenta otros aislamientos del mismo paciente si éstos tuvieran un perfil de resistencia diferente.

4.3.2. Criterios de exclusión

Los aislamientos de *P. aeruginosa*, que presenten información demográfica incompleta del paciente.

4.4. Muestra

4.4.1. Universo de estudio

Muestras clínicas de pacientes hospitalizados en el HNERM, en las cuales se ha aislado *P. aeruginosa*.

4.4.2. Tamaño de muestra

Se realizará un muestreo por conveniencia que incluirá todos los aislamientos de *P. aeruginosa* que cumplan con los criterios anteriormente descritos, en el periodo de estudio.

4.5. Variables

Se incluirán siguientes variables:

-Paciente: Edad, sexo y procedencia (piso de hospitalización).

-Muestra: Tipo de muestra obtenida para los estudios microbiológicos.

-Resistencia a carbapenémicos, según los criterios del CLSI (33):

Nivel de resistencia: Multirresistencia (MDR), resistencia extrema (XDR) y panresistencia (PDR) (2).

Mecanismos de resistencia: Presencia de carbapenemasas, pérdida de porinas y/o bombas de expulsión.

Operacionalización de variables (Anexo 1).

4.6. Procedimientos y Técnicas

4.6.1. Procesamiento de las muestras

Las muestras en recipientes adecuados para estudios microbiológicos, fueron recibidas en el Servicio de Microbiología del HNERM, procedentes de los pisos de hospitalización.

Dependiendo del tipo de muestra se procedió según protocolo de trabajo; que incluyó coloraciones, siembras en los medios de cultivo correspondientes, así como la incubación en las atmósferas, temperaturas y tiempos adecuados. Posteriormente, se realizaron las pruebas de identificación y sensibilidad respectivamente. Los aislamientos no sensibles (intermedio o resistente) a carbapenémicos, según criterios del CLSI (33), serán transportadas siguiendo estrictamente las medidas de bioseguridad al Laboratorio de Resistencia Antibiótica e Inmunopatología - LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), para la realización de las pruebas fenotípicas complementarias y las pruebas moleculares respectivas.

4.6.2. Identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobiana

La identificación y pruebas de sensibilidad se realizaron mediante la metodología del Sistema MicroScan WalkAway 96 Plus (Beckman Coulter), dependiendo del tipo de muestra a estudiar se procesaron en los paneles NC66 para bacilos Gram negativos sistémicos o en los paneles NUC69 para bacilos Gram negativos urinarios, según protocolo de trabajo e instrucciones del fabricante.

4.6.2.1. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenémicos.

Para la detección fenotípica de los mecanismo de resistencia a carbapenémicos, se tomará en cuenta la publicación realizada por Jordi Vila y Francesc Marco (32) : “Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores”, con ciertas modificaciones debido a que se analizaran solo los antibióticos presentes en los paneles de trabajo utilizados, evaluándose de esta forma los siguientes: piperacilina/tazobactam (PTZ), ceftazidima (CAZ), cefepime (CEF) ,aztreonam (ATM), imipenem (IMP) y meropenem (MER) (Tabla 1).

TABLA 1. Fenotipos de resistencia a betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

PTZ	CAZ	CEF	ATM	IMP	MER	Mecanismo de resistencia
S	R	R	R	r/R	r/R	GES – 2
R	R	R	S	r/R	r/R	MBL
S	S	S	S	R	r	Pérdida de porina OprD
r/R	r/R	r/R	r/R	S	r	Sistema MexAB-OprM
r/R	r/R	R	r/R	S	S	Sistema MexCD-OprJ
r/R	r/R	r/R	r/R	R	r	Sistema MexEF-OprN
r/R	r/R	r/R	r/R	S	S	Sistema MexXY-OprM

Detección de sistemas de eflujo

Se utilizará un inhibidor de las bombas de eflujo: carbonyl cyanide 3-chlorofenilhidrazona (CCCP). El CCCP se agregará a cada placa de agar Mueller Hinton (MHA), que contenga de 0.5 a 1024 ug / mL de gentamicina, 0.5 a 1024 ug / mL de cefepima, 0,5 a 256 ug / mL de imipenem y 0,5 a 128 ug / mL de ciprofloxacina (la concentración final de CCCP debe ser de 25 ug / mL). Posteriormente, inocular 2 uL de la suspensión bacteriana (concentración final del inóculo: 10^4 UFC). Se determinará la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada antibiótico.

El criterio para considerar la presencia de bombas de eflujo en los aislamientos será que la CIM de los antibióticos probados disminuirá al menos 4 veces en presencia del inhibidor. El control negativo será la cepa PAO1 (37).

Detección de enzimas que confieren resistencia a carbapenemes

Para la detección fenotípica de enzimas de clase A (KPC y GES), B (MBL), C (AmpC) y D (OXA), se realizarán las siguientes pruebas:

Prueba de sinergia de doble disco (SDD)

Determinará la presencia de la enzima y la clase a la que pertenece utilizando los siguientes discos: imipenem (IPM) (10 µg), meropenem (MER) (10 µg), ácido etilendiaminotetraacético/mercaptoacetato de sodio (EDTA/SMA) (750 µg/2mg), ácido 3-aminofenilborónico (APB) (300 µg) y cloxacilina (3000 µg). En una placa de agar Mueller Hinton previamente sembrada con un inóculo 0.5 McFarland de la cepa, se colocarán los discos respectivos a una distancia de 1.5 cm de centro a centro, incubándose luego a 35°C de 18 a 24 horas en aerobiosis.

La prueba se considerará positiva cuando se observe un efecto sinérgico (agrandamiento o deformación) de la zona de inhibición entre los discos empleados (38), pudiendo obtenerse los resultados que se muestran en la tabla 2 (datos obtenidos del Servicio Antimicrobianos ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”) (39).

TABLA 2. Detección de carbapenemasas.

DISCOS A UTILIZAR	ENZIMAS A DETECTAR				
	KPC	MBL	AmpC	OXA	GES
IMP-EDTA-MER	-	+	-	-	-
IMP-CLOXA(HI)- MER	-	-	+	-	-
IMP-APB-MER	++/-	-	+	-	+

4.6.2.2. Detección genotípica de mecanismos de resistencia a carbapenémicos.

Detección de genes codificantes de MBL

Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se estudiarán los siguientes genes que codifican la producción de MBL: KPC, IMP, VIM y NDM, realizándose según la publicación de Saavedra y col. 2014 (18).

El ADN, será extraído por shock térmico.

Para la amplificación, la mezcla estará constituida por 0.2mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 0.4 μM de cada iniciador (para IMP se usará 0.5 μM), y 0.06U/ μL de Taq polimerasa.

Los iniciadores a utilizar se presentan en la tabla 3.

TABLA 3. Lista de iniciadores utilizados para la amplificación de carbapenemasas.

INICIADOR	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893
KPC-R	TTTTTCAGAGCCTTACTGCC	
IMPgen-F1	GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC	188
IMPgen-R1	CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC	
VIMgen-F2	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382
VIMgen-R2	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
NDM-F	GGTGCATGCCCGGTGAAATC	661
NDM-R	ATGCTGGCCTTGGGGAACG	
SPM-F1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	798
SPM-R1	CCTTTTCCGCGACCTTGATC	

Realizándose de la siguiente manera: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, hibridación de los iniciadores según la temperatura correspondiente a cada uno de ellos por 45 segundos a 72°C por un minuto y una extensión final a 72°C por siete minutos en un termociclador.

Para evidenciar los productos de amplificación se realizará una electroforesis en gel de agarosa y su visualización será en un transiluminador de luz UV, siendo comparado con un marcador de peso molecular respectivo.

EL control negativo será la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Los controles positivos serán cepas productoras de carbapenemasas tipo KPC, VIM, IPM, NDM y SPM, que posee el Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

4.7. Plan de análisis

Los datos demográficos de los pacientes, tipo de muestra y resultados de las pruebas de laboratorio, en lo referente a la identificación y pruebas de susceptibilidad del microorganismo, serán extraídos de la base de datos y del programa LabPro del Servicio de Microbiología del HNERM. Los resultados de las pruebas fenotípicas y estudios moleculares, para la identificación de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos en los aislamientos de *P. aeruginosa* de las muestras clínicas estudiadas, serán obtenidos de los registros realizados en el Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología - LID de la UPCH.

La información obtenida será transferida a una base de datos, realizándose el procesamiento y análisis estadístico de los datos con el programa SPSS.

Se realizarán pruebas de estadística descriptiva, tablas de frecuencia y porcentajes.

La presentación de los datos se realizará en forma de tablas, gráficos en barras y/o sectores.

4.8. Aspectos éticos

Para la realización del presente trabajo de investigación se utilizaron cepas aisladas de los cultivos de las muestras clínicas que formaron parte de los procedimientos habituales clínicos, manteniéndose en la respectiva confidencialidad los datos de identificación de los pacientes.

El proyecto será inscrito en el SIDISI y sometido al Comité de Ética de la UPCH, según los lineamientos establecidos para tal fin.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Tacconelli E, Magrini N. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [Online].; 2017. Acceso 23 de Junio de 2018. Disponible en: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET.
2. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(3): p. 268-81.
3. Hernández A, Yagüe G, Garcia V, Simón M, Moreno P, Canteras M, et al. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016 -2017. *Rev Esp Quimioter*. 2018; 31(2): p. 123-30.
4. Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(1): p. 19-28.
5. Fuentes G, Portuondo R. Caracterización de pacientes fibroquísticos fallecidos en el curso de su enfermedad. *Rev Cubana Pediatr*. 2014; 86(3): p. 344-53.
6. Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Taherikalani M, Jabalameli F, Emaneini M. Determination of carbapenem resistance mechanism in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, in Tehran, Iran. *J Epidemiol Global Health*. 2017; 7(3): p. 155-59.
7. Livermore D. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002; 34(5): p. 634-40.
8. Santella G, Pollini S, Docquier J, Almazura M, Gutkind G, Rossolini M, et al. Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* : un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. *Rev Panam Salud Pública*. 2011; 30(6): p. 545-48.
9. Lister P, Wolter D, Hanson N. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(4): p. 582-610.
10. Abdelraouf K, Tam V. *Pseudomonas*. En Mayers D, Sobel J, Ouellette M, Kaye K, Marchaim D, editores. *Antimicrobial Drug Resistance*. Segunda ed. Suiza: Springer; 2017. p. 899-922.

11. Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordmann P. Metallo-B-Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(2): p. 306-25.
12. Fica C, Cespedes J, Gompertz G, Jalón V, Sakurada Z, Sáez L. Colistín en infecciones nosocomiales por bacilos gramnegativos pan-resistentes. *Rev Chil Infect.* 2007; 24(5): p. 360-67.
13. Oliver A. Epidemiología y mecanismos de resistencia a carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*: papel de los clones de alto riesgo en la multirresistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35(3): p. 137-38.
14. Moreno S. Panorama Nacional de la Resistencia Antimicrobiana para Infecciones Nosocomiales. En: VIII Curso de Actualización de Infecciones Nosocomiales y II Seminario de Bacteremias Relacionadas a Líneas Intravasculares. México; 2013.
15. Hong D, Bae I, Jan I, Jeong S, Kang H, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* 2015; 47(2): p. 81-97.
16. Estepa V, Rojo-Bezares B, Azconz-Gutiérrez J, Olarte I, Torres C, Sáenz Y. Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital español. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35(3): p. 141-47.
17. Neves P, Mamizuka E, Levy C, Lincopan N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab.* 2011; 47(4): p. 409-20.
18. Saavedra S, Duarte C, González M, Realpe M. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica.* 2014; 34(1): p. 217-23.
19. Guevara A, Sahai J, Tedesco-Maiullari R. Persistencia clonal de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela. *Rev de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2015; 35: p. 77-82.
20. Chile. Ministerio de Salud (MINSAL). Instituto de Salud Pública de Chile. Boletín de Resistencia Antimicrobiana. [Online].; 2015. Acceso 10 de Agosto de 2018. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinRam-30112015A_0.pdf.
21. Diaz J. Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008. Tesis para optar el grado académico de

Magíster en Microbiología. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2008.

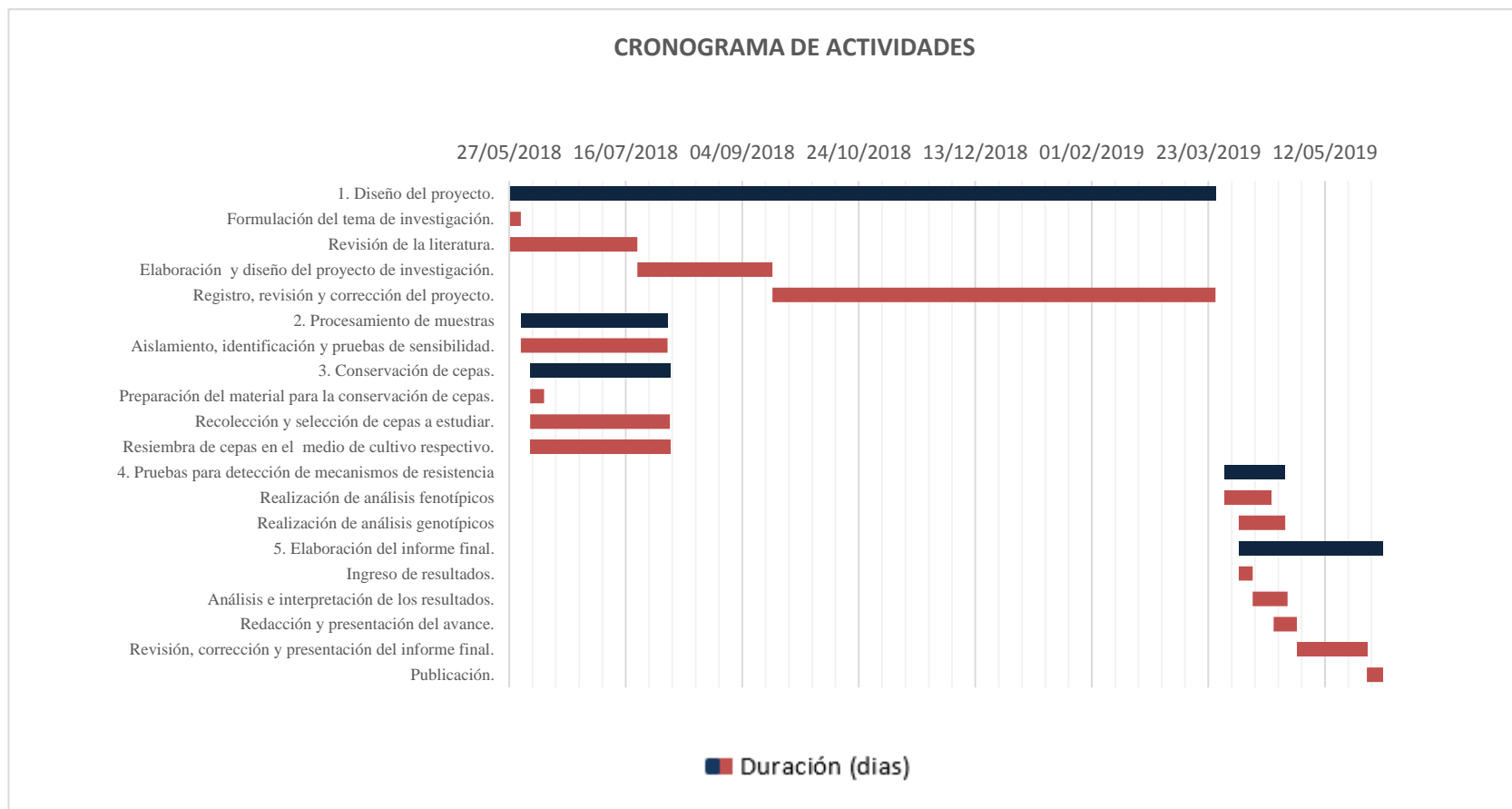
22. Informe anual de la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos. Lima-Perú 3 al 4 de diciembre 2009. Rev Patol Trop. 2011; 40(1): p. 81-85.
23. Perú. Ministerio de Salud (MINSA). Instituto Nacional de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario - 2012. [Online].; 2012. Acceso 10 de Agosto de 2018. Disponible en: <https://antimicrobianos.ins.gob.pe/biblioteca-virtual/informacion>.
24. Gonzales E, Vicente W, Champy R, Soto J, Flores W, Lovera M, et al. Metallo- β -lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2013; 30(2): p. 241-45.
25. Gastelo R, Díaz R, Maguiña C. Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque, diciembre 2014 - julio 2015. Acta Méd Peru. 2016; 33(3): p. 183-88.
26. Fresnadillo M, García M, García E, García J. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(2): p. 53-64.
27. Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. Microbiología médica. Quinta ed. España: Elsevier; 2006.
28. Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nobuhiko N. Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. Microbes Environ. 2013; 28(1): p. 13-24.
29. Lanini S, D'Arezzo S, Puro V, Martini L, Imperi F, Piselli P, et al. Molecular Epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* Hospital Outbreak Driven by a Contaminated Disinfectant-Soap Dispenser. PLoS ONE. 2011; 6(2): p. 1-10.
30. Stover C, Pham X, Erwin A, Mizoguchi S, Warrener P, Hickey M, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000; 406: p. 959-64.
31. Luján D. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2014; 48(4): p. 465-74.
32. Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(10): p. 726-36.

33. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. [Online].; 2019. Acceso 25 de Enero de 2019. Disponible en: https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf.
34. Queenan A, Bush K. Carbapenemases: the Versatile B-Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(30): p. 440-58.
35. Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): p. 969-76.
36. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 Metallo- β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2011; 55(8): p. 3939-31.
37. Azimi L, Namvar A, Rastegar Lari A, Jamali S, Rastegar Lari A. Comparison of Efflux Pump Involvement in Antibiotic Resistance Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates of Burn and Non-Burn Patients. *Arch Pediatr Infect Dis.* 2016; 4(3): p. 1-5.
38. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient Test for Screening Metallo-B-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *J ClinL Microbiol.* Junio; 38(1): p. 40-43.
39. Pasterán F. 31 Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi”. Buenos Aires, Argentina. 28 de Agosto al 1 de Septiembre de 2017. [Online].; 2017. Acceso 8 de Agosto de 2018 [Mecanismos de Resistencia de impacto clínico en *Pseudomonas aeruginosa*]. Disponible en: <https://youtu.be/MXtPIZkisYo>.

6. PRESUPUESTO

RECURSOS	DESCRIPCIÓN DE RECURSOS	CANTIDAD	FUENTE FINANCIADORA	MONTO (soles)
IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD BACTERIANA	Equipos, instrumentos e insumos		HNERM	
DETECCIÓN DE SISTEMAS DE EFLUJO	Equipos, instrumentos		UPCH –LID	
	Asas de siembra	300 unidades		140.00
	Placas Petri	300 unidades		390.00
	CCCP	100mg		112.00
	Guantes estériles	150 pares		60.00
	Cepas ATCC		HNERM UPCH-LID	
	Discos de sensibilidad		HNERM UPCH-LID	
DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE MBL	Equipos, instrumentos		UPCH - LID	
	Agarosa certificada grado BM	125 g		886.00
	Agua grado BM	100ml		84.00
	Asas de siembra	300u		140.00
	Bromuro de etidio	1gr		132.00
	Buffer TAE 50X	1000mL		455.00
	Guantes estériles	150 pares		60.00
	Microtubos PCR (0.2mL)	1000unidades		38.00
	Puntas plásticas (1- 100ul)	1000unidades		76.00
	Par de iniciadores	4 pares		1200.00
	Taq polimerasa			800.00
	Taq redimix			900.00
	Cepas ATCC		HNERM UPCH - LID	
MATERIALES DE OFICINA	Hojas bond	400 unidades		30.00
	Toner	01 unidad		60.00
MOVILIDAD RECURSOS HUMANOS			Recursos propios	
	Investigador		Ad honorem	
	Asesor		Ad honorem	
TOTAL				5563.00

7. CRONOGRAMA



ANEXO 1: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	FUENTE
Edad	Tiempo de vida en meses o años cumplidos	Número de meses Número de años	Independiente Cuantitativa	Razón	Base de datos del Servicio de Microbiología
Sexo	Característica biológica individual del paciente	Femenino Masculino	Independiente Cualitativa	Nominal	Base de datos del Servicio de Microbiología
Procedencia	Piso de hospitalización donde se encuentra el paciente	Especialidades médicas: Cardiología. Cirugía: Cabeza y Cuello, Cirugía General, Cirugía Pediátrica, Cirugía Plástica, Cirugía de Tórax. Cuidados Intensiv. Dermatología. Emergencias. Endocrinología. Gastroenterología. Ginecoobstetricia. Hematología. Hemodiálisis. Infectología Medicina Interna. Nefrología. Neonatología. Neumología. Neurocirugía. Neurología. Oftalmología. Oncología. Pediatria, etc	Independiente Cualitativa	Nominal	Base de datos del Servicio de Microbiología
Tipo de muestra	Secreciones, aspirados, líquidos biológicos o tejidos obtenidos del paciente	Sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, líquido pleural heridas, secrec. bronquiales, etc.	Independiente Cualitativa	Nominal	Base de datos del Servicio de Microbiología
Nivel de resistencia	Detección del nivel de resistencia	Multirresistencia (MDR), resistencia extrema (XDR) y panresistencia (PDR).	Independiente Cualitativa	Nominal	Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana
Mecanismos de resistencia	Presencia de genes específicos o características fenotípicas relacionados con la resistencia a carbapenemes	Carbapenemasas: KPC, GES (Clase A), MBL (Clase B) y oxacilinasas (Clase D). -Pérdida de porinas -Bombas de expulsión.	Independiente Cualitativa	Nominal	Resultados de las pruebas moleculares o fenotípicas específicas para detectar mecanismos de resistencia en <i>P.aeruginosa</i>