



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE MEDICINA

**“EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Pseudomonas aeruginosa RESISTENTES A
CARBAPENEMS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A :
QBP. JEIRY TORIBIO JIMÉNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR
CODIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS SILVA SANCHEZ

CHILPANCINGO, GRO., NOVIEMBRE DE 2005.

**“EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Pseudomonas aeruginosa RESISTENTES A
CARBAPENEMS”**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital General de Acapulco, Gro., y en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

Bajo la dirección de:

Dra. Berenice Illades Aguiar
Dr. Jesús Silva Sánchez

La tutoría de:

Dr. Saúl López Silva

La asesoría de:

Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dr. Alejandro Millán Vega
Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

La colaboración de:

**Hospital General de
Acapulco, Gro.**

Dr. Fausto Jaimes Domínguez
Dr. Salvador Valle Silva
QFB. Amparo Calderón Navarro
Enf. Gregoria Juárez Flores
Enf. Rufina López Lázaro

**Instituto Nacional de Salud
Pública**

M en C. Ulises Garza Ramos
Q. Alejandro Sánchez Pérez
QBP. Berta Alicia Carrillo
Q. Fernando Reyna
TLC. Teresa Rojas

Esta investigación se desarrolló con presupuesto de CONACYT, proyecto salud 2003-co1-009.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	22
REFERENCIAS.....	29

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Casos de infección nosocomial por servicio en el Hospital General de Acapulco, Guerrero. México, durante enero a diciembre de 2003.	11
Tabla 2. Casos de infección nosocomial por área en el servicio de pediatría del Hospital General de Acapulco, Guerrero. México, durante a enero a diciembre de 2003.	12
Tabla 3. Fenotipo de resistencia de aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes.	15
Tabla 4. Datos epidemiológicos y moleculares de los aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenems.	21

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución por mes durante el año 2003 de las cepas aisladas de <i>P. aeruginosa</i> en el servicio de pediatría del Hospital General de Acapulco, Gro. México.	13
Figura 2. Distribución de la resistencia en los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> aisladas del servicio de pediatría del Hospital General de Acapulco, Gro. , en el año 2003.	14
Figura 3. Gel representativo de la electrofóresis en gel por campos pulsados de los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> con <i>SpeI</i> aisladas del servicio de pediatría del Hospital General de Acapulco, Gro.	16
Figura 4. Dendrograma de patrones de similitud de los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> de acuerdo al coeficiente de Dice.	16
Figura 5. Método de sinergismo en disco de imipenem, meropenem, ceftazidima y EDTA para diferenciación de aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> productora de Metalobetalactamasas. Control positivo <i>P. aeruginosa</i> VIM.	17
Figura 6. Gel representativo por SDS-PAGE de las proteínas de membrana externa de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenems.	18
Figura 7. Gel de agarosa, donde se muestran los productos de PCR de aproximadamente 620 pb del gen <i>mexR</i> en aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenems.	19
Figura 8. Múltiples alineamientos de las secuencias del gen <i>mexR</i> de <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenems.	20

LISTA DE ABREVIATURAS

MIC	Concentración mínima inhibitoria
MBLs	Metalobetaláctamasas
PFGE	Electroforesis en gel por campos pulsados
UCI-A	Unidad de Cuidados Intensivos Adultos
UCI-P	Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
RNP	Recién nacidos patológicos
IN	Infección nosocomial
LB	Luria Bertoni
OMP	Proteína de membrana externa
AMP	Ampicilina
SAM	Ampicilina/sulbactam
CAZ	Ceftazidima
CRO	Ceftriaxona
FEP	Cefepime
CXM	Cefuroxime
CIP	Ciprofloxacina
IMP	Imipenem
MER	Meropenem
OFX	Ofloxacina
PRL	Piperacilina
TZP	Piperacilina/tazobactam
TIM	Ticarcilina
TOB	Tobramicina
CEF	Cefotetan
SXT	Trimetoprim/sulfametoxazol
NCCLS	Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-duodocil sulfato de sodio

PM	Peso molecular
Kd	Kilo daltons
Kb	Kilo bases
HTH	Hélice-Vuelta-Hélice
UTIP	Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica
SENTRY	Programa de Vigilancia Antimicrobiana
V	Valina
E	Glutamato
R	Arginina
S	Serina

RESUMEN

OBJETIVO: Caracterizar molecularmente el mecanismo de resistencia a carbapenemes en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se analizaron 30 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del servicio de Pediatría del Hospital General de Acapulco, Gro, en el año 2003. La identificación y susceptibilidad bacteriana se realizó mediante el sistema automatizado MicroScan, con el panel combo 20 para Enterobacterias. Se determinó el origen clonal por electroforesis en gel por campos pulsados. Se determinó la producción de metalo- β -lactamasas (MBL) mediante el sistema de sinergismo de doble disco. Se realizó el análisis de porinas por SDS-PAGE. Se amplificó y secuenció el gen represor *mexR* del operón de expulsión a múltiples drogas MexAB-OprM. **RESULTADOS:** La tasa de IN anual fue de 6.2 por cada 100 egresos, y la tasa de IN del servicio de pediatría fue de 16 por cada 100 egresos, durante el 2003. Se aislaron 30 cepas de *P. aeruginosa* con multirresistencia a casi todos los antibióticos usados comúnmente en la clínica. Se conformaron 4 grupos de acuerdo a su fenotipo de resistencia. Se identificaron 4 grupos clonales durante el periodo de estudio y en las diferentes salas del hospital. De los 30 aislamientos solo el grupo 1 (8/30) presentaron resistencia a carbapenemes y fueron candidatas para el análisis molecular. En 3 de 8 aislamientos, el represor *mexR* presentó la mutación V₁₂₆E y en 1/8 presentó la mutación antes mencionada más la mutación R₆₃S, estos cambios confieren resistencia a carbapenemes, 4/8 fueron idénticas a la cepa control *P. aeruginosa* PAO1 silvestre. El análisis del patrón de porinas presentó un patrón idéntico al silvestre. Así mismo no se observó producción de MBL's en estos aislamientos. **CONCLUSIÓN:** Estos resultados sugieren que no existió ningún brote por *P. aeruginosa* en el servicio de pediatría. Asimismo, la resistencia en estos aislamientos clínicos está mediada por la alteración del represor *mexR* de la bomba de eflujo MexA-MexB-OprM. Además se recomienda mantener una vigilancia epidemiológica en el uso de los antimicrobianos, especialmente carbapenemes para reducir la selección de resistencia bacteriana y controlar la diseminación clonal en forma permanente de *P. aeruginosa* entre los pacientes más susceptibles.

Palabras claves: Infección nosocomial, multirresistentes, carbapenemes, *P. aeruginosa*, bombas de eflujo.

Abstract

Objective: Molecular and epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* intrahospitalary clinic isolates carbapenems resistant. **Material and Methods:** Identification and susceptibility of thirty clinic isolates from pediatric service of General Hospital of Acapulco, Gro were performed by MicroScan automation system with panel combo 20 for Enterobacteriaceae. The clonal origin of the strain was obtained by pulsed field gel electrophoresis. The metallo- β -lactamase (MBL) and porins production were determined using double disc synergistic system and SDS-PAGE respectively. The *mexR* repressor-gene of the multidrugs efflux MexAB-OprM operon was amplified and sequenced from carbapenems resistant group. **Results:** In 2003, the annual rate of Nosocomial Infection (NI) was 6.2 percent, where 16 percent of it came from pediatric service. All the clinic isolates were multiresistant to the most commune used antibiotics. The isolates were classified in ford phenotypes and clonal groups. Eight strains of carbapenems-resistant group were molecular analyzed. Ford strains had the mutation V126E in *mexR* gene and one of them has a second substitution R63S and the rest possessed the wild type genotype. Those mutations could confer one type of the carbapenems resistant. We do not observed changes in OprD porins pattern and in MBL's production. **Conclusion:** Alterations in *mexR* repressor-gene of efflux systems MexAB-OprM could confer a type of carbapenems resistant in clinic isolates *P. aeruginosa* strains.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Nosocomial Infection, carbapenems, resistance, efflux, metallo-(-lactamases and porins.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo, aerobio facultativo, oxidasa y catalasa positivas, no formadora de esporas, móvil debido a la presencia de flagelos polares, que pertenece al grupo heterogéneo de los no fermentadores.¹ Es un importante patógeno oportunista, causa múltiples infecciones dentro y fuera de los hospitales, afecta cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales, cuando se alteran mucosas ó piel por lesión tisular directa, además cuando se aplican catéteres intravenosos o urinarios. Este microorganismo se fija a las mucosas, coloniza, invade de manera local y produce enfermedad. Infecta heridas y quemaduras originando pus de color azul verdoso, causa meningitis cuando se introduce por punción lumbar e infección en las vías urinarias cuando es introducida por catéteres o por soluciones de lavado. La causa de las infecciones del tracto respiratorio se debe a la utilización de respiradores contaminados, ocasionando neumonías necrosantes.^{2,3} En lactantes o en pacientes debilitados tiende a invadir el torrente sanguíneo y causar sepsis mortal.⁴

La electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés), es el método considerado como el estándar de oro, para la tipificación molecular ya que permite analizar el 80-90% del cromosoma bacteriano, con lo que se obtiene la huella genética única e inequívoca. Este método se ha aplicado a investigaciones de brotes causados por *P. aeruginosa* con diversos fines. Con este método es posible confirmar reinfecciones, recaídas o la persistencia de una misma cepa en un mismo paciente o en varios pacientes de una sola unidad y ha sido de gran utilidad en estudios de diseminación clonal dentro de un hospital, de una ciudad o entre ciudades.⁵⁻⁷

Actualmente los carbapenemes, llamados imipenem y meropenem, son los antibióticos de primera elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Estas drogas presentan estabilidad a las β -lactamasas y tienen un amplio espectro de actividad comparado con otros antibióticos β -lactámicos.⁸ La resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, se muestra en bajos niveles (MIC, 8 a 32 $\mu\text{g/ml}$); la resistencia a imipenem típicamente se refleja por la pérdida de la permeabilidad de la

membrana o pérdida de la porina OprD (D2) y la resistencia por este mecanismo es co-dependiente con la expresión de la β -lactamasa cromosomal AmpC; la resistencia a meropenem, pero no a imipenem, se debe a la sobreexpresión del sistema de eflujo *mexAB-oprM*. La alta resistencia a ambos carbapenemes (MIC \geq 32 μ g/ml) es poco común en este microorganismo, pero puede ser causada también por la presencia de β -lactamasas de clase B, también llamadas carbapenemasas.⁸⁻¹⁰

Las Metalobetalactamasas (MBL's) son enzimas denominadas "carbapenemasas" que hidrolizan a antibióticos carbapenemes (imipenem y meropenem)⁶⁻⁷. Estas enzimas están codificadas por los genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* contenidos en una región de genes móviles, insertados en un integrón y se denominan de clase VIM, IMP, GIM-1 y SPM. Los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas han sido detectados en Reino Unido, Italia y Portugal, lo cual se ha sugerido que este puede ser un mecanismo de resistencia que desencadene un problema de resistencia global.¹⁸⁻¹⁹

En *P. aeruginosa* se han identificado cuatro sistemas de multicomponentes para la expulsión de los antibióticos,^{10,14} denominados bombas de eflujo, constituidos por los complejos: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM. Cada uno de estos sistemas consisten de una membrana interna de la familia de división celular - nodulación - resistencia (RND por sus siglas en inglés), entre ellos MexB, MexD, MexF y MexY, un componente formador de canal en la membrana externa (OprM, OprJ y OprN), y de una proteína de fusión del periplasma con la membrana interna (MexA, MexC, MexE y MexX) la cual acopla la membrana interna con la membrana externa para la extracción directa del antibiótico. De las bombas de eflujo conocidas en *P. aeruginosa*, solamente MexAB-OprM codifica para la expulsión de un sideróforo, pioverdina.¹⁵ Los sustratos de MexAB-OprM incluyen a antibióticos: β -lactámicos, inhibidores de β -lactamasas, quinolonas, tetraciclina, trimetoprim, cloramfenicol, macrólidos, novobiocina, y sulfonamidas.¹¹ El operón *mexAB-oprM* es regulado negativamente por el producto del gene *mexR*, localizado río arriba de *mexA* y se transcribe en dirección opuesta. Mutaciones en *mexR* conllevan a la sobreexpresión de este operón, resultando en resistencia incrementada a múltiples antibióticos.¹⁶⁻¹⁷

Con el objetivo de caracterizar molecularmente el mecanismo de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa* aisladas del servicio de Pediatría del Hospital General de Acapulco, Guerrero, se analizaron aislamientos clínicos de diferentes tipos de muestras, en los cuales se identificaron las bacterias presentes, se realizó la susceptibilidad antimicrobiana, el origen clonal, la presencia de enzimas MBL's, la presencia de mutaciones en el gen regulador *mexR* de la bomba de expulsión *mexAB-oprM*, así como el análisis de las proteínas de membrana externa.

MATERIAL Y MÉTODOS

El Hospital General de Acapulco, Gro. de la Secretaría de Salud es un hospital de segundo nivel donde se atienden pacientes adultos y pediátricos. Cuenta con 120 camas censables. La vigilancia de las infecciones nosocomiales se realizó en el año 2003 en todo el hospital, dos enfermeras altamente capacitadas realizaron la vigilancia. La detección de casos de infección nosocomial se realizó mediante la revisión de los resultados del laboratorio de microbiología, curvas térmicas, indicación de antibióticos, así como la búsqueda intencionada de pacientes de alto riesgo. Las enfermeras llenan un formato de infección nosocomial (IN) de cada paciente que incluye, datos acerca de los factores de riesgo para adquirir la infección, microorganismo causal, susceptibilidad antimicrobiana, tratamiento administrado, alimentación parenteral y desenlace. Estos datos son almacenados en el programa Epi-Noso v 1.1. Para definir la infección nosocomial se utilizaron los criterios previamente establecidos por el Centro para la Prevención y el Control de las Enfermedades de Estados Unidos de América, estos criterios dependen de las características de la infección y el sitio anatómico comprometido. Solo se consideró como infección nosocomial aquella ocurrida después de 72 horas del ingreso del paciente.

El hospital en estudio cuenta con los servicios de Medicina Interna, Gineco-Obstetricia, Urgencias, Cirugía, Traumatología, Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCI-A) y Pediatría. Dentro del servicio de Pediatría se atienden a pacientes en base a la edad y se dividen en lactantes, unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN), recién nacidos patológicos (RNP), unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCI-P), urgencias pediátricas, aislados y escolares.

En este estudio se incluyeron a aquellos pacientes ingresados al servicio de pediatría entre enero a diciembre de 2003. La tasa de infecciones nosocomiales se calculó con base al número de episodios de infección captados, dividido entre el número de egresos y multiplicando el resultado por 100.

Obtención de las cepas: De enero a diciembre de 2003 se obtuvieron 30 aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, de pacientes atendidos en el servicio de Pediatría del Hospital General de Acapulco, Guerrero, México. Se incluyó un aislamiento por paciente y

se registraron datos de identificación del paciente y los relacionados al sitio infectado.

Identificación y susceptibilidad antimicrobiana: La identificación y la susceptibilidad de los aislamientos clínicos se determinó por CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) usando el sistema automatizado MicroScan (Dade Behring Inc) con el combo panel tipo 20 para Enterobacterias de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se confirmó la identificación mediante pruebas bioquímicas convencionales (producción de pigmento verde “piocianina”, crecimiento a 42°C, indol y oxidasa), por la técnica de Kirby-Bauer se determinó la susceptibilidad a 7 antibióticos: levofloxacina (5µg), cloramfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), aztreonam (30µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), y ceftazidima (30µg) y los resultados se interpretaron de acuerdo a las recomendaciones del Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS por sus siglas en inglés) (14 suplemento informativo M100-S14 del año 2004)²⁰

Caracterización clonal de los aislamientos clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa*:

La caracterización clonal de todas las cepas se realizó por la técnica de electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés). La purificación del DNA de los 30 aislamientos clínicos se realizó a partir de un cultivo puro en caldo luria bertonii (LB), las células se cosecharon por centrifugación a 13, 000 rpm por 2 min a 4°C, posteriormente se lavaron con solución PIV (NaCl 1M, Tris 0.01M pH 8.0), y se resuspendieron en 440 µl de la misma solución. La suspensión se mezcló con un volumen igual de agarosa al 1.5 % Sea Plaque GTC de bajo punto de fusión a 65°C (Bioproducts Rockland, Maine USA), de esta mezcla se hicieron discos de 20µl que después fueron tratados con solución de lisis EC (Tris 6 mM [pH 8.0], NaCl 1M, EDTA 0.1M [pH 8.0], desoxicolato de Na 0.1%, Sarcosyl 0.5%, 50 µg/ml de RNAsa A, 100 µg/ml de lisozima, 50 µg/ml de lisostafina) a 37°C durante 5 horas, posteriormente la solución se sustituyó con la solución ES (EDTA 0.5M [pH 8.0], Sarcosyl 1%) con 1.0 mg/ml de proteinasa K a 50°C por 20 horas. La solución se decantó y se lavaron los discos con la solución amortiguadora TE 1X (Tris 1M [pH 7.5], EDTA 0.5M [pH 8.0]), en agitación suave durante 1 hora a T.A por cuatro veces. La digestión del DNA se realizó con 25 U de enzima *SpeI* (New England Biolabs, Hertfordshire, United Kingdom) a 37 °C durante 17 horas. La separación de los fragmentos de DNA se realizó por electroforesis de campos pulsados, en un sistema de electroforesis

(Laboratorios BioRad CHEF-DR2 PFGE, Canadá) en geles de agarosa (SeaKem LE, FNC Bioproductos) de bajo punto de fusión al 1.4% en amortiguador TBE 0.5X (Tris base 45 mM, ácido bórico 45mM, EDTA 1 mM [pH 8.0]) a un voltaje de 11 V/cm, con pulsos de cambio de linearidad de 5 a 40 segundos a 16°C, durante 14 horas y de 1 a 100 segundos por 23 horas. Se usó como marcador estándar de peso molecular el Lambda ladder PFG Marker # 340 (New England Biolabs, Ontario Canadá). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 30 minutos y se visualizaron con luz UV. Para la determinación de los tipos clonales se analizaron los perfiles de restricción visual, usando los criterios de Tenover y colaboradores.⁵

Detección de Metalobetalactamasas: Los aislamientos resistentes a carbapenemes se hicieron crecer en caldo Luria Bertoni y fueron ajustados al 0.5 del nefelómetro de McFarland y se inocularon en placas de agar Mueller Hinton (Oxoid, Canadá), utilizando discos impregnados con antibióticos: imipenem (10µg), meropenem (10µg), ceftazidima (30µg) y discos impregnados con 10 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0. Estos discos se colocaron de la siguiente manera: a la izquierda el disco de imipenem (10µg), al centro el disco con EDTA 0.5 M (5µmol) y a la derecha el disco de ceftazidima (30µg), y abajo el disco con meropenem (10µg) con una distancia de 10 mm entre borde y borde. Posteriormente las cajas se incubaron a 35°C por 18 horas. La presencia de una zona de sinergismos entre los discos fue interpretada como positivo para el screening de hidrólisis a carbapenemes. En cada ensayo se incluyeron las siguientes cepas control: *P. aeruginosa* VIM-1resistente y *P. aeruginosa* ATCC 27853 sensible a carbapenemes.^{24, 29}

Aislamiento de Proteínas de Membrana Externa (OMP): Para el análisis de proteínas de membrana externa se utilizó el método descrito por Piddock et al¹³. Las bacterias resistentes a carbapenemes se crecieron en medio Luria Bertoni líquido hasta la fase logarítmica a 37°C en un volumen total de 50 ml. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm/4°C durante 5 minutos. Las células obtenidas fueron lavadas con 10 ml de la solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2), se centrifugaron a 5000 rpm y se resuspendieron en el mismo amortiguador dos veces. Las bacterias se sonicaron con 7 pulsos cada uno de 30 segundos, el sobrenadante se ultra-centrifugó (rotor ti80) a 40,000 rpm durante 40 minutos para eliminar las células no rotas. Las células se resuspendieron en

Na₂HPO₄ 10mM pH 7.2, 2% tritón X100, y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Las fracciones insolubles se ultra-centrifugaron a 40,000 rpm por 40 minutos, la pastilla que se obtuvo se resuspendió en 200 µl de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2. En esta suspensión se localizan las proteínas de membrana de externa. Posteriormente se agregó un volumen igual de amortiguador de muestra (Tris HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10%), las muestras se calentaron a 90°C por 5 minutos, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 14%, para tener una mayor separación de las bandas de proteínas. Para visualizar las bandas de proteínas, el gel se tiñó con azul de coomassie R-250. Se usó el marcador de peso molecular para proteínas con los siguientes intervalos (66000, 45000, 36000, 29000, 24000, 20000, 14200 KDa) (Sigma), cada muestra del gel contenía 5 µg totales de proteínas. El corrimiento del gel se realizó en una cámara de electroforesis para proteínas a 50 V toda la noche.²⁵⁻²⁶

Obtención de DNA cromosomal. De los aislamientos clínicos resistentes a carbapenemes, se seleccionaron 2-3 colonias de un cultivo fresco en placa, se resuspendieron en 50 µl de H₂O milliQ estéril contenida en un tubo eppendorf, se pusieron en baño María a ebullición durante 10 min e inmediatamente, 5 min en hielo. Se repitió lo anterior por tres veces y después se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se realizó una dilución de 10⁻¹ (10µl del sobrenadante + 90µl de H₂O).²¹

Amplificación del gene *mexR* por PCR y secuenciación: Para amplificar el gene *mexR* de los aislamientos clínicos a carbapenemes, se emplearon los iniciadores: *mexR1*, 5'-CGCCATGGCCCATATTGAG-3' y *mexR2*, 5'-GGCATTGCGCCAGTAAGCGG - 3', que amplifican aproximadamente 620 pb²¹. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 µl con una concentración final de 0.2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 0.5 µM de cada iniciador, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 U de Taq DNA polimerasa, 10 µl de la solución que contiene el DNA. La mezcla de reacción fue sujeta a un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguida por 25 ciclos de 1min a 94°C, 1 min a 60 °C, 1.5 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C, en un termociclador Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700.²¹ En cada corrimiento se incluyó la cepa control tipo silvestre de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Los fragmentos amplificados fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5µg/ml). Las bandas de DNA se visualizaron con luz UV y se fotografiaron. Se usó como marcador de peso molecular a ϕ X174/Hae III. Los productos de PCR fueron purificados con el kit Wizar PCR (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente fueron secuenciados con los oligonucleótidos *mexR1* y *mexR2* en el equipo ABI PRISM 3100 (Perkin–Elmer División, Applied Biosystems), con el Kit Taq FS Dye terminador Cycle Sequencing.²² La conversión de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó con el programa Translate tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Los alineamientos múltiples de los nucleótidos y aminoácidos se efectuaron en el programa Clustal W del paquete GCG (Genetics Computer Group) usando como secuencia de referencia *mexR* (número de acceso al Genbank U23763).

Análisis estadístico: Se calcularon proporciones de cepas resistentes. El análisis del patrón de bandas electroforéticas se hizo con base en el coeficiente de similitud de Dice, se calculó la probabilidad de que las semejanzas entre clonas sea debida al azar y la representatividad del dendrograma resultante se verificó determinando el coeficiente cofenético. Con el software NTSYpc v 2.02j (Applied Bioestadistics Inc. Setauket, Nueva York) se generaron el coeficiente de similitud, la probabilidad y el dendrograma.

RESULTADOS

Epidemiología de las Infecciones Nosocomiales:

De enero a diciembre de 2003, egresaron del Hospital General de Acapulco, Gro. 6, 409 pacientes, fueron identificadas 400 como infección nosocomial (IN). La mayoría de las IN se presentaron en junio (43/400) y agosto (41/400), con mínimos en mayo (18/400) y abril (26/400). La tasa de infección nosocomial anual en todo el hospital fue de 6.2 por cada 100 egresos y la tasa de infección nosocomial en el servicio de pediatría fue 16 por cada 100 egresos, una estancia hospitalaria promedio por paciente no infectado de 4.2 días contra pacientes infectados de 22 días. Los servicios más afectados por las infecciones nosocomiales en el periodo estudiado, se localizó en pediatría con un 61% (249/400) y cirugía con el 19% (73/400), con mínimos en gineco-obstetricia (15/400) y medicina interna (16/400). Las áreas más afectadas del servicio de pediatría fueron: la UCIN (79/249), y la UCIP (61/249), de ellos fallecieron 36 individuos. El 47% (188/249) de los casos lo constituyeron los pacientes menores de un año. Estos datos se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. ^a Casos de infección nosocomial por servicio en el Hospital General de la SSA de Acapulco, Guerrero. México, durante enero a diciembre de 2003.

SERVICIO	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
CIRUGIA	6	7	9	9	4	11	9	3	0	2	6	7	73
GINECO-OBST	4	0	0	0	0	2	1	1	2	2	2	1	15
MED. INT	2	2	2	2	2	3	0	1	2	0	0	0	16
PEDIATRÍA	19	20	24	13	11	18	15	33	22	29	22	24	249
UCI-ADULTOS	5	2	2	2	1	9	5	3	11	2	2	3	47
TOTAL	36	31	37	26	18	43	30	41	37	35	32	35	400

^a Datos obtenidos del comité de vigilancia de infecciones nosocomiales del hospital en estudio.

Tabla 2. ^a Casos de infección nosocomial por área en el servicio de Pediatría del Hospital General de la SSA de Acapulco, Guerrero. México, durante enero a diciembre de 2003.

Área	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
AISLADOS	0	0	1	0	0	1	0	1	2	1	0	0	5
RNP	5	4	2	3	1	1	1	0	1	12	3	5	26
UCI-PED	3	2	3	0	4	6	5	17	6	8	4	11	61
LACTANTES	0	2	1	0	1	0	0	1	2	0	0	1	8
ESCOLARES	0	9	3	3	1	1	4	4	2	1	2	1	30
NEONATOS	10	3	12	7	4	9	5	6	9	7	13	6	79
URG-PED	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	6
TOTAL	18	20	24	13	11	18	15	33	22	29	22	24	249

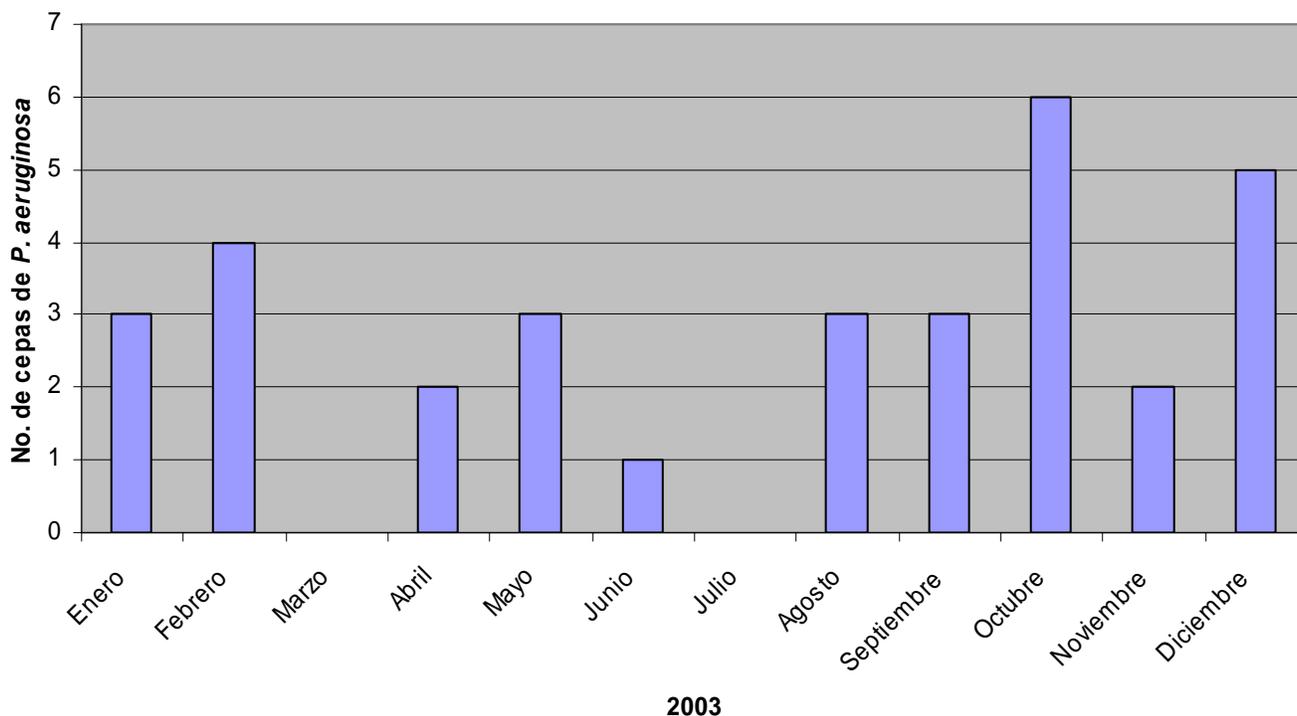
^a Datos obtenidos del comité de vigilancia de infecciones nosocomiales del hospital en estudio.

Aislamientos clínicos:

En el periodo de estudio se colectaron 30 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* provenientes del servicio de Pediatría del Hospital General de Acapulco, Gro. México. Las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio, fueron recuperadas de catéter (31.5%), secreción bronquial (28.0%), hemocultivo (19.0%), secreción de herida quirúrgica (6.0%), y otros tipos. Por área hospitalaria, se determinó que el mayor número de pacientes afectados por *Pseudomonas aeruginosa* fueron los de la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCI-P) con un total de 13 aislados clínicos (43.3%) seguida por el área de Neonatología con 10 (33.3%) y por último Pediatría con 7 (23.4%).

Con respecto a la distribución mensual de las cepas aisladas se determinó que en el mes de octubre se colectaron 6 cepas de *P. aeruginosa*, seguido por diciembre con un total de 5 cepas, mientras que en los meses de marzo y julio no se aisló ninguna cepa como se muestra en la figura 1.

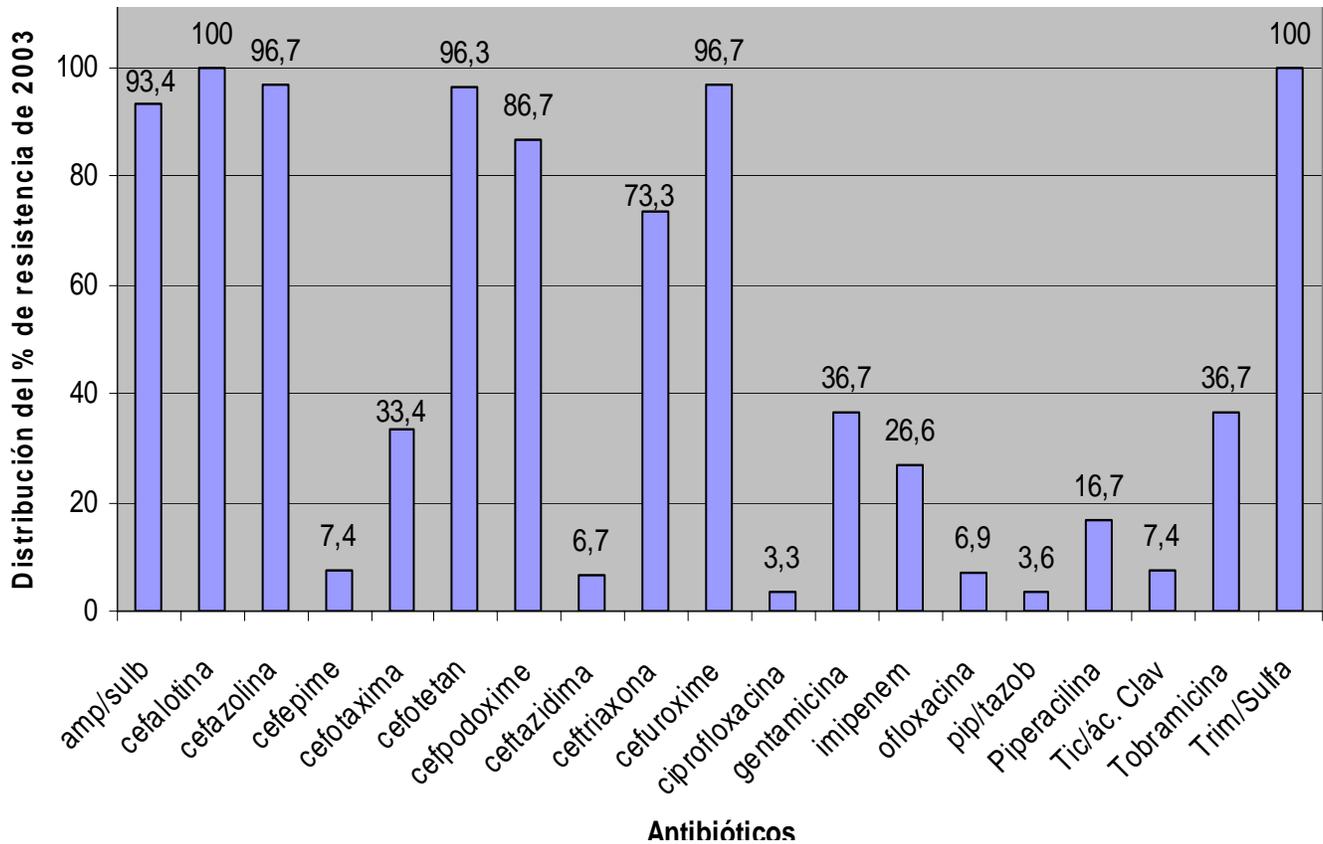
Figura 1 Distribución por mes durante el año 2003 de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* en el Servicio de Pediatría del Hospital General de la SSA de Acapulco, Guerrero. México.



Susceptibilidad antimicrobiana:

Todos los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron resistentes a cefalotina y a trimetoprim/sulfametoxazol, la resistencia a ampicilina y cefuroxima fue del 96.7% (29/30), a cefotetan 96.3% (28/30), a ceftriaxona 73.3% (22/30), y una susceptibilidad del 96.7%(29/30) a ciprofloxacina, el 96.4% (29/30) y 92.6% (25/27) piperacilina/tazobactam y ticarcilina/ácido clavulánico respectivamente, como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Distribución de la Resistencia en los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* aisladas del servicio de Pediatría del Hospital General de la SSA de Acapulco, Gro, en el año 2003.



De acuerdo a los patrones de resistencia que mostraron los aislamientos de *P. aeruginosa* se agruparon en 4, el grupo 1 (8/30) presentó resistencia a ciprofloxacina, imipenem y ticarcilina, grupo 2 (12/30) presentó resistencia a ceftazidima, cefuroxima, y tobramicina, grupo 3 (5/30) fue resistente a gentamicina, ofloxacina y piperacilina y el grupo 4 (5/30) fue resistente a piperacilina/tazobactam, y susceptible a la mayoría de los antibióticos usados en este estudio. Estos fenotipos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Fenotipos de resistencia de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes.

	^a ANTIMICROBIANOS																Número de aislamientos (%)
	AMP	SAM	CAZ	CRO	FEP	CXM	CIP	CN	IMP	OFX	PRL	TZP	TIM	TOB	CEF	SXT	
Gpo.1	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	8/30 (26.6%)
Gpo.2	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	12/30 (40%)
Gpo.3	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	I	S	S	S	R	5/30 (16.7%)
Gpo.4	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	5/30 (16.7%)

^aAMP- ampicilina, SAM- ampicilina/sulbactam, CAZ- ceftazidima, CRO- ceftriaxona, FEP- cefepime, CXM- cefuroxima, CIP- ciprofloxacina, CN- gentamicina, IMP- imipenem, OFX-ofloxacina, PRL- piperacilina, TZP- piperacilina/tazobactam, TIM- ticarcilina, TOB- tobramicina, CEF- cefotetan, SXT- trimetoprim/sulfametoxazol., R- resistente, I – intermedio, S – susceptible.

Caracterización clonal:

Mediante la utilización de la técnica de electroforesis en gel por campos pulsados se logró establecer la relación epidemiológica en la mayoría de las infecciones por *P. aeruginosa* y por lo tanto inferir en el comportamiento clonal endémico en el hospital en estudio. Mediante los criterios de identificación visual se detectaron 4 clonas mayoritarias denominadas A (con cuatro aislamientos), clona B (con tres aislamientos), más un subtipo (B1) y las clonas C y D (con tres aislamientos cada una), estos resultados demuestran que las clonas mayoritarias existieron a lo largo del periodo de estudio. También se observaron 6 patrones genómicos no relacionados a las clonas genotipos: J, M, N, K, Ñ y L. En la figura 3 se muestra el análisis visual de las bandas y en la figura 4 se muestra el dendrograma correspondiente entre los 30 aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. El coeficiente de similitud entre todas las clonas fue de 48%. La probabilidad de que las relaciones fueran al azar se calculó en un 0.002. La similitud entre los subtipos es del 65% lo que refleja la gran variabilidad observada entre las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en este estudio.

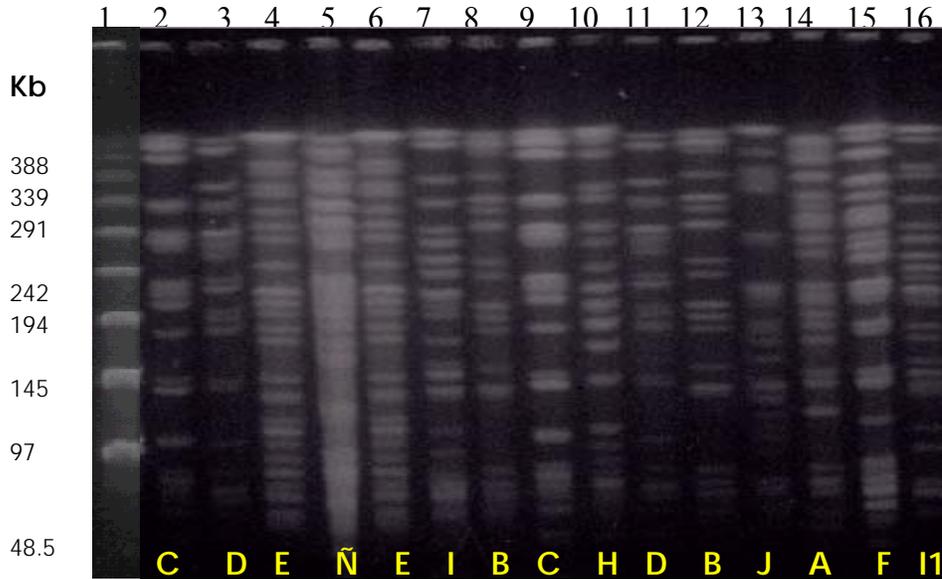


Figura 3. Gel representativo de la electrofóresis en gel por campos pulsados de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* con *SpeI* aisladas del Hospital General de Acapulco, Gro. Carriles 1 marcador PM; 2-16 *Pseudomonas aeruginosa*. En la parte inferior se indican los tipos (C,D,E,Ñ,I,B,H,D,B,J,A,F) y subtipos (I1) establecidos por análisis visual.

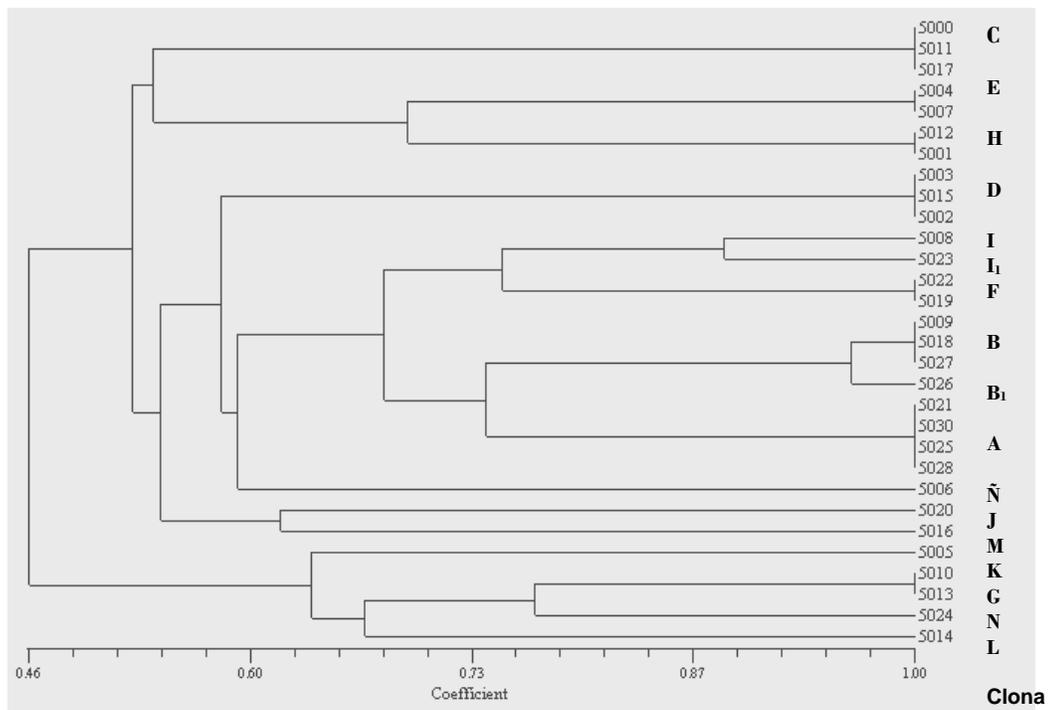


Figura 4. Dendrograma de patrones de similitud de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de acuerdo al coeficiente de Dice.

Producción de Metalobetalactamasas:

Con la inducción de producción de metalobetalactamasas en los 8 aislamientos clínicos resistentes a carbapenemes (grupo 1 de resistencia), no fue posible identificar aislamientos positivos al screening de metalobetalactamasas por el método de sinergismo entre los discos empleados como se muestra en la figura 5.

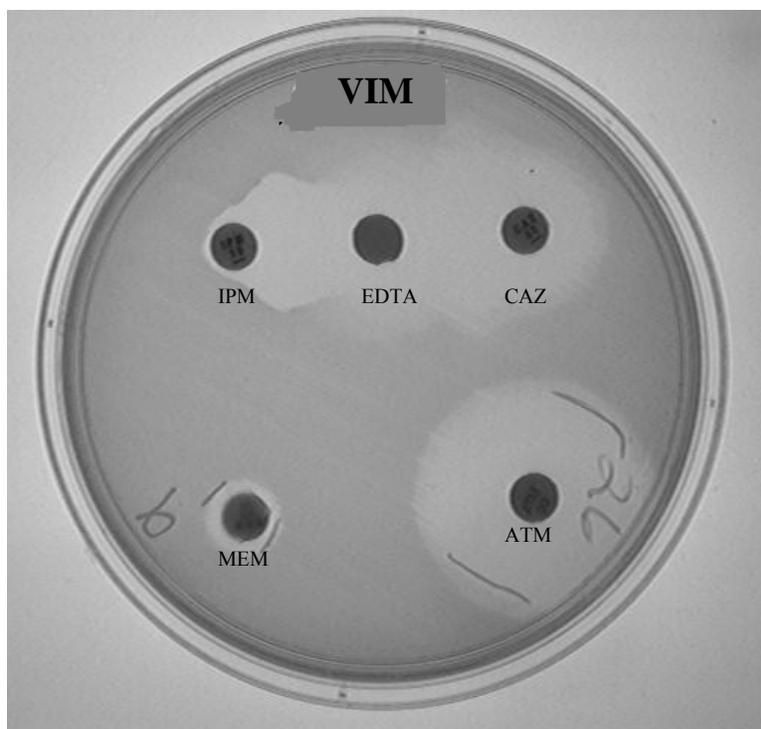


Figura 5. Método de sinergismo en disco de imipenem, meropenem, ceftazidima y EDTA para diferenciación de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* productora de Metallo- β -lactamasas. Control positivo *P. aeruginosa* VIM-1.

Proteínas de membrana externa (OMP):

Los 8 aislamientos clínicos que conformaron el grupo 1 de resistencia (imipenem, meropenem) fueron candidatas para el análisis de porinas. En los 8 aislamientos de *P. aeruginosa* analizados no hubo evidencia de pérdida total de la proteína de membrana externa OprD (45 kD) con respecto a la cepa silvestre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sensible a imipenem. En la figura 6 se muestra el patrón de OMP en los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem.

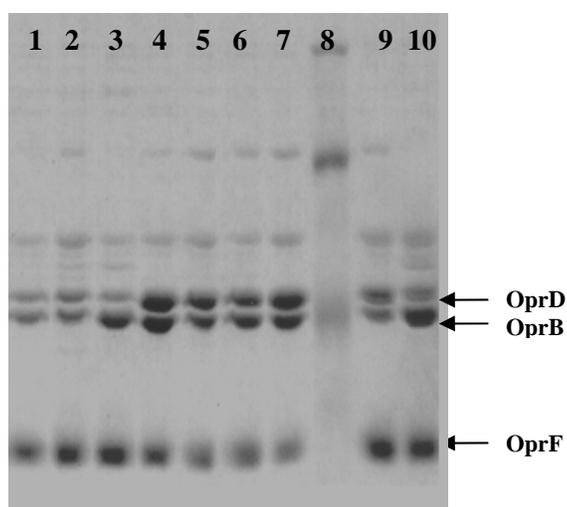


Figura 6. Gel representativo por SDS-PAGE, de las proteínas de membrana externa de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes aisladas del Hospital General de Acapulco, Gro. Carril 1 *P. aeruginosa* PAO1; carriles 2-7,9 *P. aeruginosa* resistente a imipenem; carril 8 Marcador de PM; carril 10 *P. aeruginosa* VIM.

Amplificación y análisis de la secuencia de *mexR*:

Ocho de 30 aislados clínicos fueron candidatos para la amplificación del gen *mexR* debido al fenotipo de *P. aeruginosa* multidrogoresistentes (MDR por sus siglas en inglés) y su resistencia a IMP, MER, C, TE, SXT y sensibilidad a levofloxacina y a aztreonam. El producto de PCR fue de 620 pb. En la figura 7, se muestran los fragmentos amplificados del gen *mexR*.



Figura 7. Gel de agarosa, donde se muestran los productos de PCR de aproximadamente 620 pb del gen *mexR* en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. Carril 1 Marcador de PM Φ X174/ *Hae III*; Carril 2 *P. aeruginosa* PAO1 control positivo *mexR*; carril 3 y 4 *P. aeruginosa*; carril 5 control negativo.

Los 8 productos de PCR correspondientes al gen represor *mexR* del operón de eflujo a múltiples drogas MexA-MexB-OprM, fueron secuenciados y se dedujo la secuencia de aminoácidos. En la figura 8 se muestra el alineamiento de los 8 aislamientos clínicos resistentes a carbapenemes en la cual se identificó un cambio del aminoácido Valina por Glutamato en la posición 126 (4/8) y el cambio de una Arginina por Serina en la posición 63 (1/8), las cepas que no presentaron mutaciones con respecto a la *P. aeruginosa* PAO1 fueron consideradas de tipo silvestre (4/8). (Tabla 4). Estas mutaciones son localizadas dentro del dominio HTH (hélice-vuelta-hélice) de la proteína MexR.

CLUSTAL W (1.83) múltiple alineamiento de secuencias

```

5019  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
5021  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
PAO   MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
5013  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
5010  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
5026  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
5027  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
5018  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
5009  MNYPVNPDLMPALMAVFQHVTRTRIQSELDCQRLDLTPPDVHVLKLIDEQRGLNLQDLGRQ
*****

5019  MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
5021  MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
PAO   MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
5013  MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
5010  MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
5026  MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
5027  MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
5018  MCRDKALITRKIRELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
5009  MCRDKALITRKISELEGRNLVRRERNPSDQRSFQLFLTDEGLAIHQHAEAIMSRVHDELF
*****

5019  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
5021  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
PAO   APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
5013  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
5010  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
5026  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
5027  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
5018  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
5009  APLTPVEQATLVHLLDQCLAAQPLEDI
*****

```

Figura 8. Se muestran los alineamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes. En color amarillo se muestran los cambios de R₆₃S y V₁₂₆E y en color azul se muestra el dominio HTH de la proteína MexR.

En la tabla 4 se resumen los datos obtenidos del grupo de aislamientos a los cuales se les detectaron las mutaciones en el gen represor *mexR* del operón de expulsión a múltiples drogas *mexAB-oprM*, así como los datos epidemiológicos de los aislamientos clínicos multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 4 Datos epidemiológicos y moleculares de los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes

No. Aislamiento	Fecha de aislamiento (Día/Mes/Año)	Sala ^c	Tipo de muestra	Patrón PFGE	Fenotipo de resistencia ^a							Mecanismo de resistencia	
					IMP	MER	CAZ	SXT	C	TE	LEV	<i>mexR</i>	Mutación ^d <i>mexR</i>
5009	13/09/03	UCI-P	Catéter	B1	R	R	S	R	R	R	S	+	V ₁₂₆ E;R ₆₃ S
5018	15/10/03	URG-P	Catéter	B	R	R	R	R	R	R	S	+	V ₁₂₆ E
5026	31/07/03	URG-P	Catéter	B	R	R	S	R	S	R	S	+	V ₁₂₆ E
5027	30/12/03	URG-P	Hemocultivo	B	R	R	R	R	I	R	S	+	V ₁₂₆ E
5010	21/11/03	UCI-P	Sec. bronqueal	G	R	R	S	R	I	R	S	+	Silvestre
5013	24/01/03	PED	Sec. bronqueal	G	R	R	S	R	R	R	S	+	Silvestre
5019	23/10/03	NEO	Hemocultivo	F	I	R	S	R	R	R	S	+	Silvestre
5021	21/05/03	PED	LCR	A	R	R	S	R	I	I	S	+	Silvestre

^a R, resistente; I, intermedio; S, susceptible, ^b Producción de Metalobetalactamasas, ^c áreas: ICU-P, (unidad de cuidados intensivos pediátricos); PED, (pediatría); URG-P, (urgencia pediátrica); NEO, (neonatología). ^dV-valina, E-glutamato, R- arginina, S-serina

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se reportan los resultados del primer estudio sobre la caracterización molecular del represor *mexR* del operón de expulsión a múltiples drogas *mexAB-oprM* en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes, procedentes del servicio de pediatría del Hospital General de Acapulco, Gro. México. Durante el periodo comprendido Enero a Diciembre de 2003.

Las infecciones nosocomiales en México de acuerdo a la literatura nacional, se presentan entre un 5 – 14 %.^{8,9} El presente trabajo muestra los resultados observados después de un año de vigilancia epidemiológica en el Hospital General de Acapulco, Gro, donde la tasa de IN anual en todo el hospital fue del 6.2 por cada 100 egresos y en el servicio de pediatría la tasa general de infecciones nosocomiales fue de 16 por cada 100 egresos. Los servicios donde se concentraron el mayor número de infecciones fueron en pediatría con 249 IN (61%) y cirugía con 73 IN (19%). Las áreas más afectadas del servicio de pediatría fueron la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) y la unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCI-P), con una tasa promedio de 31.7 y 24.5 IN por cada 100 egresos. La prevalencia encontrada concuerda con lo reportado por Navarrete y col. quienes obtuvieron una tasa promedio de 37.4 y 21.9 IN por cada 100 egresos. Mientras que Tinoco y col. reportan tasas de 44.9 y 51.9 IN por cada 100 egresos en la UCIN y en la UTIP (unidad de terapia intensiva pediátrica) respectivamente. Las tasas de IN en estas salas fueron más elevadas respecto a otras salas de atención hospitalaria. Estas dos unidades por lo común son las que mantienen una incidencia elevada de IN debido al perfil del paciente que ingresa a las mismas; que por lo general son multiinvasivos (catéter, sondas, intubación, solución parenteral...etc). Además guardan una relación estrecha con los factores de riesgo propios del hospedero, ejemplo de ello es la gravedad de su enfermedad y su estado inmunocomprometido, especialmente en neonatos prematuros en quienes la estancia puede prolongarse por la naturaleza de su enfermedad, a su medio ambiente hacinado, al uso indiscriminado de antibióticos y los posibles errores en las técnicas invasivas, así como la toma inadecuada de cultivos microbiológicos.^{27,29}

En cuanto a la presentación de casos por edades continúan siendo más susceptibles los grupos de menor edad, especialmente los recién nacidos. En el presente trabajo el 47% que presentaron una infección nosocomial fueron los menores de un año, quienes tienen una respuesta inmadura a nivel de opsonización, fagocitosis, y complemento. Otros factores de riesgo importantes de señalar en el periodo neonatal son la prematuridad, el bajo peso al nacer, la ruptura prematura de membranas y la asfixia perinatal.²⁹

La flora infectante que predominó en las infecciones nosocomiales fue: *Staphylococcus spp* (27%), *Candida spp* (16.5%), *Pseudomonas aeruginosa* (15.5%) y otros. Mientras que Camacho-Ramírez y col reportan a *Pseudomonas aeruginosa* (27%), *Staphylococcus aureus* (20%) y *Klebsiella pneumoniae* (15%) lo cual difieren con nuestros hallazgos.⁹ Esta flora infectante probablemente está relacionada al tipo de pacientes hospitalizados y al uso de antibióticos de amplio espectro que se emplean en el hospital como tratamiento empírico, por lo que se deberá racionalizar su empleo y obtener en lo posible el mayor número de aislamientos mediante una correcta toma de cultivos, solicitar pruebas de susceptibilidad y así ofrecer un tratamiento específico y evitar el abuso de antibióticos de amplio espectro en forma empírica para disminuir la posibilidad de resistencia bacteriana y la predisposición al desarrollo de infecciones por patógenos oportunistas.⁹

El grado de multiresistencia de *Pseudomonas aeruginosa* causante de infección nosocomial, podría estar relacionado con el uso indiscriminado de antimicrobianos en los pacientes infectados, este estudio se identificaron 4 patrones de multiresistencia que incluyen varios de los antibióticos usados comúnmente en la clínica. Por otro lado, *P. aeruginosa* puede permanecer por largos periodos de tiempo dentro de los hospitales, esto es por su capacidad de colonizar superficies inanimadas que pueden ser una fuente de infección para los pacientes hospitalizados.⁹ Los porcentajes de resistencia a carbapenemes reportados varían considerablemente entre los aislamientos *Pseudomonas aeruginosa*. En este estudio el porcentaje de resistencia a imipenem fue considerablemente bajo de 26.6% a diferencia de lo observado por Helio S. Sader del 65% reportado en un Hospital de Brasil y el 30% reportado en México.²⁸ Nuestro estudio detectó 8/30 aislamientos resistentes a imipenem y meropenem, con halos de inhibición de hasta 10 mm de diámetro. El grado de

multirresistencia a los antimicrobianos en *P. aeruginosa* (β -lactámicos, carbapenemes, sulfonamidas, cloramfenicol) refleja el uso prolongado y dosis inadecuada del tratamiento. Sin embargo, en este estudio las cepas fueron susceptibles a quinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina).²⁹

La tipificación molecular por PFGE, en comparación con algunos métodos fenotípicos (serotipificación, patrones de susceptibilidad, perfil de plásmidos, y perfil de proteínas de membrana externa), ha demostrado ser el estándar de oro para detectar brotes o reinfecciones. En este estudio se reportan 4 clonas mayoritarias a lo largo del periodo de estudio a no corresponder a un brote causado por *P. aeruginosa* en el servicio de Pediatría. En relación a la clona B, se localizó en urgencias pediátricas con intervalos de 2 meses de diferencia y con el mismo fenotipo de resistencia, por lo que esta clona podría estar circulando a través de las manos del personal de salud dentro de la unidad hospitalaria. Nuestros resultados difieren de lo reportado por G. Miranda, en la cual demuestran contaminación cruzada en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCI-P) y otras áreas del hospital.⁴ Otro estudio reportado por Ortiz-Herrera M, demuestra patrones de restricción distintos a partir de una misma muestra. Esto demuestra la persistencia de infecciones simultáneas por más de una cepa de *P. aeruginosa* entre pacientes con fibrosis quística. Las cepas de *P. aeruginosa* fueron aisladas de distintos sitios anatómicos predominando las puntas de catéter (31.5%), secreción bronquial (28%) y hemocultivos (19%), además se identificaron en distintas salas del servicio de Pediatría, y en diferentes periodos de tiempo, estos resultados demuestran la persistencia de más de una cepa dentro de este servicio en el hospital en estudio. Estos resultados permiten monitorear cuidadosamente el manejo de catéteres vasculares, considerar su permanencia y efectuar curación de los mismos para evitar que sea colonizado por patógenos nosocomiales. Otro aspecto importante es asegurarse de la esterilidad de las soluciones o nutrición infundida por las líneas vasculares.^{4,29}

Pseudomonas aeruginosa presenta resistencia intrínseca (natural) a una gran diversidad de agentes antimicrobianos, incluyendo muchos β -lactámicos, los resultados en este estudio demuestran alto grado de multirresistencia a antibióticos β -lactámicos. Esta resistencia

podría deberse a la expresión de β -lactamasas de clase A (TEM, SHV), la cual hidrolizan a antibióticos β -lactámicos. Otro mecanismo por el cual *P. aeruginosa* puede ser resistente es por la adquisición de elementos genéticos móviles (integrones, transposones, plásmidos) en la cual se diseminan los genes que confieren resistencia a carbapenemes, y codifican para las Metalobetalactamasas.^{14, 18, 19} La detección de las metalobetalactamasas en las cepas con resistencia a imipenem, meropenem y susceptibles a aztreonam, fueron negativas a la producción de enzimas capaces de hidrolizar carbapenemes, este estudio demostró que el grupo 1 de resistencia (8/30) no presenta este mecanismo de resistencia en el servicio de pediatría. Otros reportes demuestran la presencia de estas enzimas, que están codificadas en integrones, y los genes que las codifican se han denominado *bla_{VIM}*, y *bla_{IMP}*.²⁷ El programa SENTRY ha demostrado claramente que los genes de las MBL, pueden surgir y diseminarse rápidamente entre especies y entre regiones geográficas. La emergencia y diseminación de los genes móviles de MBL puede representar el factor más importante que conlleva al incremento de resistencia a carbapenemes. Estas enzimas han sido detectadas en Grecia durante 1996, y en el año siguiente se detectaron en Italia, Europa y Japón, esto demuestra que la diseminación está ampliamente distribuida.²⁸

Uno de los fenotipos de resistencia a carbapenemes es la pérdida de la porina OprD (D2), en un estudio realizado por Cornaglia et al. Demuestran la ausencia de una proteína con peso molecular aparente a la OprD (45 KDa), en cepas resistentes a imipenem.²⁵ Estos resultados difieren con este estudio, dado que los 8/30 aislamientos de *P. aeruginosa*, resistentes a carbapenemes, no presentaron pérdida de la proteína OprD pero sí presentaron modificaciones en la expresión de las proteínas de membrana externa (OprD), la cual demuestra que la resistencia se debe a otro mecanismo y no a la pérdida de la permeabilidad de la membrana externa.

La proteína MexR, es el represor transcripcional del operón *mexA-mexB-oprM*, que codifica para una bomba de expulsión a múltiples drogas que incluye: β -lactámicos, inhibidores de β -lactamasas, quinolonas, tetraciclinas, trimetoprim, cloramfenicol, meropenem, y macrólidos.¹² Mutaciones en el gen *mexR*, conlleva a la sobreexpresión de este sistema y se ve reflejado en la multiresistencia de *P. aeruginosa*.¹² En este estudio la

detección del gen *mexR* se realizó por la técnica de PCR en los 8 aislamientos resistentes a carbapenemes. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las cepas que pertenecen a la clona B, son las únicas que presentan un cambio de una Valina por Glutamato en la posición 126, y el subtipo B1, también tiene la mutación antes mencionada en adición otro cambio de Arginina por Serina en la posición 63. Estas mutaciones se localizan dentro del dominio HTH (hélice-vuelta-hélice) de la proteína MexR. Este dominio está implicado en el reconocimiento de la proteína MexR con el sitio operador en el DNA bacteriano y a la vez inhibe la transcripción de los genes que conforman la bomba de expulsión *mexAB-oprM*.^{12, 14} Las cepas que pertenecen a otras clonas (G, A y F), no presentaron cambios en la secuencia de aminoácidos del gen *mexR* en comparación con la cepa *P. aeruginosa* PAO1 de tipo silvestre.^{13,17} El mecanismo de resistencia en las cepas silvestres podría estar mediado por otro tipo de bombas de expulsión denominada MexT-MexEF-OprN, que también confiere resistencia imipenem y meropenem.¹³ Este trabajo es el primer reporte de la mutación V₁₂₆E en cepas autóctonas la cual parece estar implicada en la resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*. Ho,S.E. and Navaratnam, P. reportan esta mutación en el Genbank ([AAO40258](#)) (Mutation in MexAB-OprM regulator gene, MexR contribute to the carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, artículo no publicado), por otro lado el cambio de Arginina por Serina en la posición 63 (R₆₃S) está también reportado en el Genbank ([NP249115](#)) pero no hay evidencia del efecto que causa en la resistencia a imipenem y meropenem en este patógeno. Por lo que se recomienda continuar con estudios prospectivos de biología molecular para entender si la mutación R₆₃S tiene efecto en la resistencia a carbapenemes u otros grupos de antibióticos. Además en este estudio se reporta por primera vez la asociación de las dos mutaciones en el subtipo B1 y se carece de información sobre el efecto causado en la multiresistencia de este patógeno. La información reportada en este estudio, junto con los resultados previos ayuda a entender que una sola mutación en el regulador *mexR* es suficiente para sobreexpresar el operón de expulsión a múltiples drogas *mexAB-oprM* y conferir resistencia a múltiples antibióticos en *P. aeruginosa*.¹²

El presente reporte muestra que la identificación y la caracterización mediante técnicas genotípicas de aislados multirresistentes de *P. aeruginosa* en poblaciones de pacientes con infección nosocomial del servicio de pediatría a lo largo de 2003 permite estudiar con mayor precisión la epidemiología de esta bacteria en estos pacientes lo que facilitará la evaluación de las medidas profilácticas, terapéuticas y de control de las poblaciones bacterianas, dado que la resistencia antimicrobiana, es el punto crítico del tratamiento de las enfermedades infecciosas en todo el mundo y las consecuencias que se derivan de un mal uso de los antimicrobianos, en el tratamiento de las infecciones está la disminución de opciones terapéuticas, la aparición de bacterias resistentes a varios grupos de antibacterianos, empeoramiento del curso clínico de la enfermedad base, aumento en los días de hospitalización, aumento de los costos hospitalarios, y en general constituye un problema de salud pública que afecta al paciente, la sociedad y al ambiente.

Una limitante en este estudio es que no se dispuso de aislamientos procedentes de otros servicios del mismo hospital y de otros hospitales de la región para fines de comparación de los patrones de restricción clonal y de los mecanismos de resistencia a carbapenemes. Con este estudio contribuimos a la tipificación molecular de las clonas de *P. aeruginosa*, al conocimiento de los patrones de resistencia y del mecanismo de resistencia a carbapenemes mediado por la bomba de eflujo *mexR-mexA-mexB-oprM*, la expresión de enzimas Metalobetalactamasas y la expresión de proteínas de membrana externa. El conocimiento de estos mecanismos podría redundar en la planeación de criterios para homogeneizar el tratamiento y el control de este patógeno nosocomial.

En conclusión, el presente estudio contribuye al conocimiento de la epidemiología de *P. aeruginosa* en el servicio de pediatría de la unidad hospitalaria, lo cual nos permite tomar medidas más directas sobre las áreas donde se desarrollaron las infecciones nosocomiales, así como en los grupos más susceptibles. Además, permite mantener una vigilancia epidemiológica en el uso de antimicrobianos, especialmente carbapenemes, para reducir la selección de resistencia bacteriana y controlar la diseminación clonal en forma permanente de *P. aeruginosa*.

REFERENCIAS

1. **Maki, DG.** 1989. Risk factors for nosocomial infection. Devices vs. nature and goals for the next decade. Arch Intern Medicine; **89**:777-784.
2. **Ponce de León S, Sigfrido Rancel-Frausto M, Elías-López J, Romero-Oliveros C, y Huertas-Jiménez M.** 1999. Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. Salud Pública México; **41**(1): 5-11.
3. **Díaz-Ramos R, Solórzano-Santos F, Padilla-Barrón G, Miranda-Nóvalés G, González-Robledo R, y Trejo-Pérez J.** 1999. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. Salud Pública México; **41**(1): 12-17.
4. **Miranda G, Léanos B, Carrillo B, Silva J, Muñoz O, and Solórzano F.** 2001. Molecular Epidemiology of a Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in a Pediatrics Intensive Care Unit. Scand J Infect Disease; **33**: 738-743.
5. **Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D and Swaminathan B.** 1995, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clinical Microbiology; **33** (9): 2233-39.
6. **Speijer H, Savelkoul P. H, Boten M, Stobberingh E, and Tjhie J.** 1999, Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemic in an Intensive Care Unit. J. Clinical Microbiology; **37** (11): 3654-3661.
7. **Nicole R, Ute R, Henri V, and Alex B.** 1996, comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. J. Clinical Microbiology; **34**: 3190-95.
8. **Rancel-Frausto M, Morales-García D, Báez-Martínez R, Ibarra-Blancas J, y Ponce de León S.** 1999. Validación de un programa de vigilancia de infecciones nosocomiales. Salud Pública México; **41**(1): 59-63.
9. **Camacho R, Ávila R, Sánchez H.** 2002. Epidemiología de las infecciones nosomiales en un hospital pediátrico de tercer nivel. Enf. Infections. **22**(4):200-2004.
10. **Ramakrishnan Srikumar, Catherine J. Paul, and Keith Poole.** 1999. Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriology; **182**(5):1410-1414.
11. **Isabelle Ziha-Zarifi, Catherine Llanes, Thilo Köhler, Jean-Claude Pechere, and Patrick Plesiat.** 1999, In Vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexAB-OprM. J. Antimicrobial Chemotherapy; **43**

- (2); 287-291.
12. **Lim D, Poole K, Strynadka NC.** 2002. Crystal structure of the MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of the *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biological Chemistry*; **277**: 29253-29259.
 13. **Webber, M. and Piddock, L.J.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrobial Chemotherapy*; **51**: 9-11
 14. **Kohjiro S, Shima E, Hideaki M, and Nakae T.** 2000, Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pumps expression in *P. aeruginosa*. *J. Elsevier Science B. V*; **195**: 23-28.
 15. **Kohjiro S, Hiroyuki A, Eisaku Y, and Nakae T.** 2003. Mutations affecting DNA-Binding activity of the MexR repressor of *mexR-mexA-mexB-OprM* operon expression. *J Bacteriology*; **185** (20):6195-6198.
 16. **K Poole, K Tetro, Q Zhao, S Neshat, DE Heinrichs and N Bianco.** 1996, Expression of the multidrug resistance operon *mexAB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *J. Antimicrobial Chemotherapy*; **40**(9); 2021-28.
 17. **Nobuhisa Masuda, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya, Naomasa Gotoh, Hideto Tsujimoto, and Takeshi Nishino.** 2000, Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrobial Chemotherapy*; **44** (12): 3322-3327.
 18. **S. Pournaras, M. Maniati, E. Petinaki, L. S. Tzouvelekis, A. Tsakris, N. J. Legakis and A. N. Maniatis.** 2000. Hospital Outbreak of Carbapenem –Resistant *P. aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable Metallo- β -lactamasas. *J. Infectious Disease Society of America*; **51**, 1409-1414
 19. **Giakkoupi P, Petrikkos G, Tzouvelekis L.** 2003. Spread de integron- associated VIM-type Metallo- β -lactamasas genes among imipenem-nosusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek Hospitals. *J. Clinical Microbiology*; 822-825.
 20. **National Committee for Clinical Laboratory Standard.** 2004. Approved Standard M100-S1 (M2). Performance standard for antimicrobial disk susceptibility. Testing; Ninth informational supplement. NCCLS. Wayne P.
 21. **Sánchez P, Rojo F, and Martínez J.** 2002, Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiology Letters*; **207**: 63-68.
 22. **Didier Hocquet, Xavier Bertrand, Thilo Köhler, Daniel Talon, and Patrick Plésiat.** 2003. Genetic and phenotypic variations of resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Epidemic clone.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **47**: 1887-1894.
23. **Patricia Sánchez, Juan Francisco Linares, Beatriz Ruiz-Díez, Ester Campanario, Alfonso Navas, Fernando Baquero and José L. Martínez.** 2002, Fitness of *in vivo* selected *Pseudomonas aeruginosa nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. J. Antimicrobial Chemotherapy; **50**; 657-664.
 24. **Dongeon Yong, Kyungwon Lee, Jong Hwa Yum, Hee Bong Shin, Gian Maria Rossolini, and Yunsop Chong.** 2002. Imipenem- EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- β -betalactamase- Producing Clinical Isolates de *Pseudomonas spp.* And *Acinetobacter spp.* J. Clinical Microbiology; 3798-3801.
 25. **Piddock LJV, Traynor EA, Wise R.** 1990. A comparison of the mechanisms of decreased susceptibility of aztreonam-resistant and ceftazidima-resistant Enterobacteriaceae. J. Antimicrobial Agents Chemotherapy; 26: 749-62.
 26. **N Masuda, E Sakagawa and S Ohya.** 1995. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *P. aeruginosa*. Antimicrobial Agents Chemother; 39: 645-9.
 27. **Salazar Holguín H, Huerta Míreles M, Moreno Díaz MR, Martínez Bustamante L.** 2001. Infecciones nosocomiales en un hospital de Segundo nivel. Revista Medica IMSS; 43-51.
 28. **Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN.** 2005. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J. International of Antimicrobial Agents; **25**(1) 57-61.
 29. **Ortiz-Herrera M, Gallegos Jerónimo A, Cuevas Schacht F, Pérez Fernández L, y Coria Jiménez R.** 2004. Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. Salud Pública de México; **46**: 149-156.