



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Perfil epidemiológico, clínico, fenotípico y genético de  
*Pseudomonas aeruginosa* en la Fundación Hospital de la  
Misericordia durante los años 2013-2014.**

**Juan Jailer Arango Alvarado**

Universidad Nacional De Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría  
Bogotá, Colombia

2014

**Perfil epidemiológico, clínico, fenotípico y genético de  
*Pseudomonas aeruginosa* en La Fundación Hospital de la  
Misericordia durante los años 2013-2014.**

**Juan Jailer Arango Alvarado**

Trabajo de Investigación presentado para optar al título de:  
**Especialista en Pediatría**

Director:

Dr. German Camacho: Pediatra, Infectólogo

Codirector:

Dra. Aura Lucia Leal Castro: Médico, Microbióloga

Universidad Nacional De Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría  
Bogotá, Colombia

2014

**Perfil epidemiológico, clínico, fenotípico y genético de *Pseudomonas aeruginosa* en la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**

**Resumen**

**Objetivo:** Identificar el perfil epidemiológico, clínico, fenotípico y genético de *Pseudomonas aeruginosa* en la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014. **Diseño:** Estudio Descriptivo, observacional, de corte transversal. **Población y muestra:** Cepas de *P. aeruginosa* aislada en el laboratorio de bacteriología de la Fundación Hospital de la Misericordia, a partir de líquidos corporales durante los años 2013-2014. **Metodología:** Se analizaron las historias clínicas de los pacientes correspondientes, junto con la caracterización demográfica, clínica y paraclínica. Se realizó el perfil fenotípico de resistencia según el antibiograma, el análisis del patrón clonal y el análisis de genes de producción de  $\beta$ -lactamasas y carbapenemasas. **Resultados:** La muestra fue constituida por 39 cepas de *P. aeruginosa* que fueron incluidos luego de verificar el cumplimiento de los criterios especificados para el estudio. Y los resultados se expondrán según el orden de los objetivos específicos a cumplir. **Conclusiones:** 2 terceras partes de las infecciones por *P. aeruginosa* se encuentran cepas sensibles y dentro de los perfiles de resistencia los de más alto porcentaje son la presencia de Metallo- $\beta$ -Lactamasas, pérdida de porina OprD y GES-2 para un 23.1% en total, seguido por la presencia de expresión de AmpC con un 7.7% y finalmente la expresión de BLEE y resistencia aislada a piperacilina tazobactam en igual proporción

**Palabras clave:**

*Pseudomonas aeruginosa*, epidemiología descriptiva, farmacorresistencia bacteriana, genética, microbiología

**Clinical Epidemiological, profile, phenotypic and genetic *Pseudomonas aeruginosa* in Fundación Hospital de la Misericordia during the years 2013-2014.**

**Abstract**

**Objective:** Identify the phenotypic and molecular epidemiological profile of *Pseudomonas aeruginosa* in Fundación Hospital de la Misericordia, 2013-2014.

**Design:** Descriptive, observational, cross-sectional study. **Population and**

**sample:** *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the bacteriology laboratory of Fundación Hospital de la Misericordia, from body fluids during the years 2013-

2014. **Methodology:** They analyzed the medical records of the patients concerned, Demographic, clinical and paraclinical of patients infected with *Pseudomonas aeruginosa*, Profile phenotypic resistance according to the antibiogram, Pattern Analysis of clonal and Analysis of Genes of  $\beta$ -lactamase and carbapenemases production. **Results:** The sample consisted of 39 strains of P.

*aeruginosa* that were then included to verify compliance with specified criteria for the study. And the results will be presented in the order of specific objectives to fulfill.

**Conclusions:** 2 thirds of P. *aeruginosa* infections in susceptible strains and resistance profiles the highest percentage are the presence of Metallo- $\beta$ -lactamase, loss of porin OprD and GES-2 to 23.1% in are total, followed by expression of the presence of a 7.7% AmpC and finally expression ESBL piperacillin and tazobactam resistance to isolated in equal

**Keywords:**

*Pseudomonas aeruginosa*, descriptive epidemiology, Drug Resistance, Bacterial / genetics / microbiology

## Definición y Justificación del Problema

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista, etiología de múltiples infecciones con alta morbimortalidad(1) especialmente en pacientes con factores de riesgo como fibrosis quística, hospitalización prolongada en cuidado crítico, e inmunocomprometidos. Es un bacilo gram negativo no fermentador, que puede subsistir en ambientes inertes con requerimientos nutritivos escasos(2).

Una dificultad en el manejo de los pacientes infectados con *Pseudomonas aeruginosa*, es la capacidad que tiene de presentar resistencia, inducible por el manejo antibiótico, siendo durante los últimos años uno de los patógenos más preocupantes a nivel de salud pública.

Para poder combatir esta bacteria, es necesario ser prudentes en la utilización de antibióticos, dado que el arsenal con el que se cuenta es escaso y no ha habido avances recientes en nuevos antibióticos que contrarresten las mutaciones adaptativas de este microorganismo (2).

El conocimiento del perfil epidemiológico de *Pseudomonas aeruginosa* es de gran importancia en la toma de decisiones lógicas y objetivas por parte de los clínicos, quienes a través de la lectura interpretada del antibiograma pueden determinar cuál es la mejor terapia según el fenotipo encontrado y evitar la inducción de enzimas y genes de resistencia bacteriana. El perfil genético, es una realidad, y aunque su estandarización no está al alcance de todos los clínicos, es muy útil en la vigilancia y control de brotes al permitir conocer la clonalidad entre aislados, identificar reservorios y determinar vías de transmisión, permitiendo diseñar medidas de acción apropiadas (53).

La Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI), es un hospital pediátrico de alta complejidad, que se caracteriza por ser centro de referencia de Colombia en todos los campos de la medicina Infantil, entre ellos oncohematología pediátrica, trasplante de progenitores hematopoyéticos, quemados y pacientes en estado crítico y es por esto que debe enfrentar retos importantes en el manejo de pacientes que han recibido tratamientos en otros lugares, patologías crónicas de alto costo y estancia prologada, con gran probabilidad de complicaciones. La infección por *Pseudomonas aeruginosa* es significativa en la institución dada las características de los pacientes tratados. Por lo tanto es necesario tomar medidas para reducir la morbimortalidad y dar seguridad a quienes dan manejos en la institución.

Al realizar este proyecto de investigación se busca caracterizar y describir fenotípicamente las *Pseudomonas aeruginosa* de la institución, determinar los genes de resistencia antimicrobiana y crear talento humano en investigación, que induzca cambios de paradigmas y mejor atención a los pacientes.

## Objetivos

### General:

Identificar el perfil epidemiológico, clínico, fenotípico y genético de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.

### Específicos:

1. Describir las características demográficas, clínicas y paraclínicas de los pacientes con cultivo positivo para *Pseudomonas aeruginosa*
2. Determinar el perfil de sensibilidad fenotípico de *Pseudomonas aeruginosa* según el antibiograma analizado.
3. Identificar el patrón clonal de *Pseudomonas aeruginosa* y establecer el mapa epidemiológico de la institución
4. Determinar la presencia de  $\beta$ -lactamasas y carbapenemasas implicadas en la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*

## Marco Teórico

### Definición

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram negativo no fermentador. Tiene la propiedad de subsistir en superficies inertes y producir biopelículas(3)(4). Esta característica permite su supervivencia en ambientes propios del ambiente clínico, creciendo en medios de cultivo habituales, pues sus requerimientos nutritivos son pocos (2). Posee un genoma con 6.3 millones de pares de bases, las cuales codifican 5570 genes y es rica en factores de virulencia(5).

Esta bacteria es un patógeno humano oportunista, que se localiza en ambientes bióticos y abióticos(6). Puede utilizar moléculas simples y pequeñas como componentes orgánicos complejos como el carbón, siendo capaz de crecer anaeróbicamente utilizando  $\text{NO}_3$  o arginina como aceptor de electrones respiratorios(7). Se aísla en pacientes con fibrosis quística(8), otitis media crónica, queratitis, quemados y sepsis en pacientes inmunocomprometidos(9).

### Perfil de Resistencia

Dentro de los fenotipos de *Pseudomonas aeruginosa* estudiados, el fenotipo salvaje o sensible se caracteriza por ser sensible a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepime, cefoperazona, aztreonam y carbapenémicos(3), pero se destaca por la expresión intrínseca de resistencia a una gran diversidad de antibióticos y además por el desarrollo de mecanismos de resistencia durante el manejo antimicrobiano a través de plásmidos e integrones o mutaciones en la codificación genética(10), que le confiere resistencia a compuestos habitualmente activos (11).

La resistencia intrínseca está dada por la escasa permeabilidad de su membrana celular externa, la presencia de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles (AmpC) y la expresión de sistemas de expulsión tipo MexAB-OprM(12). Algunas cepas pueden producir además de AmpC otras  $\beta$ -lactamasas como: oxacilinasas (OXA),  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), y/o carbapenemasas(2).

La pared de la *Pseudomonas aeruginosa* contiene la porina OprF en gran cantidad, pero esta no es eficiente para el paso de antimicrobianos. La OprD permite el paso de carbapenémicos(13) y su pérdida contribuye a la resistencia a este grupo antibiótico(14). Las porinas OprC y OprE son inducibles en anaerobiosis(3).

La  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de clase C (AmpC), es codificada por el gen *AmpC*(15), es el origen de la resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de espectro reducido, y como su nombre lo indica, es inducible por antibióticos como cefoxitina e imipenem, con su desaparición al retirar el agente inductor. Este fenotipo es sensible solo a carbapenémicos.

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de clase A pertenece al grupo funcional 2b', que la hace resistente a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepime, cefpiroma y aztreonam. Se inhibe con el ácido clavulánico y tazobactam, pero no tiene afinidad por los carbapenémicos. Las enzimas encontradas son del grupo TEM (TEM-4,TEM-21,TEM-24,TEM-42, TEM-116), SHV (SHV-2a, SHV-5, SHV-12), PER(PER-1), VEB(VEB-1, VEB-1a, VEB-1b, VEB-2), GES(GES-1, GES-2, GES-5, GES-8(IBC-2),GES-9) y BEL(BEL-1) (16).

Otras  $\beta$ -lactamasas como la de clase A y las del grupo 2c de Bush son capaces de hidrolizar la carbenicilina, ticarcilina y piperacilina, pero se inhiben con ácido

clavulánico y tazobactam. Dentro de las enzimas de este grupo se encuentra TEM1-2, PSE-1(CARB-2), PSE-4(CARB-1), CARB-3, CARB-4 (17). Las cepas con carbenicilinasas son sensibles a ceftazidima y carbapenémicos, pero pueden tener resistencia variable a cefepime y aztreonam(3).

Las oxacilinasas ( $\beta$ -lactamasas clase D), son del grupo 2d de Bush, no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Tienen actividad hidrolítica en cefotaxima, ceftazidima, cefepime, cefpiroma y aztreonam. Dentro de las más destacadas se encuentran la OXA-1, OXA-2 y OXA-10, caracterizándose por ser las causantes de resistencia a las carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, pero no a ceftazidima(18). Las derivadas de oxacilinasas clásicas (OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-19, OXA-32) afectan la actividad de ceftazidima con actividad hidrolítica variable a cefepime y aztreonam.

Otro mecanismo de resistencia son las carbapenemasas, de las cuales en *Pseudomonas aeruginosa* se han descrito las clases A (tipos KPC, GES, BIC), clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas (tipos VIM, IMP, SPM, NDM, DIM, AIM, FIM) y en menor proporción clase D (OXA-40) (38, 39). Las carbapenemasas clase A, al igual que otras betalactamasas de este grupo son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam, a diferencia de las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs), que no son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam, pero sí por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (19). Aunque las carbapenemasas tienen un amplio espectro de hidrolisis sobre todos los betalactámicos de uso clínico, las carbapenemasas de clase A se diferencian de las MBL porque estas últimas no hidrolizan los monobactámicos. De las carbapenemasas presentes en *Pseudomonas aeruginosa* en Colombia se han descrito la presencia de MBL de las variantes VIM-8 y VIM-2 y carbapenemasas KPC-2 (40, 41, 42).

Dentro de los sistemas de expulsión activa se han destacado 5 súper familias tipos RND (*resistance-nodulation-division*), que se integra de 3 partes: una proteína transportadora de la membrana citoplasmática, una factor externo y una proteína en el espacio periplásmico de unión de las dos partes anteriores(10). Los más comunes son MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM. Estos pueden afectar la actividad de betalactámicos, carbapenémicos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, lincomicina y novobiocina(16).

La resistencia a aminoglucósidos se presenta gracias a la modificación enzimática del antibiótico afectando su afinidad en la subunidad ribosómica 30s. Las enzimas implicadas son fosforiltransferasa (APH), adenililtransferasas o nucleotidiltransferasas (AADoANT) y acetiltransferasas (AAC). También se ha descrito la metilación en la subunidad 16s del ARN ribosómico(20). Estas metilasas son RmtA y RmtD. Los mecanismos de expulsión activa con MexXY y OprM, OpmB, OpmG y Opml son relevantes en la resistencia de los aminoglucósidos(21).

La resistencia a fluoroquinolonas es causado por cambios en la ADN girasa (afectación de los genes *gyrA* y *parC*) y topoisomerasa IV y los sistemas de expulsión activa (22).

Esta combinación de factores hace que la bacteria sea resistente intrínsecamente a penicilina, aminopenicilinas y sus  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas de primera y segunda generación, ceftriaxona, cefotaxima, cefalosporinas de tercera generación orales, cloranfenicol, nitrofurantoina, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclinas, novobiocina y ácido nalidixico(3). Aunque se han registrado casos de resistencia a la colistina, los mecanismos son aún desconocidos y se han relacionado a alteraciones en la proteína reguladora PmrA o la proteína de

membrana externa OprH, sin embargo, la mayoría de cepas continua siendo sensibles (23).

### **Tipificación Fenotípica y Genética o *Genéticoe***

Las técnicas utilizadas para la tipificación, se han clasificado en fenotípicas y genotípicas o *genéticoes*(25).

La primera de estas se basa en la sensibilidad de los antibióticos de las diferentes bacterias y tiene como objetivo principal guiar al clínico en la decisión del tratamiento antibiótico empírico ideal según la clínica y antecedentes del paciente; esta técnica se realiza mediante el antibiograma, en donde se obtiene la sensibilidad de una bacteria ante diferentes antibióticos in vitro y de este modo predecir le eficacia in vivo a través de un resultado cualitativo o cuantitativo, que van a sugerir si la bacteria será sensible o resistente a un antibiótico y determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) respectivamente (43).

Posteriormente en base a unos valores de la CIM establecidos por diferentes comités, dentro de estos y que se maneja en este estudio es el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en Estados Unidos, que tienen en cuenta las propiedades microbiológicas, farmacéuticas y de eficacia clínica para establecer unos puntos de corte de la CIM en las pruebas de sensibilidad y de esta forma definir la interpretación como sensible, intermedio o resistente (44).

Obteniendo estos resultados, se realiza la lectura interpretada del antibiograma, que es una herramienta que se empezó a utilizar en los años 70s, pero hasta 1992 el Dr. Patric Courvaline describió los conceptos y objetivos de esta herramienta en base a 3 fundamentos que son: a) caracterización fenotípica de resistencia a partir del estudio de sensibilidad frente a grupos de antibióticos de una misma familia; b) deducción a partir del fenotipo de resistencia del correspondiente mecanismo

bioquímico implicado, y c) inferencia del fenotipo previamente establecido a partir del mecanismo de resistencia deducido (45)

Dentro de los beneficios de la lectura interpretada del antibiograma se tiene la posibilidad de encontrar nuevos mecanismos de resistencia, obtener datos epidemiológicos sobre resistencia, objetivar el tratamiento antibiótico y detectar brotes en el laboratorio de microbiología (45)

La tipificación *genética* de los microorganismos ofrece información valiosa en la investigación de brotes en las fases de detección, contención y resolución. Esto permite que se cree una base del perfil fenotípico o genético, que contribuya a la detección de episodios no llamativos pero importantes (24).

Las técnicas *genéticas* tienen múltiples ventajas entre las que se encuentran el poder de tipificación mayor, mejor reproductibilidad y mayor discriminación, permitiendo establecer la relación genética entre los aislamientos de un brote, siendo útiles también en la confirmación de la fuente de infección o reservorio(24).

Existen técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción de cadena de la polimerasa (PCR), que se caracteriza por la ampliación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación. Dentro de esta técnica existen subtipos que se utilizan para estudios epidemiológicos de brotes infecciosos, una de estas y que se planteó en la realización de este estudio es la secuenciación consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC-PCR) utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias Gram negativas (46).

Se basa en el estudio de perfiles de restricción de ADN cromosómico, que consiste en la digestión de ADN con una enzima de restricción de baja frecuencia de corte, con la consecuente generación de fragmentos que se separan a través de electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP). Esta técnica permite la

separación de fragmentos de ADN de tamaño de hasta 1000kb y se considera el método de referencia de tipificación para las bacterias de interés epidemiológico(26). Los perfiles de ADN (pulsotipos) son interpretados a través de los criterios de Tenover.

En el proceso deben determinarse parámetros de reproductibilidad, que incluyen la normalización del gel, porcentaje de tolerancia en la posición de las bandas y puntos de corte en la definición de los *clusters*(27)(28).

Este método tiene algunos problemas, como el elevado costo económico, laboriosidad y tiempo necesario para analizar los resultados (una semana en el mejor de los casos), siendo poco práctico en la práctica clínica convencional, sin embargo, este método puede aplicarse a un gran espectro de bacterias, almacena perfiles y tiene un alto nivel de discriminación(25).

## **Importancia**

En las últimas décadas se ha presentado una diseminación mundial de la resistencia bacteriana, considerándose como una emergencia creciente y compleja, declarada como un problema de salud pública en 1998 por la Organización mundial de la Salud (47).

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) causadas por esta bacteria se ha agravado, observándose también como agentes en pacientes no hospitalizados(11) y consiguiendo estar implicada en infecciones muy graves. El pronóstico de la infección comparado con otros agentes es más reservado y esto es debido a que el manejo antibiótico puede no ser efectivo en muchas ocasiones, aun en pacientes tratados correctamente y en forma temprana(2).

La infección ocasionada por este microorganismo se presenta en pacientes institucionalizados, inmunocomprometidos, manejados con antibióticos de amplio espectro, portadores de materiales protésicos o instrumentados, pacientes con infección grave, hospitalización prolongada y la presencia de infecciones cruzadas. Es el patógeno de la infección respiratoria crónica en los pacientes con fibrosis quística (8). La elección terapéutica en las IAAS o infecciones adquiridas en la comunidad es un factor representativo de la evolución de los pacientes(29). Es un patógeno letal a la que se atribuye 35% de mortalidad en bacteriemia y 69% en neumonía asociada a ventilador (1). Esta mortalidad tan elevada representa el potencial para mejorar la terapéutica e intervenciones en pacientes con esta bacteria.

Se ha descrito que la mortalidad es mayor en pacientes con cepas resistentes a carbapenémicos comparados con las cepas sensibles, siendo menor en los primeros días de la enfermedad y en pacientes con comorbilidades(30).

En cuanto a morbilidad, las patologías nosocomiales son neumonía, bacteriemia, infección del sitio operatorio, osteomielitis (31), shock séptico (32) e infecciones de vías urinarias(9)(33).

El uso de antimicrobianos de amplio espectro ha causado la emergencia de cepas multirresistentes y aunque los mecanismos de resistencia y la identificación continua de los mismos ha sido importante, pocos agentes antibacterianos se han desarrollado, dejando un número de opciones terapéuticas limitadas en el manejo de los pacientes con este microorganismo(34).

Uno de los estudios realizados en Colombia, se encontró que las cepas multirresistentes se caracterizaron por estancias hospitalarias prolongadas y su estancia en cuidado de alta complejidad(35).

La epidemiología compleja de estas cepas resistentes necesita ser estudiada para el diseño de medidas de control de su expansión. El uso prudente de antibióticos, la implementación de medidas tan sencillas como el lavado de manos, la identificación y aislamiento de los pacientes colonizados/infectados, la detección y manejo de los brotes y limpieza de los ambientes hospitalarios y desinfección de los equipos médicos son vitales en el manejo de los pacientes susceptibles.

La Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI) es un hospital pediátrico que cuenta con 150 camas, distribuidas de la siguiente manera: 49 son del servicio de oncohematología, 12 de la unidad de quemados, 24 de unidad de cuidados intermedios, 15 de la unidad de cuidado intensivo pediátrico (UCIP) y 12 de la unidad de cuidado intensivo neonatal (UCIN) y el resto de pediatría general, lo cual hace que la institución sea un centro de referencia a nivel nacional y por lo tanto se debe atender pacientes de alta complejidad y con factores de riesgo para presentar infección por *P. aeruginosa*. El informe institucional para el año 2013, proporcionado por el Grupo Para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO), refiere una epidemiología de infección por *P. aeruginosa* para la UCIP del 7% de un total de 250 pacientes, para ocupar el 6° puesto entre otros gérmenes y para el área de no UCI también un 7% de un total de 804 pacientes, para ocupar el 5° puesto. Se informa de una resistencia antibiótica para Piperacilina tazobactam del 8.2%, Cefepime del 6.8%, Imipenem del 14.1% y Meropenem del 11.4% (48).

En el HOMI se realizó un estudio comprendido entre los años 2006 a 2013 sobre el perfil fenotípico de infección por *P. aeruginosa*, el cual informa una total de 483 aislamientos, de los cuales 155 presentaban algún mecanismo de resistencia (31.8%), dentro de estos los más frecuentes fueron desrepresión parcial de Amp C para un 9%, resistencia aislada a Piperacilina tazobactam en un 6% y Metallo- $\beta$ -

lactamasas en un 5%; dentro de las muestras más frecuentes, estas provenían de sangre en un 24.4%, orina 23.8% y secreción bronquial 16.6%; con respecto al grupo etario más frecuente fue en lactantes (0 a 2 años) en un 64.7% y preescolares (2 a 6 años) en un 14.4% (49).

## Materiales y Metodología

**Diseño del Estudio:** Descriptivo, observacional, de corte transversal.

### **Definición de sujetos de estudio:**

- **Población:** Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aislada en el laboratorio de bacteriología de la Fundación Hospital de la Misericordia, a partir de urocultivos, hemocultivos, cultivos de aspirados bronquiales y otros líquidos corporales considerados como e historias clínicas de los pacientes correspondientes, durante los años 2013-2014.
- **Muestra:** Se trabaja con todas las cepas obtenidas. Se analizan las historias correspondientes a los aislamientos. Dado que se trata de un estudio descriptivo, se obvia el cálculo de la muestra.
- **Unidad de análisis:** Reporte de antibiograma, colección de cepas del laboratorio de bacteriología, e historias clínicas de los pacientes correspondientes de la Fundación Hospital de la Misericordia.
- **Criterios de inclusión:** Pacientes hospitalizados en HOMI, con infección por *Pseudomonas aeruginosa* demostrada por cultivo de líquido o material corporal durante los años 2013-2014, utilizando la selección: solo el primer aislamiento por cada hospitalización del paciente, y se tendrán encuentra otros aislamientos del mismo paciente a menos que tengan un fenotipo de resistencia diferente al primero.
- **Criterio de exclusión:** Paciente con cultivo positivo pero que curse con contaminación o colonización según la evaluación de la historia clínica del paciente.

## Descripción de las intervenciones

La identificación de los patógenos se realiza según los procedimientos de microbiología estandarizados en la Fundación Hospital de la Misericordia, que inician con la obtención de la muestra en los diferentes servicios y su transporte al laboratorio de microbiología. Allí son procesados y analizados durante un periodo de 72 horas, tiempo después del cual se obtiene reportes de identificación y antibiograma de la cepa aislada.

Al identificar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se realiza la lectura interpretada del antibiograma. Estas cepas seleccionadas son llevadas a través de un proceso de embalaje adecuado, al laboratorio de microbiología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia para realizar la detección fenotípica y genotípica, enfocados en las cepas con aislamiento de BLEE y carbapenemasas y realizar la tipificación *genéticoe* de los aislamientos a través de ERIC-PCR con el fin de obtener el perfil de clones circulantes.

## Procedimientos

Este protocolo fue llevado a la Unidad de Investigación científica y Docente de la del departamento de Pediatría de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación Hospital de la Misericordia, para su evaluación y verificación de la seguridad de los procedimientos. Posterior al consentimiento por parte de las instituciones, se realizaron los siguientes pasos:

- 1. Identificación de Patógenos:** Se realizó en el laboratorio de bacteriología del Hospital la Misericordia a través del sistema automatizado VITEK 2, el investigador responsable principal se encargó de visitar al laboratorio diariamente para obtener el reporte de las cepas de *Pseudomonas*

*aeruginosa* aislada el día anterior, con el fin de recolectar los antibiogramas para los análisis respectivos, obteniéndose 39 aislamientos.

- 2. Deducción del Mecanismo de resistencia:** Con el antibiograma se realizó el análisis del fenotipo de la bacteria, con la identificación de los posibles mecanismos de resistencia; para el análisis de los perfiles de resistencia se utilizó el software Whonet 5.6® y para los criterios de interpretación se tuvo en cuenta las normas CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) 2012 (50)

Las pruebas de sensibilidad se evaluaron con 5 antibióticos: Piperacilina tazobactam (PTZ), cefepime (FEP), ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM) y Meropenem (MEM). Y la lectura interpretada del antibiograma se basó en el Artículo del Dr. Jordi Vila: Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores (51), realizando modificaciones en base al reporte del antibiograma de HOMI y que se muestran en las tabla 1 y 2 según su mecanismo de resistencia implicado:

**Tabla 1. Mecanismos de Resistencia Enzimáticos  
Fenotipos de Resistencia**

<b>PTZ</b>	<b>CAZ</b>	<b>CEF</b>	<b>IMP</b>	<b>MER</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>
S	S	S	S	S	Sensible
I	I	S/I	S	S	Desrepresión parcial de AmpC
R	R	I/R	S	S	Desrepresión total de AmpC
S	S	S/I	S	S	$\beta$ -lactamasa de clase A- No BLEE
S/I	R	R	S	S	$\beta$ -lactamasa de clase A- BLEE
S	R	R	I/R	I/R	GES-2
I/R	S	R	S	S	OXA-1, OXA-31
R	R	I/R	S	S	OXAs - BLEE
R	R	R	I/R	I/R	Metalo - $\beta$ -lactamasa

**Tabla 2. Deficiencia de Porinas y sistemas de Expulsión Activa  
Fenotipos de Resistencia**

<b>PTZ</b>	<b>CAZ</b>	<b>CEF</b>	<b>IMP</b>	<b>MER</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>
S	S	S	R	I	Perdida Porina OprD
I/R	I/R	I/R	S	I	Sistema mexAB-OprM
I/R	I/R	R	S	S	Sistema mexCD-OprJ
I/R	I/R	I/R	R	I	Sistema MexEF-OprN
I/R	I/R	I/R	S	S	Sistema MexXY-OprM

**3. Selección de cepas productoras de BLEE y Carbapenemasas:** Al identificarse las cepas sugestivas de producción de BLEE y Carbapenemasas como mecanismo de resistencia, en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Colombia se realizó la detección fenotípica de BLEE y Carbapenemasas utilizando el test modificado de Hodge y como cepa indicadora se utilizó la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 (-6) y la detección de MBL se realizó a través de la prueba de sinergismo usando como inhibidores EDTA-SMA (ácido etilendiaminotetraacetico – mercaptoacetato de sodio) (7).

**4. Detección de genes codificantes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas.**

La selección de aislamientos para analizar BLEE, se realizó de acuerdo a los rangos de sensibilidad para ceftazidima y cefepime establecidos por CLSI-2012, se seleccionaron 11 aislamientos con sensibilidad intermedia y/o resistentes a estos antimicrobianos para ser analizados por PCR multiplex para la detección de betalactamasas *blaSHV*, *blaCTX-M* y *blaTEM* usando iniciadores específicos (Monstein - 2007).

Para el análisis de carbapenemasas se tuvo en cuenta los rangos de sensibilidad para imipenem y meropenem, según las normas CLSI (CLSI-2012), se seleccionaron 10 aislamientos con sensibilidad intermedia y/o resistente a estos antimicrobianos, para evaluar la presencia de los genes *blaKPC*, *blaGES*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaOXA-48* (Monteiro -2012) y *blaNDM* (Bonnin - 2012) usando iniciadores específicos.

### 1. Caracterización genotípica

La caracterización genotípica, se realizó a los 39 aislamientos por ERIC-PCR usando el iniciador ERIC-2 (Versalovic - 1991), el ADN de los aislamientos se obtuvo por lisis a través de ebullición y 100ng/μL de ADN fue tomado para realizar la reacción, la cual se realizó bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 minutos 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72 °C por 4 minutos y un ciclo de 72°C por 10 minutos. Los amplímeros obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 μg/ml) en buffer TBE 0,5X. El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos se realizó el software Fingerprinting II (Bio-Rad), el coeficiente de DICE se usó para calcular las similitudes y el algoritmo UPGMA (unweight pair-group meted with arithmetic averages) para el análisis de agrupamiento, con una tolerancia de 1.0% y optimización de 1.0%. Los aislamientos con más de 90% de similitud fueron considerados del mismo genotipo (relacionados clonalmente).

Las fuentes de información son primarias, constituidas por los reportes de antibiogramas de la Fundación Hospital de la Misericordia y el reporte oficial de los resultados de biología *genéticoe* de la Universidad Nacional de Colombia.

## Instrumento de recolección de la información

El instrumento se diseñó según el orden de los objetivos específicos a cumplir.

Consta de 4 partes a saber:

1. Características de las muestras y los cultivos
2. Perfil fenotípico de resistencia según el antibiograma
3. Genes de producción de BLEE y Carbapenemasas.
4. Patrón clonal

## Plan de análisis

### Operacionalización de las Variables

Objetivo específico	N	Nombre de la variable	Descripción de la variable	Nivel de medición	Valores
Describir las características los cultivos de los pacientes con aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	1	Edad del Paciente	Edad en años del paciente a quien se tomó la muestra	Cuantitativa, discreta, razón.	1, 2, 3, 4 ...
	2	Sexo	Sexo del paciente a quien se tomó la muestra	Cualitativa, nominal	1: Masculino 2:Femenino
	3	Fecha de toma de la muestra	Fecha en la que se tomó la muestra	Cualitativa, nominal	D-M-A
	4	Tipo de muestra	Líquido o tejido cultivado	Cualitativa, nominal	1= Sangre, 2=Orina, 3=Secreción traqueal 4=Líquido peritoneal, 5=Lesión en Piel, 6=Otros.
	5	Servicio de aislamiento	Servicio al momento del aislamiento	Cualitativa, nominal	1=UCIP 2=UCIN 3=Oncohematología 4=U. de trasplante Hematopoyético 5=Hosp. Pediatría 6=Hosp. Cirugía 7=U. de Quemados 8=Urgencias 9=U.C. intermedios
	6	Estancia en días de actual hospitalización	Tiempo en días que permaneció el paciente hospitalizado	Cuantitativa, continua.	1, 2, 3, 4 ...
	7	El paciente	El paciente es	Cualitativa,	1=Si

		ingreso remitido	traído desde otra institución	nominal	2=No
	8	Duración de hospitalización en sitio de remisión (días)	Cuantos días duro el paciente hospitalizado en la institución de donde fue remitido	Cuantitativa, continua.	1, 2, 3, 4 ...
	9	Diagnóstico del sitio de remisión		Cualitativa, nominal	
	10	Recibió tratamiento A/B en el sitio de remisión	Recibió algún tipo de A/B el paciente, en el sitio de remisión	Cualitativa, nominal	0=Sin datos 1=Si 2=No
	11	Ultimo servicio de hospitalización de sitio de remisión	Servicio En que estaba el paciente antes de ser remitido	Cualitativa, nominal	0=Sin datos 1=UCI 2=No UCI
	12	Si hubo hospitalización en UCI, cual fue el tiempo de estancia en días de esta?	Tiempo en días de estancia en UCI de sitio de remisión	Cuantitativa, continua.	1, 2, 3, 4 ...
	13	11. Ingreso con algún dispositivo	Tenía algún dispositivo colocado en el sitio de remisión	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	14	Nº de hospitalizaciones en el último año	Cuantas hospitalizaciones tuvo en el último año	Cuantitativa continua	Días de estancia
	15	Días de estancia de todas las hospitalizaciones en el último año	Cuantos días en total ha permanecido hospitalizado el ultimo año	Cuantitativa continua	Días de estancia
	16	Ingreso a UCI en la actual hospitalización?	Requirió manejo en UCI en la actual hospitalización	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	17	Días de estancia en UCI en actual hospitalización	Cuantos días permaneció hospitalizado	Cuantitativa continua	Días de estancia
	18	Requirió colocación de dispositivos en actual hospitalización?	En algún momento de la hospitalización hubo la necesidad de utilizar dispositivos	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	19	Que dispositivos requirió	Que dispositivos se colocaron durante la estancia hospitalaria	Cualitativa, nominal	1=CVP 2=CVC 3=TOT 4=SNG 5=Sonda vesical 6=Línea arterial 7=Catéter peritoneal
	20	La infección por P. aeruginosa se relacionada con el dispositivo	La infección fue secundaria al dispositivo que se coloco	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	21	Nº de ingresos a UCI en el último	Cuantas veces ingreso a UCI en	Cuantitativa continua	1, 2, 3, 4 ...

	año	el último año			
	22	Días de estancia en UCI en el último año	Suma de estancia en días de todos los ingresos a UCI	Cuantitativa continua	Días de estancia
	23	Comorbilidad	Diagnóstico al ingreso registrado en la historia clínica de enfermedad crónica	Cualitativa, nominal	1=Respiratoria 2=Hematológica 3=Renal 4=Piel y anexos 5=Neurológico 6=Hepática 7=Intestinal
	24	Diagnostico topográfico, relacionado a infección por P aeruginosa	Sitio anatómico de infección por P aeruginosa	Cualitativa, nominal	1=Traqueítis bacteriana 2=Bacteriemia 3=Sepsis 4=IVU 5=Peritonitis 6=Infección en piel
	25	La infección fue considerada IAAS	La infección se presentó dentro o fuera del hospital	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	26	Se presentó bacteriemia	Se tomaron hemocultivos que fueron positivos	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	27	Tratamiento antibiótico inicial que recibió el paciente	Primer antibiótico recibido para infección por P aeruginosa	Cualitativa, nominal	1=Cefepime 2=Piperacilina tazobactam 3=Meropenem
	28	Resistencia al manejo inicial	El antibiótico utilizado en primea instancia no funciona	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	29	Días de antibiótico inicial recibido	Cantidad de días de antibiótico inicial recibido	Cuantitativa continua	1, 2, 3, 4 ...
	30	Forma en que se administró los antibióticos	Se administraron en bolos o en infusión continua o extendida	Cualitativa, nominal	1=Bolos 2=Infusión continua o extendida
	31	Condición al egreso del paciente	El paciente falleció o no	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	32	Si el paciente falleció, fue a causa de la infección por P. aeruginosa	La muerte fue a cauda de la infección	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	33	Antecedente de aislamiento previo de P. aeruginosa	Tiene antecedente de previa infección o colonización por P aeruginosa	Cualitativa, nominal	1=Si 2=No
	34	Días desde el momento del ingreso, al momento de la infección	Tiempo transcurrido desde el ingreso al momento del inicio de la infección por P.a.	Cuantitativa continua	Valor
Caracterizar el perfil epidemiológico fenotípico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> según el antibiograma analizado.	35	Mecanismo de resistencia	Deducción del mecanismo de resistencia según antibiograma	Cualitativa, nominal	1= Sensible 2= Desrepresión parcial de AmpC 3= Desrepresión total AmpC 4= $\beta$ -lactamasa de clase A-No BLEE 5= $\beta$ -lactamasa de clase A-BLEE

					6= GES-2 7= OXA-1, OXA31 8= OXA <sub>x</sub> -BLEE 9= Metalo-β-lactamas 10= Pérdida OprD 11= MexAB-OprM, 12= MexCD-OprJ 13= MexEF-OprN 14= MexXY-OprM 15= Resistencia a PIP/TAZO
Identificar el patrón clonal de <i>Pseudomonas</i> a través de la técnica de ERIC-PCR y establecer el mapa epidemiológico de la institución					
Conocer los genes de producción de BLEE y carbapenemasas en <i>P. aeruginosa</i> con patrones de resistencia sugestivos.					

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis descriptivo. Para las variables cualitativas dicotómicas o politómicas, se prefiere la presentación de los datos en forma de tablas, en las que se especifican la frecuencia absoluta y relativa; sin embargo, si estos son muy relevantes se grafican en barras o sectores para su mejor visualización.

Las variables cuantitativas, de razón e intervalo, se analizan mediante la medición de la frecuencia absoluta, relativa y frecuencias acumuladas, que son graficadas mediante histogramas. Se calculan las medidas de tendencia central y medidas de dispersión, y los valores respectivos de cada variable y se expresan mediante tablas.

### **Consideraciones éticas**

El estudio realizado es de tipo observacional. Se ajusta a los principios bioéticos de autonomía, no maleficencia y justicia, que se adapta a los principios de la declaración de Helsinki y no contradice lo estipulado en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, en el que se estipulan y reglamentan las “buenas prácticas en la investigación en salud”.

Según esta resolución este estudio se clasifica como “Investigación sin riesgo” puesto que “Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique, ni se traten aspectos sensitivos de su conducta”(37).

El protocolo del presente estudio fue llevado a la Unidad de Investigación científica y Docente del departamento de Pediatría de la Universidad Nacional de Colombia y al comité de ética de la Fundación Hospital de la Misericordia, donde se realizó su evaluación y verificación de la seguridad de los procedimientos, con posterior consentimiento por parte de las instituciones respectivas.

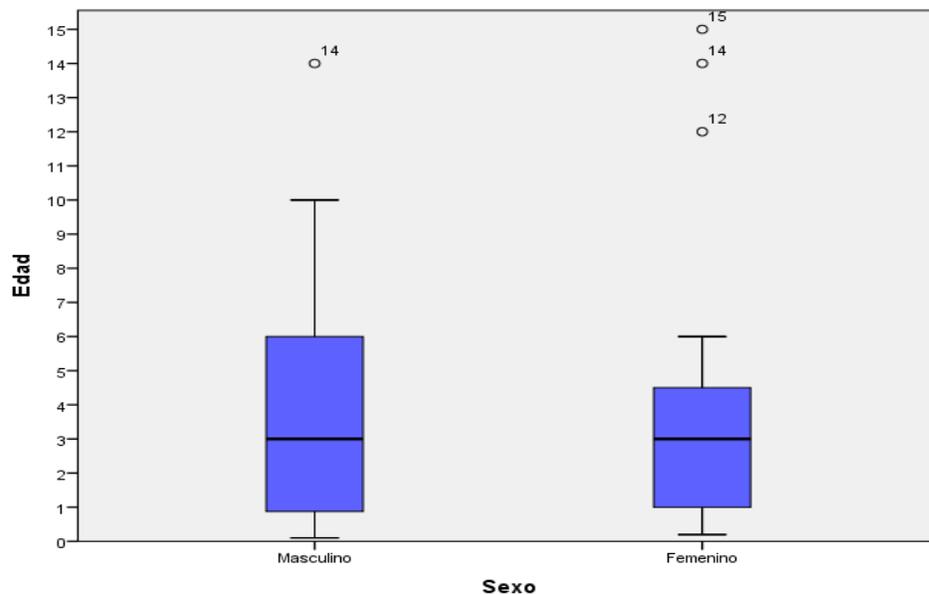
## Resultados

La muestra fue constituida por 39 cepas de *P. aeruginosa* que fueron incluidos luego de verificar el cumplimiento de los criterios especificados para el estudio. Y los resultados se expondrán según el orden de los objetivos específicos a cumplir.

### 1. Características demográficas, clínicas y paraclínicas de los pacientes con cultivo positivo para *Pseudomonas aeruginosa*

En el grafico 1 se evidencia que la edad promedio de los hombres fue de 3,98 años, estando la mitad de los pacientes por debajo de 3 años y el 50% de los niños ubicandose entre  $\approx$ 1 a 6 años, con un maximo de 14 años. Para las niñas la edad promedio fue de 4,2 años con la mitad de las niñoa con una edad por debajo de 3 años y el 50% se ubico entre 1 a 5 años con un valor maximo de 15 años.

**Grafico 1. Edad de acuerdo al sexo en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



En la tabla 3. Se evidencian los estadísticos de tendencia y central para las distintas variables cuantitativas, respecto a la distribución se encuentra que todas las variables tienen una distribución anormal cuando se aplica la prueba de *shapiro-wilk* y se evidencian diferencias importantes entre la media y mediana, evidenciándose heterogeneidad entre los datos y rangos amplios. Respecto a la estancia en el lugar de remisión se encuentra que la duración entre los días generales en el sitio de remisión y en la UCI del lugar de remisión son muy similares con valores prácticamente similares para el 50% de los pacientes al igual que los rangos con diferencias menores a 2 días en los valores de media y mediana. Pero este comportamiento no se repite para la duración del antibiótico en el sitio de remisión siendo mucho menor el número de días de aplicación llegando máximo a 5 días frente a los 49 días de estancia.

La duración de hospitalización actual presenta valores extremos con una gran variación no solo del rango general sino también entre el percentil 25 y 75 presentando una diferencia de 62 días presentando diferencias importantes con las tendencias de la estancia en UCI donde el 50% de los pacientes tuvo una estancia entre 9 a 35 días con una diferencia de 26 días y un valor máximo de 99 días frente a los 185 de estancia general, en comparación con estos 2 la duración del antibiótico tiene una duración mucho menor siendo la tercera parte de la estancia en hospitalización y cerca de la mitad del tiempo de estancia en UCI.

El número de hospitalizaciones en el último año para el 50% de los pacientes es de máximo 1 al igual que el ingreso a UCI en el mismo periodo de tiempo, pero los valores extremos son mayores para la hospitalización que puede llegar a ser 8/año frente a 3 ingreso a UCI en el año, esto guarda relación

directa con que el total de días de estancia en hospitalización del último año sea mayor que la estancia en UCI.

**Tabla 3. Estadígrafos de Resumen de la estancia, numero de hospitalizaciones; número y días de Antibiótico en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**

Variable	x	s	Mediana	Rango Intercuartil	Rango	Min.	Max.
Estancia en días (Hospitalización actual)	67	54	56	22 84	184	1	185
No. de días en sitio de remisión	10	14	3	0 19	49	0	49
Días de A/B en sitio de remisión	2	1	1	1 2	4	1	5
Días en UCI del lugar de remisión	11	18	1	1 20	48	1	49
No de Hospitalizaciones en el último año	2	2	1	0 1	8	0	8
Días de hospitalización previos (total)	53	59	34	21 59	245	7	252
Días de UCI en esta hospitalización	24	24	12	9 35	98	1	99
No de ingresos a UCI en el último año	1	1	1	0 1	3	0	3
Días de UCI previos (total)	23	23	12	8 31	72	0	72
Días del A/B Inicial	13	14	10	5 14	61	1	62
Días desde el ingreso al Dx. de infección	20	27	14	1 27	131	0	131

La tabla 4. Muestra los diagnósticos de remisión y de ingreso de los pacientes. En cuanto a los diagnósticos al ingreso 16 pacientes no lo presentan, pero estos

corresponden a los que no fueron remitidos. En cuanto a los pacientes con diagnóstico el más común corresponde a Displasia broncopulmonar y/o neumopatía crónica con una proporción del 26,1% (6/23), seguido por aplasia medular con el 13,04%, colitis neutropénica y quemaduras tienen una proporción de 7,7% respectivamente y los demás diagnósticos se presentaron solo en 1 ocasión (4,35%). Llama la atención que el diagnóstico más común al momento del ingreso es de LLA y leucemias en general (23,1%) sin estar este referenciado en los de remisión, aunque guarda relación con diagnósticos como aplasia medular, dengue y colitis neutropénica, el diagnóstico que sigue en proporción es DBP o neumopatía crónica con una proporción similar a los de remisión y aparecen nuevos diagnósticos como IMOC, fibrosis quística, trasplante de médula ósea e IVU, otros como atresia de coanas y enterocolitis necrosante no sufren cambios en la proporción.

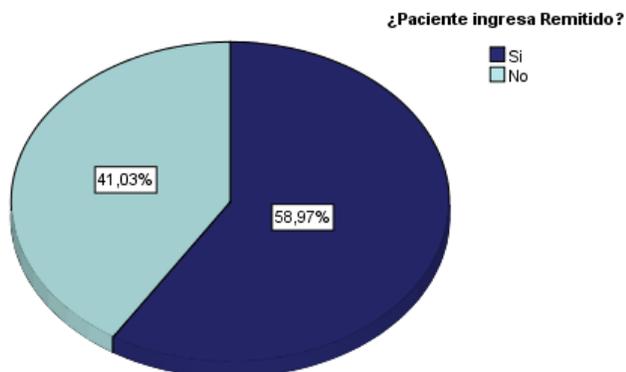
**Tabla 4. Frecuencias de los diagnósticos de los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**

Variable	Categoría	n	%
Dx. de Sitio de Remisión	DBP - Neumopatía Crónica	6	15,4
	Aplasia Medular	3	7,7
	Colitis Neutropénica	2	5,1
	Quemadura	2	5,1
	Atresia de Coanas	1	2,6
	Dengue	1	2,6
	Dolor abdominal	1	2,6
	ECN	1	2,6
	Lesión Renal Aguda	1	2,6
	Meningitis - Hidrocefalia	1	2,6
	Neoplasia Ósea - Sd. Lisis Tumoral	1	2,6
	Sarcoma de Ewing	1	2,6
	SHU	1	2,6
	Tumor Hepático	1	2,6
	Total	23	59,0
	Sin Datos	16	41,0
	<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>
Dx. Principal	LLA	8	20,5
	DBP - Neumopatía Crónica	6	15,4

de Ingreso	IMOC - Enf. Neurodegenerativa	4	10,3
	Quemadura	3	7,7
	Anemia aplasica adquirida	2	5,1
	Enfermedad Renal Crónica (Terminal/agudizada)	2	5,1
	Hidrocefalia - Tumor del SNC	2	5,1
	SHU	2	5,1
	Atresia de Coanas	1	2,6
	ECN	1	2,6
	Fibrosis Quística	1	2,6
	Hepatoblastoma	1	2,6
	Hidronefrosis Bilateral	1	2,6
	IVU complicada	1	2,6
	LMA	1	2,6
	TMO - Sd Hemofagocítico	1	2,6
	Osteosarcomatosis	1	2,6
	Infección del SNC	1	2,6
	<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>

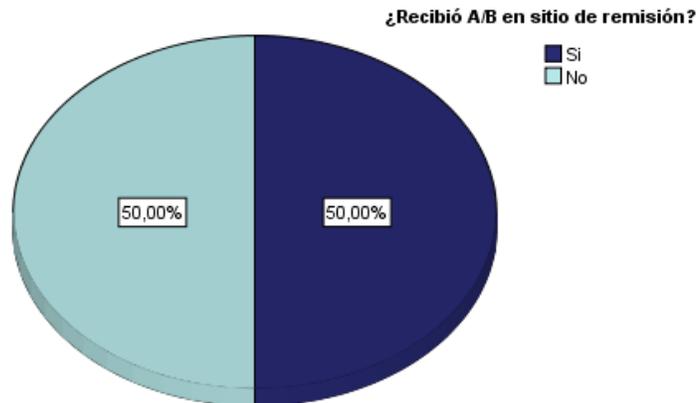
Mas de la mitad de los pacientes con una proporción cercana al 60% de los pacientes proceden de otros hospitales.

**Grafico 2. Procedencia de los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



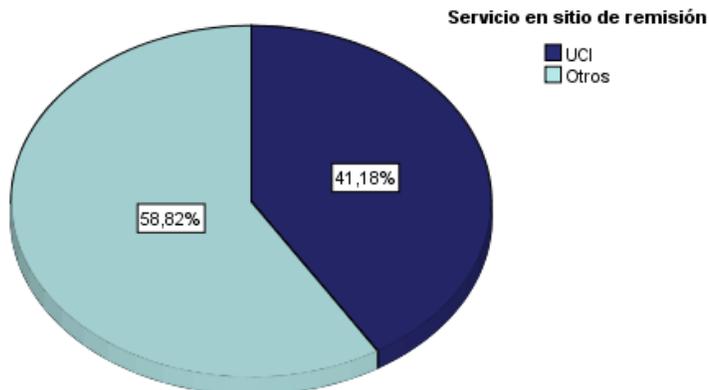
Respecto a los pacientes que vienen remitidos (23) 7 de ellos no cuentan con datos y a los restantes 16 se les administro o no antibiótico en igual proporción (50%).

**Grafico 3. Distribución del tratamiento previo de los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



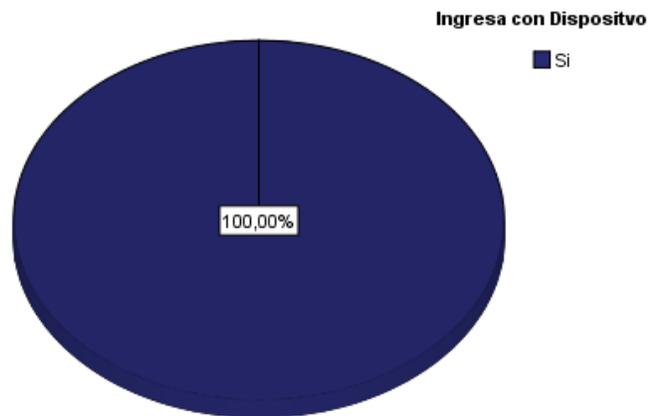
La mayoría de pacientes remitidos (14/23) provienen de sitios de hospitalización diferentes a la UCI, siendo importante la proporción de pacientes que provienen de UCI que es de  $\approx 42\%$  (9/23) pacientes

**Grafico 4. Distribución de lugar de hospitalización previo de los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



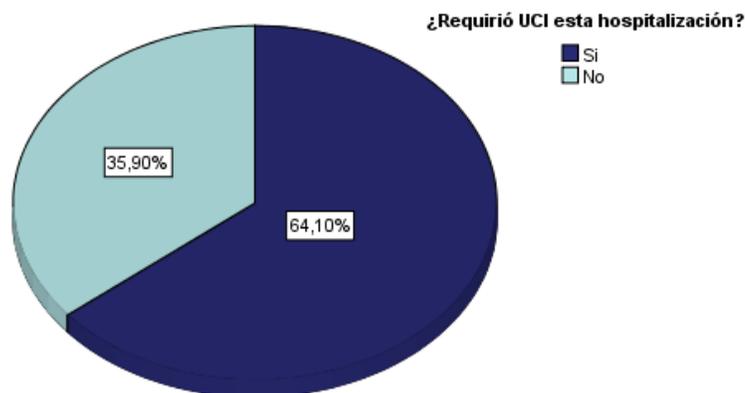
Todos los pacientes remitidos (23) ingresaron con algún tipo de dispositivo de su lugar de remisión.

**Grafico 5. Distribución de los dispositivos previos ee los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



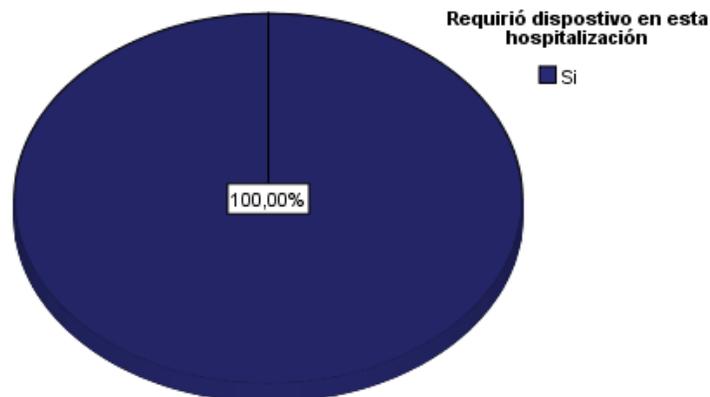
Del total de pacientes que ingresaron a la hospitalización en la Fundación HOMI (39) más del 60% de los pacientes no requirieron ingreso a UCI. 14 pacientes requirieron traslado a UCI con una relación de 1,7 pacientes sin UCI por cada paciente que requirió el traslado.

**Grafico 6. Distribución de la necesidad de UCI en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



Todos los 39 pacientes requirieron algún tipo de dispositivo invasivo durante la hospitalización independiente de su ubicación en el hospital.

**Grafico 7. Distribución de la necesidad de dispositivos invasivos en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



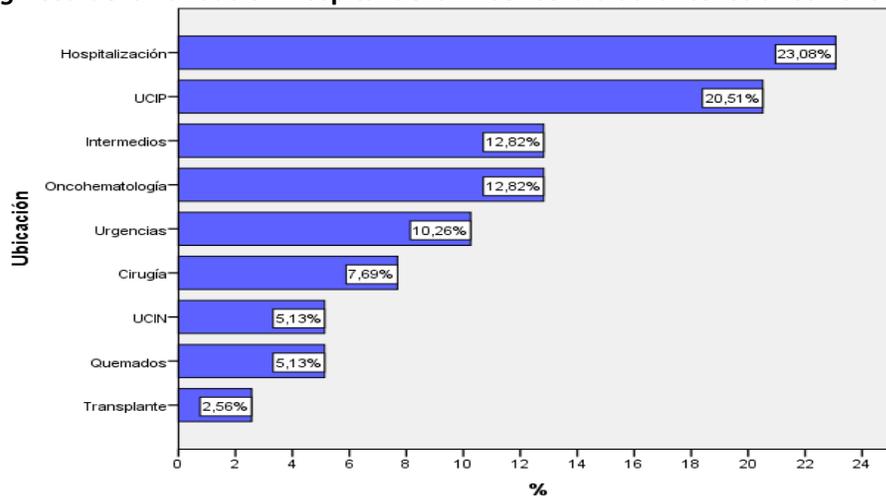
La tabla 5 muestra la frecuencia de uso de los diferentes dispositivos, el de uso más común es el catéter venoso central con una proporción mayor al 70% siendo esta proporción mucho mayor a la de los pacientes que ingresaron a UCI, seguido por el uso de sonda vesical y CVP con proporciones cercanas al 50%. Llama la atención que 2 pacientes más de los que ingresaron a UCI requirieron intubación orotraqueal (16/14). Solo la sonda nasogástrica, línea arterial y catéter peritoneal presentaron una proporción de uso menor del ingreso a UCI.

**Tabla 5. Frecuencias de los dispositivos utilizados en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**

Dispositivo Empleado		
Categoría	n	%
CVC	28	71,8%
Sonda Vesical	19	48,7%
CVP	17	43,6%
TOT	16	41,0%
SNG	11	28,2%
Línea Arterial	11	28,2%
Catéter Peritoneal	4	10,3%
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100,0%</b>

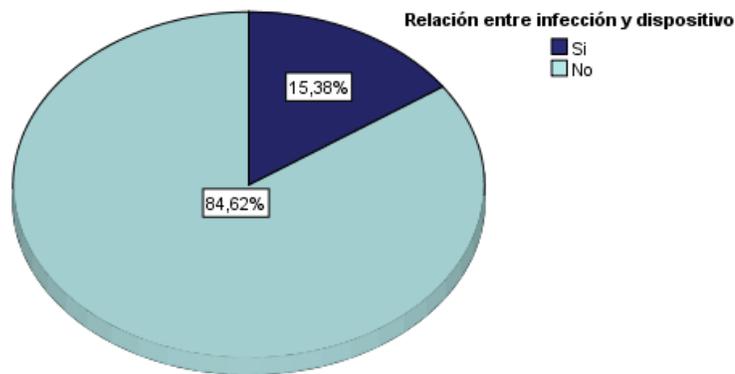
La mayoría de pacientes se encontraba hospitalizados en el piso al momento del asilamiento de la infección por *P. aeruginosa*, proporción que cambia cuando se combinan los servicios, siendo 17/39 pacientes para las unidades de cuidado intensivo (UCIP, UCIN, intermedios y quemados) frente a los 16/39 pacientes de servicios generales (hospitalización, urgencias y pediatría) y los 6 de los servicios especiales como oncohematología y unidad de trasplante de células hematopoyéticas.

**Grafico 8. Ubicación al momento del asilamiento de los pacientes con infección por *P. aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



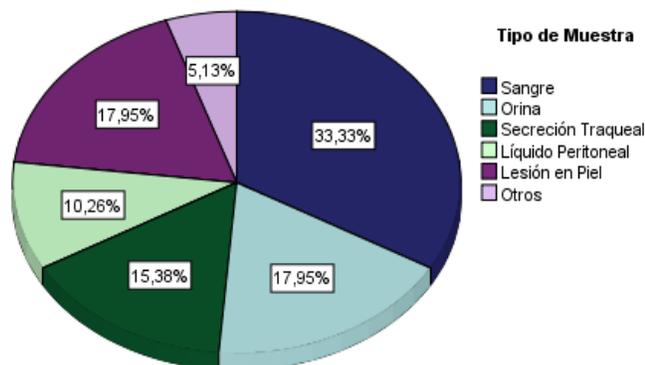
Respecto a la relación entre los dispositivos utilizados y la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, se evidencia una baja proporción menor al 20% de los casos de infección, y se estableció una relación directa entre el dispositivo y la infección en 6 de los 39 pacientes.

**Grafico 9. Relación entre la infección y el dispositivo de los pacientes con infección por *P. aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



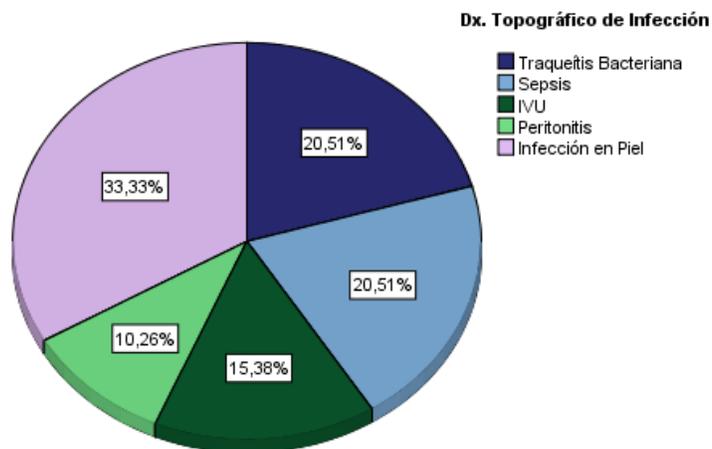
Las muestras comúnmente obtenidas son los hemocultivos que se extrajeron a 13/39 pacientes, lo que guarda relación con un diagnóstico topográfico de sepsis en 8 de 39 pacientes, de igual manera sucede con los tipos de muestra extraídos que son mayores al diagnóstico topográfico a excepción de las muestras de piel que son menores que el diagnóstico de infección en piel.

**Grafico 10. Distribución de las muestras obtenidas en los pacientes con infección por *P. aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



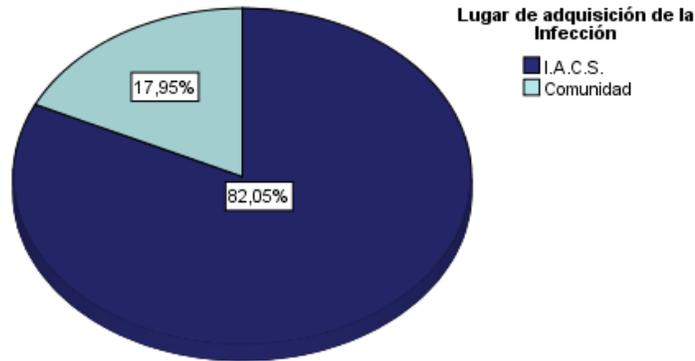
La ubicación más común para la infección por *P. aeruginosa* es la piel de los pacientes presentada en 13 de los 39, seguido por traqueítis bacteriana en 8 pacientes con 16 que requirieron tubo orotraqueal y sepsis igualmente en 8 pacientes. La IVU se dio para 6 pacientes con 11 que requirieron sonda vesical.

**Grafico 11. Distribución del diagnostico topografico de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* los pacientes de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



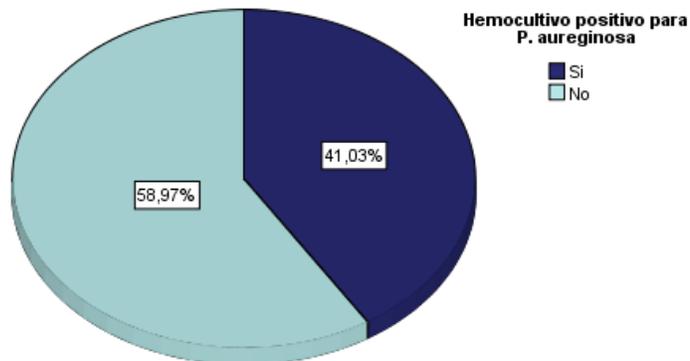
Se considero que mas del 82% de las infecciones por *Pseudomonas aureginosa* eran de origen hospitalario y se clasificaron como asociadas al cuidado de la salud, frente a 7 pacientes que se consideraron que la infección fue adquirida en la comunidad, dato que llama la atención respecto a los pacientes donde se considero la relación entre la infección y el dispositivo que fue solo en 6/39 pacientes.

**Grafico 12. Distribución del lugar de adquisición de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en los pacientes de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



El aislamiento para *P. aeruginosa* en hemocultivo se dio en 16 de los 39 pacientes ( $\approx 41\%$  de los casos) con una razón de 2,4 pacientes sin bacteriemia frente a cada paciente que la presentó. Frente a esta proporción se debe analizar que de 16 con bacteriemia, 4 se clasificaron como sepsis.

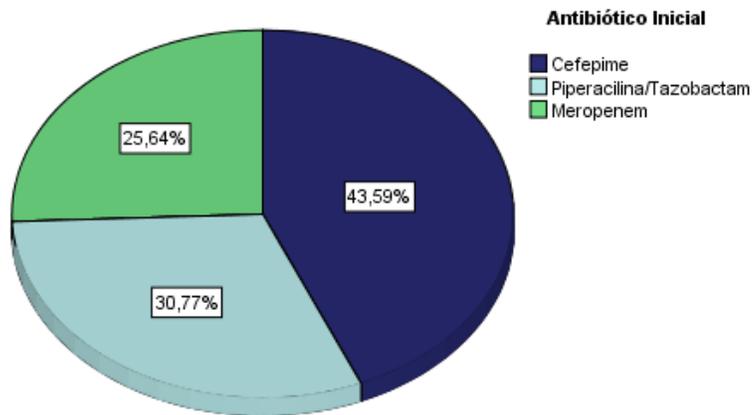
**Grafico 13. Distribución de la bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* en los pacientes de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



El antibiotico mas usado como terapia inicial es el cefepime, pero la proporción de uso es menor al 50%, (17/39 pacientes) seguido en uso por piperacilina tazobactam (12) y meropenem (10) con una relación de 1,4 pacientes con

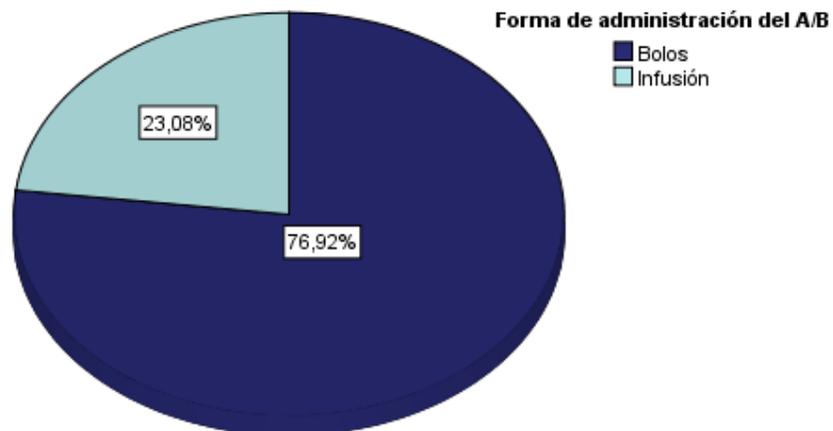
cefepime por cada paciente con piperacilina tazobactam y 1,7 pacientes con cefepime por cada paciente con meropenem.

**Grafico 14. Tratamiento inicial en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



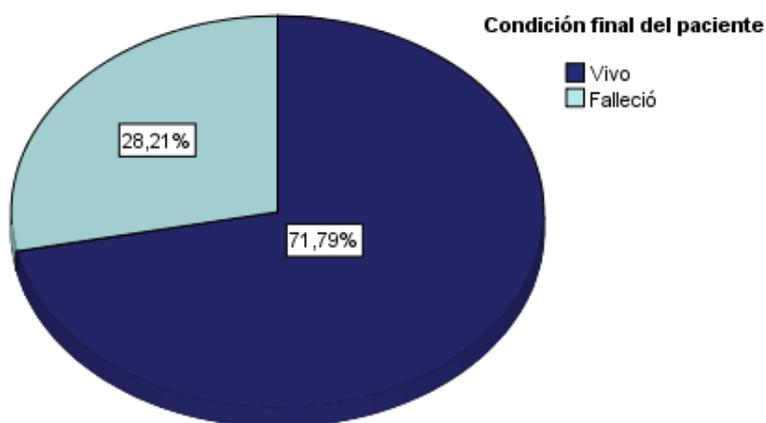
La forma más común de administrar los antibióticos es a través de bolos del medicamento lo que sucede en  $\approx 77\%$  de los casos (30 pacientes), solo 9 pacientes lo recibieron en infusión frente a los 14 que ingresaron a la UCI.

**Grafico 15. Administración de los Antibióticos en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



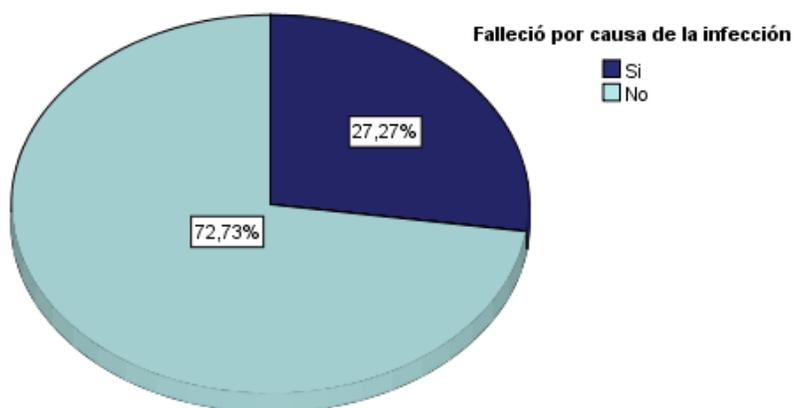
La mayoría de pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa*, sobrevivieron durante la hospitalización, 11 pacientes fallecieron siendo la letalidad del 28,21% y la razón de mortalidad de 2,5 pacientes que sobreviven por cada paciente que fallece.

**Grafico 16. Supervivencia de los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



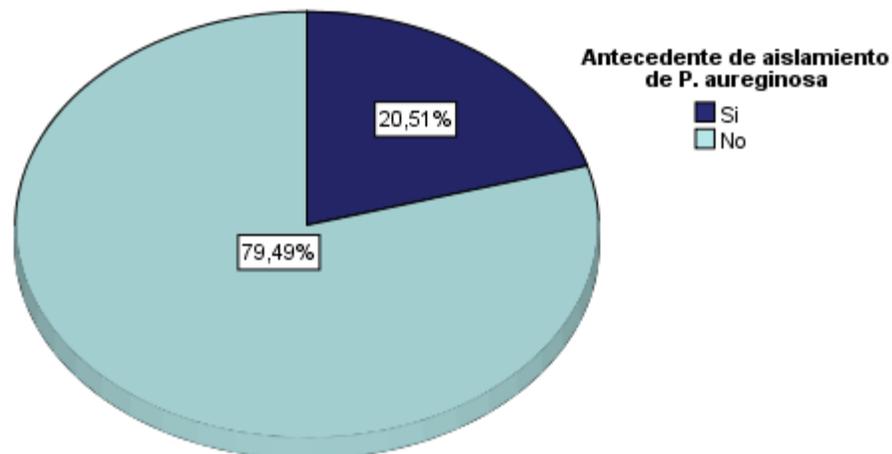
De los 11 pacientes que fallecieron, solo a 3 se les consideró que existió una relación directa entre la infección por *P. aeruginosa* y la causa de muerte.

**Grafico 18. Relación entre infección y muerte en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



El antecedente de infección por *Pseudomonas aeruginosa*, se presentó en 8 de los 39 pacientes, dato que se debe evaluar frente a los 7 pacientes que se consideraron con una infección adquirida en la comunidad.

**Grafico 19. Antecedente de infección por *P. aeruginosa* en los pacientes con nuevo aislamiento de *P. aeruginosa* en la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**



## **2. Perfil de sensibilidad fenotípico de *Pseudomonas aeruginosa* según el antibiograma analizado.**

En la tabla 6 se evidencia que en la mayoría de infecciones (más del 60%) la *Pseudomonas aeruginosa* se presentó un patrón de sensibilidad usual lo que guarda relación con la tasa de falla terapéutica que fue del 35,9%. Respecto a los fenotipos de resistencia la resistencia extendida a carbapenémicos (OprD, GES-2 y Metallo- $\beta$ -Lactamasa) tiene una mayor proporción (23,1%) seguidos por la expresión de *Amp-C* (parcial o total) que es del 7,7% y finalmente la expresión de betalactamasa de espectro extendido y resistencia aislada a piperacilina tazobactam que se presentaron en 1 caso respectivamente.

**Tabla 6. Distribución de frecuencias de los fenotipos de resistencia en los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa* de la Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014.**

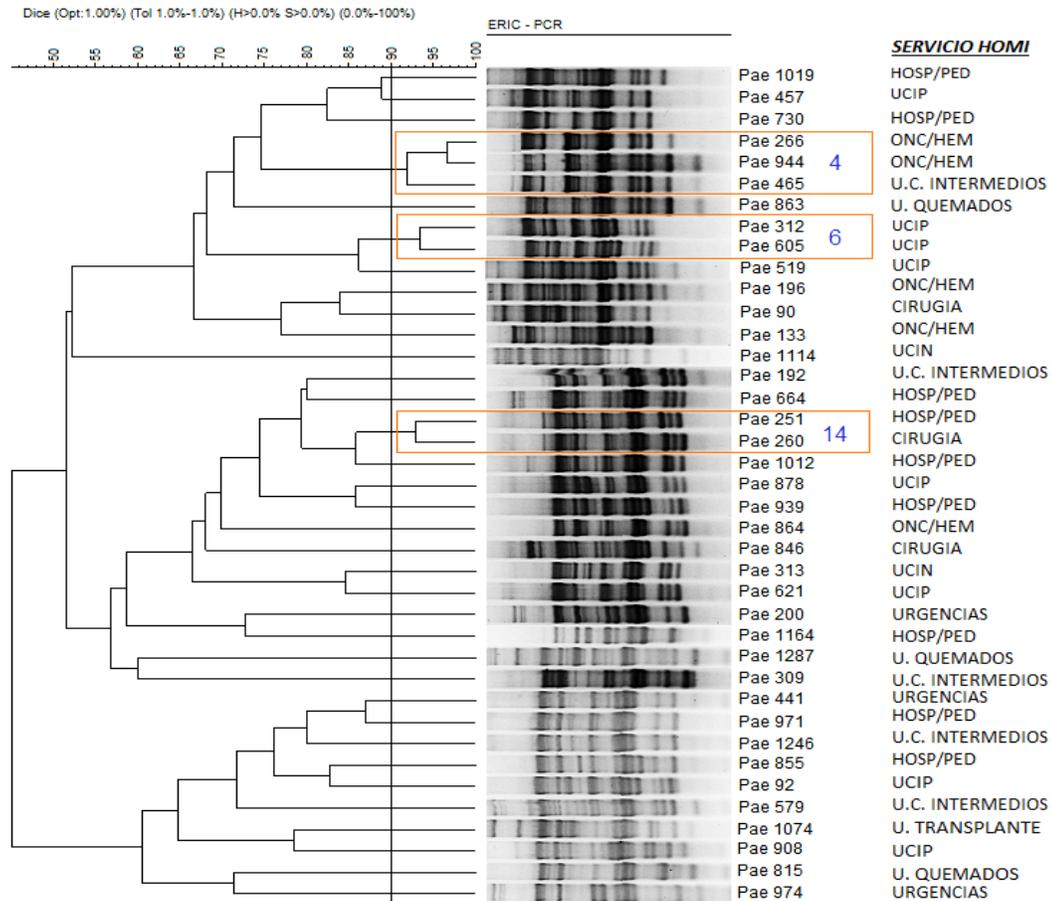
Fenotipo de Resistencia		
Categoría	n	%
Ninguno	25	64,1
GES-2	3	7,7
Metallo- $\beta$ -Lactamasa	3	7,7
OprD	3	7,7
Desrepresión parcial <i>Amp-C</i>	2	5,1
Desrepresión total <i>Amp-C</i>	1	2,6
$\beta$ -Lactamasa de Clase A - BLEE	1	2,6
Resistencia a Piperacilina Tazobactam	1	2,6
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>

### 3. Patrón clonal de *Pseudomonas aeruginosa* y mapa epidemiológico de la institución

#### 3.1 Caracterización genotípica

En el análisis de las relaciones genéticas se estableció la presencia de 35 patrones electroforéticos, 32 perfiles únicos y tres grupos genómicos (figura 1), que corresponden a los patrones: 4 (aislamientos 266, 465 y 944), 6 (aislamientos 312 y 605) y 14 (aislamientos 251 y 260). Estos resultados sugieren una amplia variedad genética en los aislamientos evaluados.

**Figura 1. Dendrograma aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa***

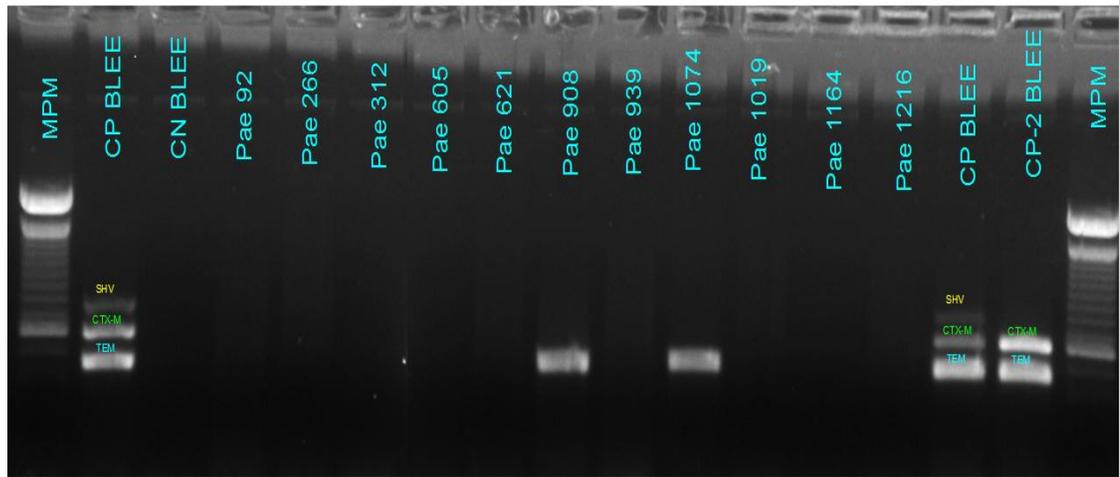


#### 4. Detección de genes codificantes de BLEE y carbapenemasas implicadas en la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Los 11 aislamientos seleccionados para detección de betalactamasas BLEE fueron los aislamientos: 92, 266, 312, 605, 621, 908, 939, 1019, 1074, 1164, 1246. Los aislamientos 908 y 1074, fueron positivos para la betalactamasa TEM, sin embargo se debe secuenciar para establecer si es una variante tipo BLEE o una betalactamasa de amplio espectro, estos dos aislamientos fueron negativos para

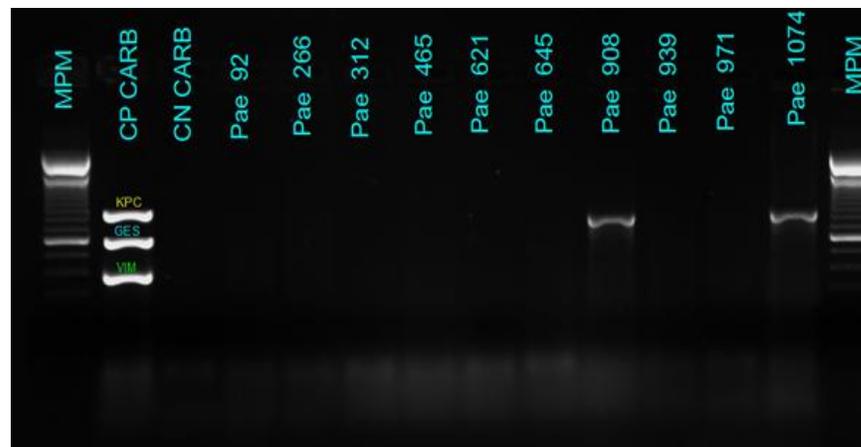
betalactamasas CTX-M y SHV. Los nueve aislamientos restantes fueron negativos para todos los genes evaluados, figura 2.

**Figura 2.**



Para la evaluación de carbapenemasas se analizaron los 9 siguientes aislamientos: 92, 266, 465, 605, 621, 908, 939, 971 y 1074. Los aislamientos 908 y 1074, fueron positivos para la carbapenemasa KPC y negativos para las otras carbapenemasas, evaluadas. Los 7 aislamientos restantes fueron negativos para todas las carbapenemasas evaluadas, figura 3.

**Figura 3.**



## CONCLUSIONES

El mayor número de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* se presenta en el grupo etario menor de tres años, con una relación para hombres y mujeres en similar proporción.

Los diagnosticos mas frecuentes que se documentan estan en relacion con pacientes oncohematologicos, dentro de estos los paciente con presencia de algun tipo de leucemia, seguidos de anemias con evolucion cronica. Otro diagnositco frecuente es el relacionado con el sistema respitarorios, dentro de este la displasia broncopulmonar.

Un dato importante para infeccion por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente, es que la mayoría son pacientes remitidos de otras instituciones, desafortunadamente los datos obtenidos de estos sitios de remision son escasos, obteniendolos en un poco menos de la mitad de estos y en forma incompleta, por consiguiente no se cuenta con informacion completa de manejo antibiotico previo recibido y servicios de manejo. También se observa una frecuencia mayor de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes en los pacientes que han tenido ingreso previo a UCIP, documentandose un promedio de un ingreso en el ultimo año y algunos paciente hasta con un ingreso de 8 episodios.

Se encontro que el total de los paciente requirieron algun tipo de dispositivo invasivo, dentro de los mas frecuentes esta el cateter venoso central y la sonda vesical. Aunque en este estudio solo se documenta un 15% de relacion de infeccion con el dispositivo; la colocacion de los mismos aumenta el riesgo de infeccion asociada al cuidado de la salud, lo que se relaciona con los datos obtenidos, donde se informan que la infeccion por *Pseudomonas aeruginosa* se adquiere hasta en un 82% intrahospitalariamente.

Aproximadamente en dos terceras partes de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran cepas multisensibles y dentro de los perfiles de resistencia los de más alto porcentaje son la presencia de Metallo- $\beta$ -Lactamasas, perdida de porina OprD y GES-2 para un 23.1% en total, seguido por la presencia de expresión de AmpC con un 7.7% y finalmente la expresión de BLEE y resistencia aislada a piperacilina tazobactam en igual proporción; resultados que son similares al estudio realizado previamente en el hospital sobre perfil fenotípico de resistencia en donde se encuentran porcentajes similares.

En mención a la resistencia de los antibióticos utilizados para infección por *Pseudomonas aeruginosa* en HOMI, en este estudio se encuentra un porcentaje para piperacilina tazobactam de 20.5%, meropenem e imipenem de 17.9% en forma individual y 23.1% en conjunto y cefepime en un 12.8%. La resistencia a estos antibióticos es mayor que la que se reportó en el Hospital en el año 2013 que fue para Piperacilina tazobactam del 8.2%, Cefepime del 6.8%, Imipenem del 14.1% y Meropenem del 11.4% y mayor que en los datos encontrados en el estudio previo con un porcentaje de resistencia para Piperacilina tazobactam del 14.3%, Cefepime del 1.7%, Imipenem del 11.6% y Meropenem del 8.4%, lo que sugiere un aumento de la resistencia a estos antibióticos, que puede deberse al aumento de los pacientes remitidos con *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, de acuerdo a los datos del comité de infecciones el consumo de estos antimicrobianos ha permanecido estable.

También puede deberse a que en el presente estudio se excluyeron las colonizaciones, las cuales son incluidas en los informes institucionales.

Según informe del estudio el antibiótico más utilizado para el manejo empírico de pacientes con sospecha de infección por *Pseudomonas aeruginosa* es cefepime, que es concordante con las guías institucionales, por lo que se concluye que hay una buena adherencia a las guías.

Respecto a la expresión de resistencia a carbapenémicos, se aislaron 9 cepas, de las cuales 2 tenían un fenotipo de cierre de porinas y 7 de producción enzimática; de las que tenían fenotipo enzimático, 4 fueron Metallo- $\beta$ -Lactamasas; dentro de estas últimas 4 cepas, por medio de métodos moleculares se encontró la presencia de 2 cepas KPC y en las 2 cepas con fenotipo de cierre de porinas se descartó la presencia de otros tipos de resistencia a carbapenémicos, esto es relevante clínicamente ya que cuando se observa un fenotipo sugestivo en el antibiograma de resistencia a carbapenémicos por cierre de porinas se puede utilizar otros antibióticos como piperacilina tazobactam o cefepime.

En la UCIP se encuentra que el perfil fenotípico inferido de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* más frecuente es la presencia de carbapenemasas, dentro de estas la expresión de Metallo- $\beta$ -lactamasas, sin embargo en el perfil genético no se reporta presencia de carbapenemasas, lo que no descartaría que la resistencia presentada sea secundaria a pérdida de porinas, lo que tendría un impacto en la terapia empírica.

La infección por *Pseudomonas aeruginosa* es de característica policlonal, donde observamos 3 clonas diferentes circulando en el hospital, una en el servicio de oncohematología y unidad de cuidados intermedios, otra clona en UCIP y otra en

hospitalización de pediatría y cirugía. Las clonas mantienen la relación que tienen los servicios en el manejo de los pacientes.

Un brote epidémico se caracteriza por un elevado número de pacientes infectados con una misma cepa, adquirida en un lugar común o transferido por infección cruzada. El análisis visual de los geles de la Figura 1 no evidenció un patrón clonal mayoritario, por el contrario, se observó una elevada heterogeneidad en los perfiles, lo que sugiere una amplia variedad genética en los aislamientos evaluados, es decir, no se trató de un brote epidémico.

Al no encontrar una relación clonal en la mayoría de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* explica la efectividad de las medidas aplicadas para disminuir las infecciones cruzadas entre los pacientes, puesto que el número de casos de pacientes infectados con aislamientos genéticamente similares es muy bajo. En 2 de los 3 aislamientos en los que se hallaron genotipos similares correspondieron a un mismo paciente y solo una clona correspondía a pacientes diferentes, sugiriendo que han sido adquiridos a partir de una fuente común de contaminación o por infección cruzada, con perfil fenotípico idéntico. De acuerdo a esto se puede concluir que las medidas instauradas en la institución para el control de la transmisión cruzada de agentes han sido efectivas.

Las cepas 944, 266 y 465 corresponden a un mismo paciente, las 2 primeras tomas el mismo día, pero la primera muestra fue de sangre y la segunda de lesión en piel (Úlcera), encontrándose un perfil fenotípico de resistencia diferente: resistencia aislada a piperacilina tazobactam y presencia de metalo- $\beta$ -lactamasa respectivamente; al estar relacionadas clonalmente pero con diferente patrón de resistencia, sugiere que el paciente previo a la infección pudo estar colonizado con

1 cepa, pero en un momento dado tomaron un mecanismo de resistencia diferente en sitios diferentes. La tercera cepa fue tomada a los 4 días de la lesión en piel, encontrándose un mecanismo de resistencia sugestivo de pérdida de porina OprD. El estudio molecular de estas 3 cepas, fueron negativos tanto para presencia de BLEE y carbapenemasas, lo cual estaría en relación con la pérdida de porina OprD. Este caso de este paciente nos muestra la importancia de farmacoresistencia que presenta la *Pseudomonas aeruginosa*, documentándose estos 3 mecanismos de resistencia.

Las cepas 312 y 605 también corresponde a un mismo paciente, ambas muestras fueron de sangre y tomadas el mismo día, encontrándose un perfil fenotípico de resistencia diferente; en el análisis molecular ambas cepas fueron evaluadas para la presencia de BLEE y la segunda para carbapenemasas, dando resultados negativos; lo cual sugiere que se puede haber presentado un fenómeno de hiperproducción de AmpC, explicando fenotípicamente la presencia de BLEE y genotípicamente dando un resultado negativo.

Las cepas 908 y 1074, pertenecientes a una misma clona, pero a pacientes diferentes, presentaron un mismo perfil fenotípico y genotípico de resistencia, con expresión sugestiva de Metallo- $\beta$ -lactamasas y presencia de KPC respectivamente, como se había explicado anteriormente pudieron ser adquiridos a partir de una fuente común de contaminación o por infección cruzada.

Aunque el estudio presenta una limitante, dado que cuenta con una recolección de cepas no muy alta, en esta caso 39 y tiene la necesidad de ampliar el número de las mismas, el estudio es válido para sacar conclusiones puesto que los resultados fueron similares y proporcionales al estudio previo realizado en HOMI sobre perfil fenotípico de resistencia que incluía 483 aislamientos.

Este estudio es muy importante ya que es el primer estudio que se realiza en el hospital que correlaciona las características clínicas de los pacientes con los perfiles fenotípicos y genotípicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

## Referencias Bibliográficas

1. Rello J, Kollef MH, Díaz E, Rodríguez A. Infectious Diseases in Critical Care. Springer; 2007.
2. Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, < i> Pseudomonas aeruginosa, < i> Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2013;
3. Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2010 Dec; 28(10):726–36.
4. Sigurdsson G, Fleming RMT, Heinken A, Thiele I. A Systems Biology Approach to Drug Targets in Pseudomonas aeruginosa Biofilm. Plos One. 2012 Apr 16; 7(4):e34337.
5. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000 Aug 31; 406(6799):959–64.
6. Pseudomonas aeruginosa: New Insights for the Healthcare Professional: 2013 Edition: ScholarlyBrief. ScholarlyEditions; 2013.
7. Rehm BHA. Pseudomonas. John Wiley & Sons; 2008.
8. Sordé R, Pahissa A, Rello J. Management of refractory Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Infect Drug Resist. 2011; 4:31–41.
9. Kerr KG, Snelling AM. Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect. 2009 Dec; 73(4):338–44.
10. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct 1; 22(4):582–610.
11. Martínez-Martínez L, Calvo J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2010 Sept; 28:25–31.

12. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Jun;13(6):560–78.
13. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:17–38.
14. Li H, Luo Y-F, Williams BJ, Blackwell TS, Xie C-M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol Ijmm*. 2012 Mar;302(2):63–8.
15. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Oct;8(4):557–84.
16. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009 Sep;58(Pt 9):1133–48.
17. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Jul;50(1):11–8.
18. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al.  $\beta$ -Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. *Plos Pathog*. 2009 Mar 27; 5(3):e1000353.
19. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Jun;8(6):321–31.
20. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007 Jul 1; 45(1):88–94.
21. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Dec 1; 44(12):3322–7.
22. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis*. 2001 Apr;7(2):337–41.
23. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul; 21(3):449–65.

24. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. Técnicas de tipificación *genético* para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2013 Feb; 31:20–5.
25. Fernández-Cuenca F, López-Cortés LE, Rodríguez-Baño J. [The microbiology laboratory's contribution to the surveillance and control of outbreaks caused by nonfermentative Gram-negative bacilli]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2011 Mar; 29 Suppl 3:40–6.
26. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the *genético* epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2010 Oct;10(7):866–75.
27. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the *genético* subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*. 2001 Jun; 7(3):382–9.
28. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep; 43(9):4328–35.
29. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr; 49(4):1306–11.
30. Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar; 56(3):1265–72.
31. Chávez-López MA, Cid-Guerrero D, Martínez-Medina L, Muñoz-Fernández L. Osteomielitis de rótula y artritis séptica de rodilla por *Pseudomonas aeruginosa*. *Boletín Médico Hosp Infant México*. 2008 Feb; 65(1):32–5.
32. Prego J, Bello O, Dufort G, de Leonardis D, Sehabiague G, Imbriaco H, et al. Shock séptico por *Pseudomonas aeruginosa* adquirido en la comunidad asociado a neutropenia, en un paciente previamente sano. *Arch Pediatría Urug*. 2006 Jun; 77(2):143–8.
33. Navarro P, Villarroel E, Jakowlew A, Andrade E, Garrido E. Uropatógenos y su sensibilidad antimicrobiana: identificados en niños con infección urinaria;

Uropathogens and antibiotics sensibility: identification in urinary infections with children. *Antibiot Infecc.* 2003; 11(1):25–7.

34. Fenner L, Richet H, Raoult D, Papazian L, Martin C, La Scola B. Are clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* more virulent than hospital environmental isolates in amebal co-culture test? *Crit Care Med.* 2006 Mar; 34(3):823–8.
35. Cuesta D, Vallejo M, Guerra K, Cárdenas J, Hoyos C, Loaiza E, et al. Infección intrahospitalaria por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: estudio de casos y controles. *Med Upb.* 2012; 31(2):135–42.
36. OMS | Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas 2011–2012 [Internet]. WHO. [Cited 2013 Aug 19]. Available from: [http://www.who.int/ihr/publications/who\\_hse\\_ihr\\_20100801/es/](http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ihr_20100801/es/).
37. Salazar F. BIOETICA SALUD USCO: RESOLUCION 8430 DE 1993 [Internet]. Bioet. Salud Usco. 2009 [cited 2013 Mar 4]. Available from: <http://bioeticasaludusco.blogspot.com/2009/03/resolucion-8430-de-1993.html>.
38. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 2007; 67:351–68. <http://dx.doi: 10.2165/00003495-200767030-00003>.
39. Nicolau CJ y Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28:19–28. [http://dx.doi: 10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](http://dx.doi: 10.1016/S0213-005X(10)70004-5).
40. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5094–101. <http://dx.doi: 10.1128/JCM.42.11.5094-5101.2004>.
41. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:1553–5. <http://dx.doi:10.1128/AAC.01405-06>.
42. Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, Quinn JP. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 *Pseudomonas*

- aeruginosa isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jan; 50(1):226-9.
43. E. Cercenado y J. Saavedra-Lozano. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I) *An Pediatr Contin.* 2009;7(4):214-7
44. E. Cercenado y J. Saavedra-Lozano. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I) *An Pediatr Contin.* 2009;7(4):214-7.
45. R. Cantón. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(6):375–385.
46. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(6):355-60
47. Henríquez Iguarán, Daibeth E.; Leal Castro, Aura L. Boletín informativo GREBO 2010
48. Boletín informativo GREBO 2013
49. Arango A., Jailer; Camacho M., Germán; Lucía L., Aura; Montilla, M. Caracterización fenotípica de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital infantil en la ciudad de Bogotá 2013-2014, Pendiente publicar, presentado en el IX Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Agosto de 2014, Barranquilla Colombia.
50. CLSI. *Performance Standards for antimicrobial susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement.* CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
51. Jordi Vila y Francesc Marco. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(10):726–736

