



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

**TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO
PROFESIONAL DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA
MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO
CLÍNICO**

TÍTULO:

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA A COLISTINA EN *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE TRES ESTABLECIMIENTOS DE SALUD DE LIMA, PERÚ

ANTIMICROBIAL RESISTANCE TO COLISTIN IN *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATED FROM THREE HEALTH ESTABLISHMENTS OF LIMA, PERU

ALUMNO(S):

DELSY ALEJANDRA BARRANTES SALINAS

MARJHORY MALU ZARATE ESTRADA

ASESOR(ES):

DR. JESÚS HUMBERTO TAMARIZ ORTIZ

LIMA – PERÚ

2020

JURADOS

MSc. Juan Carlos Agapito Panta – Presidente

MSc. Steev Orlando Loyola Sosa – Vocal

MSc. Fulton Paul Rivera Albinagorta– Secretario

ASESOR DEL TRABAJO DE TESIS

Dr. Jesús Humberto Tamariz Ortiz

DEDICATORIA, AGRADECIMIENTOS Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Dedicamos el presente proyecto de tesis a nuestros padres, por todo el apoyo brindado desde el inicio de nuestros estudios de pre grado en nuestra alma mater, la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Agradecemos, en primer lugar a nuestro asesor, profesor y jefe de laboratorio Dr. Jesús Tamariz Ortiz, por su vocación de docente y como asesor que nos guio e incentivó durante todo el proceso de desarrollo, ejecución y presentación de nuestra tesis; a nuestros profesores que con esmero nos inculcaron pensamiento crítico y ético para proceder en nuestra vida universitaria y profesional.

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Las autoras del presente trabajo de tesis declaramos no tener algún conflicto de interés. El manuscrito presentado es original y se rige bajo las normas y procedimientos para la elaboración, desarrollo, presentación, evaluación y publicación del trabajo de investigación/tesis de las facultades de Medicina, Estomatología y Enfermería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	
2.	INTRODUCCIÓN	1
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
3.1.	TIPO DE ESTUDIO	4
3.2.	ORIGEN DE LOS AISLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
3.3.	REACTIVACIÓN DE AISLADOS.....	5
3.4.	DETECCIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA A COLISTINA: MÉTODO DE ELUCIÓN DE DISCOS DE COLISTINA EN CALDO.....	6
3.5.	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LA EXPRESIÓN DE PRODUCTOS DEL GEN <i>mcr-1</i> : MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS CON COLISTINA + EDTA.....	6
3.6.	DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN <i>mcr-1</i> : REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	7
3.7.	CEPAS CONTROL	8
3.8.	ASPECTOS ÉTICOS.....	9
3.9.	ANÁLISIS DE DATOS	9
4.	RESULTADOS.....	10
5.	DISCUSIÓN	11
6.	CONCLUSIONES	15
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
8.	TABLAS.....	25

1. RESUMEN

Antecedentes: La resistencia antimicrobiana aumenta debido al uso inadecuado de antibióticos, sobre todo en bacilos Gram-negativos (BGN) no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*. En este ámbito resurgió la colistina como última opción terapéutica; sin embargo, existen mecanismos cromosómicos de resistencia frente a este antibiótico; así como, resistencia a colistina mediada por plásmidos, *mobile colistin resistance (mcr)*.

Objetivos: Determinar la frecuencia de resistencia antimicrobiana a colistina y la frecuencia de los productos de expresión del gen *mcr-1* por métodos fenotípicos; y detectar la presencia del gen *mcr-1* por métodos moleculares, en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* criopreservadas, procedentes de muestras clínicas de tres establecimientos de salud de Lima, Perú, en el periodo entre enero 2018 – octubre 2019.

Materiales y métodos: El presente estudio de tipo descriptivo transversal, determinó la resistencia a colistina por el método de elución de discos de colistina en caldo, los productos de la expresión del gen *mcr-1* mediante el método de difusión de discos combinados de colistina \pm EDTA y la presencia del gen *mcr-1* mediante la PCR en 97 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* criopreservadas, pertenecientes al cepario del laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos de LID-UPCH; de las cuales, 40 provinieron de un hospital nacional categoría III-1, 29 de un hospital de emergencias categoría III-1 y 16 de una clínica privada de la ciudad de Lima.

Resultados: El 7.22% de los aislados presentaron resistencia a colistina por el método de elución de discos de colistina en caldo. Se determinó que ningún aislado era portador el gen *mcr-1*.

Conclusiones: Los resultados del estudio muestran que los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* presentan baja frecuencia de resistencia a la colistina.

Palabras clave: Colistina, *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia antimicrobiana, *mcr-1*

ABSTRACT

Background: Antimicrobial resistance increases due to the inappropriate use of antibiotics, especially in non-fermenting gram-negative bacilli (NFGNB), such as *Pseudomonas aeruginosa*. In this context, colistina has re-emerged as the last therapeutic option; however, there are chromosomal mechanisms of resistance against this antibiotic as well as plasmid-mediated resistance, mobile colistin resistance (*mcr*).

Objectives: To determine the frequency of colistin resistance and the frequency of the expression products of the *mcr-1* gene by phenotypic methods and to detect the presence of the *mcr-1* gene by molecular methods in cryopreserved *Pseudomonas aeruginosa* isolates from three health establishments in Lima, Peru, from January 2018 to October 2019.

Materials and methods: This descriptive cross-sectional study determined colistin resistance by broth-disk elution method, the presence of the expression products of the *mcr-1* gene by the colistin+EDTA combined disks method and the presence of the *mcr-1* gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) in *Pseudomonas aeruginosa* isolates belonging to the LID-UPCH Antimicrobial Resistance Laboratory strain collection. From which, 40 were from a national category III-1 hospital, 29 were from a category III-1 emergency hospital and 16 were from a large private clinic.

Results: Approximately, 7.22% of *P. aeruginosa* isolates were resistant to colistina, determined by the colistin broth-disk elution method. Among all the isolates, the *mcr-1* gene wasn't detected.

Conclusions: The results of the study show that the isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show low frequency of colistina resistance.

Keywords: colistin, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance, *mcr-1*

2. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana en enterobacterias y bacilos Gram-negativos (BGN) no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (en adelante *P. aeruginosa*) está incrementando progresivamente (1). *P. aeruginosa* presenta resistencia natural a cefalosporinas de primera y segunda generación, macrólidos, tetraciclinas, y cloranfenicol. También, ha adquirido mecanismos de resistencia como las enzimas carbapenemasas y metalo- β -lactamasas, entre otras (2). Este contexto admite como última opción terapéutica a la colistina, un antibiótico antiguo, capaz de combatir infecciones por bacterias Gram-negativas multidrogoresistentes (3).

La colistina es un antibiótico cíclico polipeptídico de naturaleza lipídica catiónica descubierto en 1947, proveniente del *Bacillus polymyxa* subespecie *colistinus*. Actúa en los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de los BGN, uniéndose electrostáticamente al lípido A y desplazando a los cationes de Mg^{2+} y Ca^{2+} , induciendo a la apertura de la membrana externa, cambios osmóticos en el periplasma y posterior lisis bacteriana (4-6). Si bien, la gran capacidad antibacteriana de la colistina expandió su uso, los efectos adversos como la nefrotoxicidad y neurotoxicidad se hicieron notables. Actualmente, es usado su profármaco inactivo, el colistimetato sódico, que en medio acuoso, se transforma a colistina y tiene menos efectos adversos (6,7).

La resistencia a colistina se origina por la terapia excesiva con la misma, en países donde coexisten resistencias endémicas por carbapenemasas y por el uso extenso en la agroindustria como promotor de crecimiento y profilaxis (8). El factor de

riesgo asociado a esta resistencia es el uso previo de quinolonas, carbapenémicos y la propia colistina por un período terapéutico de mínimo 3 meses (9).

En 1980, se describió por primera vez la resistencia a la colistina en China, presente en bacterias *Escherichia coli* aisladas de muestras fecales de pollos para consumo humano; también, se reportó en cerdos, vacas, cabras, y otros animales (10). Se han identificado diferentes mecanismos de resistencia a colistina; uno de ellos es el producto de modificaciones de los lipopolisacáridos de la membrana externa (a nivel del lípido A), mediado por la adición de 4-amino-4-desoxy-L-arabinosa (L-Ara4N) y la fosfoetanolamina (PEtN). Su síntesis y transferencia están mediados por un operón regulado por la activación de sistemas de dos componentes, en el caso de *P. aeruginosa* está mediada por 5 sistemas: *PmrA/B*, *PhoP/Q*, *ParR/S*, *ColR/S* y *CprR/S* (11-13).

La resistencia móvil a colistina (*mcr-I*), se describió por primera vez en China en el 2015 (14). Es transmitida por plásmidos, asociados principalmente al grupo de incompatibilidad X4 (*IncX4*), lo que permitió su herencia horizontal entre diversas especies de BGN (15). El primer caso clínico se originó en Vietnam, en el año 2008, en una *Shigella sonnei* aislada de un niño con diarrea, cuyo secuenciamiento identificó el gen *mcr-I* y se reportó el año 2015 (16). A la fecha, se han caracterizado 10 genes homólogos *mcr* (17). En el 2016, Arcilla, *et. al.* reportaron *E. coli* productora de BLEE y *mcr-I* en muestras diarreicas de viajeros holandeses provenientes de Perú, Colombia y Bolivia, entre una a dos semanas después de su retorno a Holanda (18). En América latina, los casos de *mcr-I* fueron encontrados en Argentina, Venezuela, Colombia, Ecuador y Brasil (19,20). En el Perú, Ugarte *et al.* reportaron por primera vez *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

portadoras de *mcr-1* el año 2018 (21). Butaye P. y Wang C. destacan la importancia de los estudios epidemiológicos sobre la resistencia a la colistina incluyendo la búsqueda del gen *mcr-1* para establecer el alcance de su diseminación (22).

Una de las bacterias con alta incidencia de multidrogoresistencia y gran capacidad para causar infecciones en el ambiente hospitalario es *P. aeruginosa*. Se aísla frecuentemente en fibrosis quística, en infecciones de Unidades de Cuidados Intensivos (10%) y fómites de uso médico (5%) (23,24). Reportes recientes en el Perú, muestran que *P. aeruginosa* presenta multidrogoresistencia con especial mención a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos; en dichos estudios no se reportó resistencia a colistina (24-27) . Sin embargo, es importante considerar que la metodología utilizada en los estudios descritos (difusión en agar), no es la adecuada según los nuevos estándares del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) por la elevada tasa de falsa susceptibilidad, abriendo posibilidades de subregistros en la información (26,27).

Por lo mencionado anteriormente, se realizó el presente estudio para determinar la frecuencia de resistencia antimicrobiana a colistina por el método de elución de discos de colistina en caldo, la frecuencia de los productos de la expresión del gen *mcr-1* por el método de difusión de discos combinados de colistina y EDTA y la presencia del gen *mcr-1* por reacción en cadena de la polimerasa en aislados criopreservados de *Pseudomonas aeruginosa*, originarios de tres establecimientos de salud en Lima, Perú en el periodo enero 2018 – octubre 2019.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de tipo descriptivo transversal en el que, a partir de aislados clínicos criopreservados de *P. aeruginosa* del banco de cepas del Laboratorio de Resistencia a los antimicrobianos del LID-UPCH, se ejecutó el análisis fenotípico y molecular para establecer la frecuencia de la resistencia antimicrobiana a la colistina, la presencia del gen *mcr-1* y la frecuencia sus productos de expresión.

Criterios de inclusión

Aislados de *P. aeruginosa* criopreservadas en el banco de cepas del Laboratorio de Resistencia a los antimicrobianos del LID-UPCH pertenecientes a pacientes hospitalizados de los tres establecimientos de salud incluidos en el estudio, correspondientes al periodo descrito.

Criterios de exclusión

Aislados con evidencias de contaminación posterior a la reactivación.

Aislados de muestras repetidas o del mismo paciente.

3.2. ORIGEN DE LOS AISLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Se trabajó con la totalidad de aislados (N=97) criopreservados en Skim Milk (Merck, Alemania) del banco de cepas del Laboratorio de Resistencia a los antimicrobianos del LID-UPCH, los cuales provinieron de tres establecimientos de salud del periodo comprendido entre enero 2018 a octubre 2019.

Todos los aislados presentaban los siguientes datos: a) identificación de especie realizada por equipos automatizados, b) perfil de antibiograma reportado por cada centro respectivamente y c) datos demográficos.

El centro N°1 corresponde a un hospital altamente especializado en emergencias nivel III-1 de Lima, Perú, cuenta con 11 departamentos asistenciales y 7 servicios. Se logró recuperar N=29 aislados de *P. aeruginosa*.

El centro N°2 corresponde a una clínica privada de la ciudad de Lima con una oferta médica de 40 especialidades y más de 53 subespecialidades. Se logró recuperar N=16 aislados de *P. aeruginosa*, siendo el 100% de los aislados obtenidos del periodo descrito.

El centro N°3 corresponde a un hospital de categoría III-1 de Lima, Perú, tiene más de 40 especialidades médicas y 5 no médicas. Se logró recuperar N=52 aislados de *P. aeruginosa*, siendo el 100% de los aislados obtenidos del periodo descrito.

3.3. REACTIVACIÓN DE AISLADOS

Los aislados de *P. aeruginosa*, fueron reactivados a partir del medio de conservación Skim Milk (Merck, Alemania) por inoculación en caldo Tryptone Soya Broth (TSB Marca: HiMedia, India) e incubados por 24 a 48 horas a 35°C hasta observar crecimiento (turbidez). La identificación a nivel de especie para *P. aeruginosa* se realizó en medio selectivo Cetrimide (Marca: Liofilchem, Italia), incubado por 24 horas a 35 °C visualizando el crecimiento de colonias con pigmento de color verde (piocianina) y la prueba de oxidasa dar positiva.

3.4. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA A COLISTINA: MÉTODO DE ELUCIÓN DE DISCOS DE COLISTINA EN CALDO

Para la solución de trabajo, se seleccionó una colonia pura identificada como *P. aeruginosa*, del medio Cetrimide, se sembró en Trypton Soya Agar (Oxoid, US) e incubó por 24 horas a 35°C; posterior a ello, se reconstituyeron las colonias en solución salina (0.9% NaCl) a una concentración de 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC).

Para cada solución de trabajo, se utilizaron 4 tubos con 10 mL de caldo Müller Hinton (Becton Dickinson, Alemania). El primer tubo fue el control de crecimiento, al segundo se le colocó un disco de 10 µg de colistina (Oxoid, US) (concentración final de 1 µg/mL); al tercer tubo, dos discos y al cuarto, 4 discos de colistina (concentración final de 2 y 4 µg/mL respectivamente). A estos tubos se les inoculó 50 µL de la solución de trabajo y fueron incubados por 24 horas a 35°C (28). La resistencia a la colistina fue considerada cuando se evidenció crecimiento de la bacteria por lo menos en los tubos 1, 2, 3 en simultáneo.

Los aislados estudiados fueron clasificados como sensible y resistente según puntos de corte establecidos por CLSI (M100-2019) (29).

3.5. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LA EXPRESIÓN DE PRODUCTOS DEL GEN *mcr-1*: MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS CON COLISTINA ± EDTA

Se usó la metodología de discos combinados propuesta por *Esposito et. al*, esta consiste en sembrar cada solución de trabajo en una placa con agar Müller Hinton

(Merck, Alemania) por el método Kirby-Bauer, sobre ella se colocó un disco con 10 µg de colistina y un disco con 10 µg de colistina y 10 µl de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1M (separados uno del otro aproximadamente 2,5 cm), se incubó 24 horas a 35 °C y se procedió a medir los halos de inhibición. Si se detectaba una diferencia ≥ 3 mm entre los halos de inhibición, se consideró positiva para la presencia del gen *mcr-1* (30).

3.6. DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN *mcr-1*: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Para la identificación genotípica se extrajo el ADN genómico de los 97 aislados por el método de shock térmico y se procedió con la prueba de reacción cadena de la polimerasa (PCR) para el gen *mcr-1* empleando los siguientes *primers*: *forward*: CLR5-F¹ (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3') y *reverse*: MCR-indel-R1 (5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3) según la metodología de Liu YY (14).

El volumen de la reacción final fue de 25 µl, incluyendo: 15.5 µl de agua grado molecular (Panreac Applichem, España), 2.5 µl de *buffer* 10X (Thermo Scientific, US), 1.5 µl de MgCl₂ (25mM) (Thermo Scientific, US), 2 µl de dnTPs (2.5 mM) (Thermo Scientific, US), 10 µl de cada *primer* (10µM)(Invitrogen, US), 0.15 µl Taq DNA *polymerase* (5U/µl) (Thermo Scientific, US) y 2 µl de ADN genómico. El ciclamiento inició con la desnaturalización a 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos: 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos en el termociclador (MiniCycler MJ Research, US). Los productos amplificados se separaron mediante gel de agarosa

al 1% con Tris Acetate-EDTA (TAE) (Panreac Applichem, España) utilizando Gel Loading Dye Blue (6X) (New England Biolabs, US) en electroforesis a 90 voltios durante 45 minutos, los productos se revelaron en el transluminador. El tamaño del ADN se verificó con DNA ladder 100 bp (Thermo Scientific, US) obteniendo productos de 309 pb.

Hasta la fecha, no hay un estudio comparativo entre el desempeño de la PCR descrita por Liu, *et al.* frente a otros; así como tampoco, existen protocolos para rastreo, identificación y confirmación de bacterias portadoras del gen *mcr-1* o sus genes homólogos (31). Sin embargo, Sekyere (2018) señaló que tanto la PCR como el secuenciamiento genómico se emplean como método de referencia para evaluación de sensibilidad y especificidad frente a otras pruebas moleculares descritas en la literatura.

3.7. CEPAS CONTROL

En todas las pruebas, para la validación de los resultados, se usó como control positivo una cepa caracterizada de *Escherichia coli* portadora del gen *mcr-1* perteneciente al Laboratorio de Resistencia a los antimicrobianos del LID-UPCH y como control negativo, se empleó a la *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.8. ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI: 103444).

3.9. ANÁLISIS DE DATOS

Se determinó la frecuencia en porcentaje de los resultados del método de elución de discos de colistina en caldo, los resultados del método de difusión de discos combinados de colistina \pm EDTA y los resultados obtenidos de la prueba de PCR para la detección del gen *mcr-1* utilizando los programas Microsoft Excel v2010 y Stata v15.

4. RESULTADOS

De N=97 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el método de elución de discos de colistina en caldo se identificaron 7 aislados resistentes a colistina (7.22%) con MIC igual o mayor a 4 µg/mL, 49 aislados presentaron una MIC igual a 2 µg/mL y 41 aislados presentaron una MIC menor o igual a 1 µg/mL.

Del total de los aislados resistentes a colistina, 2 fueron del establecimiento de salud N°1 (6.9%, N=29), 2 cepas del establecimiento de salud N°2(12.5%, N=16) y 3 del establecimiento de salud N°3 (5.77%, N=52) (Tabla 1).

No se observó diferencia en la medición de los halos de inhibición en la prueba de difusión de discos combinados de colistina ±EDTA en ninguno de los aislados con una MIC mayor o igual a 4 µg/mL (resistentes fenotípicamente a colistina) ni en los aislados sensibles. Así mismo, la prueba de PCR realizada a todas las cepas, no detectó ningún aislado portador del gen *mcr-1*.

5. DISCUSIÓN

La frecuencia de la resistencia a la colistina en *P. aeruginosa* reportada (7.22%) es similar a lo referido en estudios previos en Colombia (9.2%) (32), América latina 5.2% (33) y Europa 4% (12); mientras que, en Cuba se ha reportado 18.8% (34). En el Perú, no se ha reportado resistencia a colistina en *P. aeruginosa*, previo a este estudio (25-27).

De los 7 aislados resistentes a la colistina: 2 fueron aislados de secreciones bronquiales, reportados en el antibiograma por los centros de origen respectivos como resistentes a: amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima, cefepime, piperacilina/tazobactam, imipenem y meropenem; sospechosas ambas de producir metalo- β -lactamasas; 1 aislado que provenía de coprocultivo presentó resistencia a imipenem y meropenem, sospechosa de portar carbapenemasas y 4 aislados (3 provenientes de hemocultivos y 1 proveniente de urocultivo) fueron portadoras de AmpC cromosómico. La disponibilidad de información sobre el tratamiento, duración del internamiento y co-morbilidades microbianas de los pacientes a quienes pertenecieron las cepas criopreservadas, no fue permisible. También, todos los aislados N=97 fueron reportados como sensibles a la colistina en los respectivos centros de origen.

El método de elución de discos de colistina en caldo, es una buena opción para aplicar en la rutina del laboratorio de microbiología clínica, en términos de rentabilidad, eficacia, y performance (31). Aprobado actualmente como método alternativo al de referencia de la CLSI (32).

La utilización de quelantes como el EDTA para identificación de metaloenzimas es ampliamente usado en microbiología clínica. El test de discos combinados de Colistina + EDTA es susceptible a ser positivo con cualquiera de los 10 genes homólogos de *mcr*; así como, a las 21 variantes del gen *mcr-1*, dado que todos ellos codifican metaloenzimas (17) sin embargo, puede dar falsos negativos en bacterias portadoras del *mcr-1* sensibles a colistina por baja expresión del gen (16).

En el 2018, Sekyere hizo la primera revisión bibliográfica de las metodologías moleculares utilizadas para la identificación del gen *mcr-1*. Reportando la inexistencia de estudios comparativos entre los *primers* pioneros para *mcr-1* de los protocolos de Liu *et al.*, 2016 y Rebelo *et al.*, 2018.

Asimismo, cualquier prueba convencional de PCR para la detección de los genes *mcr*; por sí solo, no confirma la resistencia a la colistina en las bacterias que lo portan, ya que pueden tener fenotipo sensible. Además, la dependencia de *primers* y sondas específicas en estas pruebas limitan la detección de mecanismos desconocidos de resistencia móvil a colistina; al contrario de la WGS. Con todo, ambos (PCR y WGS) son tomados como referencia para evaluar nuevos diseños de Real-time y multiplex PCR para los genes *mcr* (31).

Aunque no se han registrado niveles elevados de resistencia colistina, acontecieron emergencias esporádicas en diversas partes del mundo, principalmente debido a modificaciones del lípido A codificadas a nivel cromosómico (35).

Diversos estudios han determinado que los métodos convencionales empleados en los antibiogramas como: difusión de discos en agar, Epsilon test, microdilución, incluso los sistemas comerciales como el VITEK (Biomérieux), Phoenix (Becton

Dickinson), empleados en nuestros hospitales, generan falsa susceptibilidad a colistina, lo que podría estar conduciendo a subregistros de la resistencia real (36-38), como reportado en el presente estudio.

Dada la importancia del antibiótico y los problemas técnicos relacionados con la identificación de resistencia, ameritaba un estudio con una mejor metodología, en ese sentido, el método de elución de discos de colistina en caldo, ha demostrado efectividad en la detección de resistencia a colistina (39), Simner *et.al*, encontraron una categoría de interpretación (CA) del 98% y una categoría esencial (EA) del 99%, lo que convierte a esta prueba en reproducible y práctica; sin embargo, ellos sugieren que, para el caso de resistencia plasmídica en no fermentadores es necesario realizar pruebas confirmatorias (40).

El método reportado por Esposito *et al.* fue estandarizada para la detección fenotípica de la expresión del gen *mcr-1* en enterobacterias (30). No obstante, puede dar positivo frente a la expresión de cualquier producto codificado a partir de los genes *mcr*, requiriendo siempre la identificación individual del gen *mcr-1* a través de pruebas moleculares.

Los resultados del presente estudio encontraron un 7.22% de resistencia a colistina por el método de elución de discos de colistina en caldo, sin embargo, no se detectó la presencia del gen plasmídico *mcr-1*, por lo que asumimos que los hallazgos responden a resistencia cromosómica.

Pseudomonas aeruginosa presenta mecanismos de resistencia mediados por sistemas de dos componentes que permite a la bacteria responder a los cambios ambientales, modificando al lípido A de la membrana externa y reduciendo su

carga negativa (11). Las alteraciones en los sistemas *PmrA/B* y *PhoP/Q* causan modificaciones constitutivas y, en consecuencia, activan la transcripción del operón *pmrHFIJKLM* y la posterior adición de L-Ara4N al LPS, lo que finalmente conduce a la resistencia a la colistina (13). Se ha demostrado que otros tres sistemas de dos componentes contribuyen a la resistencia a colistina: *ParRS*, *ColRS* y *CprRS*. Las mutaciones en el sistema de dos componentes *ParRS* causan la expresión constitutiva del operón *pmrHFIJKLM*. Además, las mutaciones en los sistemas reguladores de dos componentes *ColRS* y *CprRS* también pueden contribuir a la resistencia a la polimixina, ya que la asociación de mutaciones en el gen *phoQ* y mutaciones en el gen *colS* o *cprS* confieren un alto nivel de resistencia a la colistina (4,12,13).

A nivel metodológico, este estudio presenta limitaciones: a) no se emplearon técnicas de muestreo para seleccionar los aislados y la información epidemiológica, así como la cantidad de muestras, fue limitada, b) fue impreciso el porcentaje de aislados obtenidos del centro N°1 en el periodo descrito, c) no se identificaron los mecanismos de resistencia a la colistina de los 7 aislados fenotípicamente resistentes y menos aún, se evaluaron otras variantes del gen *mcr*, d) no se tienen datos sobre el desempeño de la prueba molecular de Liu *,et al* para detección del gen *mcr-1*.

Con el método de elución de discos de colistina en caldo se identificó 7 aislados resistentes a la colistina que previamente fueron reportados como sensibles en el establecimiento de salud al que correspondían. En tal sentido, consideramos importante implementar en la rutina del laboratorio de microbiología clínica esta metodología, para mejorar la vigilancia de la susceptibilidad a colistina.

6. CONCLUSIONES

El presente estudio describió *Pseudomonas aeruginosa* resistente a colistina con una baja frecuencia de 7,22%, que correspondería a mecanismos cromosómicos. Los mecanismos de resistencia a la colistina encontrados no son mediados por genes plasmídicos *mcr-1*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control* [Internet]. 10 de abril de 2017 [citado 10 de agosto 2018];12:Doc05. doi: 10.3205/dgkh000290
2. Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, et al. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. junio de 2011 [citado 11 de mayo de 2018];43(2):136-53. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412011000200012
3. Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G. Colistín en la era post-antibiótica. *Rev Chil Infectol* [Internet]. abril de 2016 [citado 02 de abril 2020];33(2):166-76. doi: 10.4067/S0716-10182016000200006
4. Bialvaei AZ, Kafil HS. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 3 de abril de 2015 [citado 10 de agosto de 2018];31(4):707-21. doi: 10.1185/03007995.2015.1018989

5. MacNair CR, Stokes JM, Carfrae LA, Fiebig-Comyn AA, Coombes BK, Mulvey MR, et al. Overcoming mcr-1 mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nat Commun* [Internet]. 31 de enero de 2018 [citado en 10 de mayo de 2018];9(1):458. doi: 10.1038/s41467-018-02875-z
6. Medina J, Paciel D, Noceti O, Rieppi G. Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. *Rev Médica Urug* [Internet]. septiembre de 2017 [citado en 16 de mayo de 2018];33(3):79-114. doi: 10.29193/rmu.33.3.5
7. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 18 de mayo 2020];56(12):1441-60. doi: 10.1007/s40262-017-0561-1
8. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [citado 02 abril de 2020];7:1789. doi:10.3389/fmicb.2016.01789
9. Yilmaz Gul R., Dizbay Murat, Guven Tumer, Pullukcu Husnu, Tasbakan Meltem, Guzel Ozlem Tunccan, et al. Risk factors for infection with colistin-resistant gram-negative microorganisms: a multicenter study. *Ann Saudi Med* [Internet]. 1 de mayo de 2016 [citado 14 de mayo de 2018];36(3):216-22. doi: 10.5144/0256-4947.2016.216

10. García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, et al. Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 1 de julio de 2018 [citado 5 de mayo de 2018];52(1):104-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.022
11. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, et al. Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* [Internet]. 2010 [citado 12 de abril de 2020];30(12):1279-91. doi: 10.1592/phco.30.12.1279.
12. Li Z, Cao Y, Yi L, Liu J-H, Yang Q. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 1 de octubre de 2019 [citado 05 de mayo de 2020];6(10). doi: 10.1093/ofid/ofz368
13. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1 de abril de 2017 [citado 20 de mayo 2020];30(2):557-96. doi: 10.1128/CMR.00064-16
14. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1 de febrero de 2016 [citado 6 de mayo de 2018];16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7

15. Gröndahl- Yli- Hannuksela K, Lönnqvist E, Kallonen T, Lindholm L, Jalava J, Rantakokko- Jalava K, et al. The first human report of mobile colistin resistance gene, *mcr-1*, in Finland. *APMIS* [Internet]. 2018[citado 3 de mayo de 2018];126(5):413-7. doi: 10.1111/apm.12834
16. Pham Thanh D, Thanh Tuyen H, Nguyen Thi Nguyen T, Chung The H, Wick RR, Thwaites GE, et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de agosto de 2016 [citado 14 de mayo de 2018];71(8):2314-7. doi: 10.1093/jac/dkw173
17. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 19 de julio de 2020];9(1):508-16. doi: 10.1080/22221751.2020.1732231
18. Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders J, de Jong MD, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* [Internet]. febrero de 2016 [citado 30 de mayo de 2018];16(2):147-9. doi:10.1016/S1473-3099(15)00541-1
19. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Eurosurveillance* [Internet]. 28 de abril de 2016 [citado 30 de mayo de 2018];21(17):30214. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214

20. Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 1 de enero de 2019 [citado 06 de enero 2020];51(1):93-100. doi: 10.1016/j.ram.2018.05.001
21. Ugarte RG, Olivo JM, Corso A, Pasteran F, Albornoz E, Blácido ZPS. Resistencia a colistín mediado por el gen *mcr-1* identificado en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Primeros reportes en el Perú. *An Fac Med* [Internet]. 9 de octubre de 2018 citado 17 de agosto de 2018];79(3):213-7. doi: 10.15381/anales.v79i3.15313
22. Butaye P, Wang C. Colistin resistance, beyond the current knowledge. *EBioMedicine* [Internet]. 2018 [citado 17 de agosto de 2018];34:16-7. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.08.002
23. Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis* [Internet]. junio de 2019 [citado 6 enero de 2020];6(2):109-19. doi: 10.1016/j.gendis.2019.04.001
24. Aquino R, Gonzáles E, Samaniego S, Rivera J, Cedeño V, Urbina Y, et al. Caracterización molecular de bacterias patógenas de las vías respiratorias de pacientes peruanos con fibrosis quística. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* [Internet]. 9 de octubre de 2017 [citado 03 de junio de 2018];34(3):423-35. doi: 10.17843/rpmesp.2017.343.2529
25. Díaz-Tello J, Rojas-Jaimes J, Ibarra-Trujillo J, Tárraga-Gonzales D. Sensibilidad antimicrobiana de la microbiota ambiental de las unidades de

- cuidados intensivos de un hospital peruano. Rev Peru Med Exp Salud Pública [Internet]. 22 de febrero de 2017 [citado 03 de junio de 2018];34(1):93-7. doi: 10.17843/rpmesp.2017.341.2709
26. Fernández DF, García C, Zegarra J, Granados L. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de secreción endotraqueal en la unidad de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, 2016. Rev Medica Hered [Internet]. 21 de diciembre de 2017 [citado 03 de junio de 2018];28(4):236-236. doi: 10.20453/rmh.v28i4.3223
27. Oliva-Menacho J, Oliva-Candela J, Garcia-Hjarles M. Bacterias patógenas multidrogoresistentes aisladas en estetoscopios de médicos en un hospital de nivel III. Rev Medica Hered [Internet]. octubre de 2017 [citado 03 de junio de 2018];28(4):242-6. doi: 10.20453/rmh.v28i4.3224
28. Servicio Antimicrobianos (LRR) - Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas- Administración Nacional de Laboratorios e Institutos (INEI-ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán” (INEI ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán. Método de Elución de discos de colistín. Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencias en Antimicrobianos [Internet]. Nov 2017 [citado 10 de agosto de 2018]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-de-Eluci%C3%B3n-de-Discos-de-COL-version3-Nov2017.pdf>
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2019.

30. Esposito F, Fernandes MR, Lopes R, Muñoz M, Sabino CP, Cunha MP, et al. Detection of Colistin-Resistant *MCR-1*-Positive *Escherichia coli* Using Inhibition by EDTA and Zeta Potential Assays. *J Clin Microbiol* [Internet]. 4 de octubre de 2017 [citado 10 de agosto de 2018];55(12):3454-65. doi: 10.1128/JCM.00835-17
31. Sekyere JO. *Mcr* colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen* [Internet]. 2019 [citado 19 de julio de 2020];8(4):e00682. doi: 10.1002/mbo3.682
32. Hernández-Gámez O, Camacho-Romero O, González-Torres HJ, Bolívar-González S, Campo-Urbina M, Zuluaga-De León I. Impacto sobre la resistencia bacteriana de la revisión previa de la prescripción de antibióticos por el servicio farmacéutico en hospitales del Atlántico(Colombia). *Rev Salud Uninorte* [Internet]. agosto de 2019 [citado 04 de junio 2020];35(2):187-204. doi: 10.14482/sun.35.2.615.1
33. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Bouchillon SK, Jonge BLM de, Stone GG, Sahm DF. In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* Collected in Latin American Countries: Results from the INFORM Global Surveillance Program, 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 de abril de 2019 [citado 04 de junio de 2020];63(4):e01814-18. doi:10.1128/AAC.01814-18
34. Hart M, Martínez M, González A. Resistencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes graves. *Rev Acta Méd de Cuba* [Internet]. 2017 [citado

04 de junio de 2020];18(2). Disponible en:

<https://www.medigraphic.com/pdfs/actamedica/acm-2017/acm172b.pdf>

35. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. diciembre de 2009 [citado 04 de junio de 2020];22(6):535-43. doi:10.1097/QCO.0b013e328332e672
36. Lee SY, Shin JH, Lee K, Joo MY, Park KH, Shin MG, et al. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital. *J Clin Microbiol* [Internet]. junio de 2013 [citado 04 de junio de 2020];51(6):1924-6. doi: 10.1128/JCM.00427-13
37. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* [Internet]. junio de 2013 [citado 04 de junio de 2020];51(6):1678-84. doi: 10.1128/JCM.03385-12
38. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp.* *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 1 de agosto de 2018 [citado 04 de junio de 2020];24(8):865-70. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.020
39. Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o

panresistentes. Rev Panam Salud Publica [Internet]. agosto de 2019 [citado 04 de junio de 2020];43:e65. doi: 10.26633/RPSP.2019.65

40. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. J Clin Microbiol [Internet]. 1 de febrero de 2019 [citado 17 de mayo de 2020];57(2): e0116318. doi: 10.1128/JCM.01163-18

8. TABLAS

Tabla 1: Susceptibilidad a colistina en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de tres establecimientos de salud de Lima, Perú (N=97).

	N=97	Colistina*	
		Resistente N=7	Sensible N=90
Institución:			
Centro N°1	29 (29.9%)	2 (28.6%)	27 (30.0%)
Centro N°2	16 (16.5%)	2 (28.6%)	14 (15.6%)
Centro N°3	52 (53.6%)	3 (42.9%)	49 (54.4%)
Tipo de muestra			
Aspirado bronquial	4 (4.26%)	0 (0.00%)	4 (4.60%)
Bilis	1 (1.06%)	0 (0.00%)	1 (1.15%)
Coprocultivo	2 (2.13%)	1 (14.3%)	1 (1.15%)
Drenaje torácico	1 (1.06%)	0 (0.00%)	1 (1.15%)
Espujo	1 (1.06%)	0 (0.00%)	1 (1.15%)
Hemocultivo	11 (11.7%)	3 (42.9%)	8 (9.20%)
Orina	8 (8.51%)	1 (14.3%)	7 (8.05%)
Secreciones	57 (60.6%)	2 (28.6%)	55 (63.2%)
Urocultivo	9 (9.57%)	0 (0.00%)	9 (10.3%)

* No se detectaron niveles intermedios debido a que no hay esa clasificación según la guía CLSI (M100-2019).