

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD



**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE METALO- β -
LACTAMASAS EN *Acinetobacter baumannii* Y *Pseudomonas*
aeruginosa CONFIRMADOS EN EL INLASA DURANTE LOS
AÑOS 2013 Y 2014**

Tesis de grado para la obtención del Grado de licenciatura

RODNEY VINO ORELLANA

LA PAZ-BOLIVIA
2016

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD



**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE METALO- β -
LACTAMASAS EN *Acinetobacter baumannii* Y *Pseudomonas
aeruginosa* CONFIRMADOS EN EL INLASA DURANTE LOS AÑOS
2013 Y 2014**

Tesis de grado para la obtención del Grado de licenciatura

RODNEY VINO ORELLANA

TUTORES: DR. GIOVANNI GARCIA RADA M. SC.

DRA. YLOSVA HELEN COPA PEÑA BQ.

LA PAZ-BOLIVIA
2016

DEDICATORIA

Por aquellos que ya se fueron
Por aquellos que están presentes
Y por aquellos que aún están por llegar
Por todos ellos, gracias Señor.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Laboratorios en Salud por permitir la realización de este proyecto.

A mis asesores: el Dr. Giovanni García Rada y la Dra. Ylosva Helen Copa Peña, gracias por su dedicación, paciencia y por transmitirme parte de sus conocimientos.

A todo el personal del laboratorio de Bacteriología Clínica del INLASA y del CIGMO, gracias por todo el apoyo en infraestructura y equipo.

A mí querida Carrera de Bioquímica de la UMSA, por las enseñanzas y experiencias.

A la Profa. Ma. Teresa Ulloa Flores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el Lic. Edgar Gonzales Escalante del Instituto Nacional de Salud del Niño de Lima, por su gran ayuda para finalizar este trabajo.

Al Dr. J. Gonzalo Yanarico, por la colaboración y por contagiarme su entusiasmo.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante toda mi carrera universitaria. En especial a mis padres Macedonio y Silvia, gracias de todo corazón por darme aquello que más me impulsa para seguir adelante: su ejemplo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
A. JUSTIFICACIÓN.....	4
B. OBJETIVOS.....	5
OBJETIVO GENERAL:.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	5
II. DISEÑO TEÓRICO	6
A. MARCO REFERENCIAL	6
1. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA.....	6
2. DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO.....	8
B. MARCO TEÓRICO	9
1. LOS MICROORGANISMOS	9
1.1. CARACTERÍSTICAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.1.1 TAXONOMÍA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.1.2 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE <i>P. aeruginosa</i>	10
1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE <i>P. aeruginosa</i>	10
1.1.4 PATOGÉNESIS DE <i>P. aeruginosa</i>	11
1.1.5 IDENTIFICACIÓN DE <i>P. aeruginosa</i>	13
1.2. CARACTERÍSTICAS DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
1.2.1 TAXONOMÍA DE <i>A. baumannii</i>	15
1.2.2 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE <i>A. baumannii</i>	16
1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE <i>A. baumannii</i>	16
1.2.4 PATOGÉNESIS DE <i>A. baumannii</i>	17
1.2.5 IDENTIFICACIÓN DE <i>A. baumannii</i>	18
2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA A LOS β -LACTÁMICOS	20
2.1 TIPOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	20
2.1.1 ALTERACIONES DE PERMEABILIDAD POR PERDIDA DE PORINAS (OMPs).....	20

2.1.2 SISTEMAS DE BOMBAS DE EFLUJO	21
2.1.3 MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A PENICILINAS (PBPs)....	21
2.1.4 β -LACTAMASAS	21
2.2 RESISTENCIA DE <i>P. aeruginosa</i> A LOS β -LACTÁMICOS	22
2.3 RESISTENCIA DE <i>A. baumannii</i> A LOS β -LACTÁMICOS	24
2.4 CARBAPENEMES	26
2.5 CARBAPENEMASAS	28
2.6 MÉTALO- β -LACTAMASAS O MBLs	29
2.6.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS MBLs	31
2.6.2 CONTEXTO GENÉTICO DE LAS MBL – INTEGRONES	32
2.6.3 EPIDEMIOLOGIA DE LAS MBLs	34
2.6.3.1 MÉTALO- β -LACTAMASA TIPO IMP	35
2.6.3.2 MÉTALO- β -LACTAMASA TIPO VIM	38
2.6.3.3 MÉTALO- β -LACTAMASA TIPO NDM	41
2.6.3.4 OTROS GENOTIPOS DE MÉTALO- β -LACTAMASAS	42
2.6.4 DETECCIÓN DE MBLs	43
2.6.4.1 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MBLs	44
2.6.4.5 DETECCIÓN GENOTÍPICA DE PRODUCTORES DE MBLs	47
C. MARCO CONCEPTUAL	48
III. OPERALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	49
IV. DISEÑO METODOLÓGICO.....	50
A. TIPO DE ESTUDIO	50
B. POBLACION EN ESTUDIO	50
C. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	50
1. CRITERIOS DE INCLUSION	50
2. CRITERIOS DE EXCLUSION	50
3. CONTROLES.....	51
4. CONTEXTO Y LUGAR.....	51
5. PROCEDIMIENTO TÉCNICO.....	51
5.1 DATOS GENERALES DE LAS CEPAS DE <i>P. aeruginosa</i> Y <i>A. baumannii</i> UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.....	51
5.2 RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS	52

5.3 OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO	52
5.4 PCR PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES PRODUCTORES DE MBLs ...	53
5.5 CORRIDA ELECTROFORÉTICA Y REVELADO DEL GEL	55
V. RESULTADOS.....	56
RESULTADOS DE CEPAS CARACTERIZADAS GENOTÍPICAMENTE COMO PORTADORAS DE LOS GENES <i>bla_{IMP-1}</i> , <i>bla_{VIM-1}</i> Y <i>bla_{NDM-1}</i> EN CEPAS IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014.....	56
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MBLs EN CEPAS DE <i>P. aeruginosa</i> Y <i>A. baumannii</i> IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014, EN RELACIÓN A LA ESPECIE.....	57
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MBLs EN CEPAS DE <i>P. aeruginosa</i> Y <i>A. baumannii</i> IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014, EN RELACIÓN AL DEPARTAMENTO DE PROCEDENCIA DE LA CEPA.....	58
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MBLs EN CEPAS DE <i>P. aeruginosa</i> Y <i>A. baumannii</i> IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014, EN RELACIÓN AL AÑO DE AISLAMIENTO DE LA CEPA	59
VI. DISCUSIÓN	60
VII. CONCLUSIONES.....	66
VII. RECOMENDACIONES	67
IX. BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXOS	81

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estructura química de los principales carbapenemes.....	27
Ilustración 2. Clasificación de las carbapenemasas según Ambler.....	29
Ilustración 3. Sitio de ataque de las β -lactamasas sobre el anillo β -lactámico	31
Ilustración 4. Transferencia horizontal: Adquisición de nuevo material genético mediante conjugación, transducción y/o transformación.....	32
Ilustración 5. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de <i>cassettes</i> genéticos de resistencia.....	34
Ilustración 6. Esquema de interpretación del método de Hodge modificado para la detección de MBLs	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hospitales y Centros laborales pertenecientes a la Red de Vigilancia de Patógenos Intrahospitalarios	8
Tabla 2. Pruebas fenotípicas para la identificación de <i>P. aeruginosa</i>	14
Tabla 3. Pruebas fenotípicas para la identificación del complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>	19
Tabla 4. Clasificación de β -lactamasas	25
Tabla 5. Estructura química de los β -lactámicos	26
Tabla 6. Reportes de MBLs tipo IMP	36
Tabla 7. Reportes de MBLs tipo VIM	39
Tabla 8. Reportes de MBLs NDM-1.....	42
Tabla 9. Número de cepas estudiadas de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> en relación al departamento de procedencia en el año 2013	52
Tabla 10. Número de cepas estudiadas de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> en relación al departamento de procedencia en el año 2014	52
Tabla 11. Secuencia de primers para la identificación de MBLs	53

Tabla 12. Concentración de reactivos para del Mix de PCR para la identificación de MBLs	54
Tabla 13. Tiempos de ciclaje del PCR para identificación de MBLs	55
Tabla 14. Resultados de cepas caracterizadas genótipicamente como portadoras de los genes <i>bla_{IMP-1}</i> , <i>bla_{VIM-1}</i> y <i>bla_{NDM-1}</i> en cepas identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014	56
Tabla 15. Caracterización genética de MBLs en cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014, en relación al departamento de procedencia de la cepa	58

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Caracterización genotípica de MBLs en cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014, en relación a la especie.	57
Gráfico 2. Caracterización genética de MBLs en cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014, en relación al año de aislamiento de la cepa.	59

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Resultado positivo para la presencia de MBLs en el test de sinergia por aproximación de discos	44
Fotografía 2. Resultado positivo para la presencia de MBLs en la prueba de disco combinado	45
Fotografía 3. Detección de MBLs mediante la prueba de E-test-MBL®	46

TABLA DE ABREVIATURAS

MBL: Métalo- β -lactamasas

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

NDM: New Delhi Metallo- β -lactamase (Metallo- β -lactamasa Nueva Delhi)

VIM: Imipenemasa Verona (Verona Imipenemase)

IMP: Imipenemasa

IAAS: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

EDTA: Acido etilendiamino tetra acético

PBP: Proteínas de asociación a las penicilinas

RESUMEN

Los carbapenemes son antimicrobianos de amplio espectro ampliamente utilizados contra microorganismos multirresistentes; sin embargo, la producción por patógenos intrahospitalarios de enzimas carbapenemasas del tipo *métalo-β-lactamasas* o MBLs provoca el fracaso terapéutico de este tipo de antimicrobiano. Estas enzimas se encuentran asociadas con elementos genéticos móviles, lo que facilita su dispersión entre diferentes especies de bacterias, de las cuales destacan *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, que son importantes patógenos oportunistas causantes de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS). El objetivo principal de este estudio es realizar la caracterización genotípica de las variantes de enzimas métalo β-lactamasas (MBLs) en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* remitidas al Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) durante los años 2013 y 2014 donde fueron identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs. Se trabajó con 42 cepas de *A. baumannii* y 26 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de aislados clínicos hospitalarios de distintos departamentos de Bolivia; a las mismas se les realizó la extracción de su ADN, para caracterizar, mediante la técnica de PCR convencional la presencia de los genes productores de MBLs: *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}* y *bla_{NDM-1}*. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: en las cepas del año 2013, se detectó la NDM-1 en 2 cepas de *A. baumannii* y en 2 cepas de *P. aeruginosa*; en las cepas del año 2014, se detectó la IMP-1 en 8 cepas de *P. aeruginosa*, también se detectó la NDM-1 en una cepa de *P. aeruginosa* y en 3 cepas de *A. baumannii*. En cepas de ambos años, no se detectó la presencia del *gen VIM-1*. En vista de la detección de MBLs de tipo IMP-1 y principalmente NDM-1 en microorganismos aislados en muestras clínicas de nuestro país, es necesario continuar realizando estudios de tipo epidemiológico sobre las MBLs para diseñar de estrategias que evitar su diseminación en hospitales de Bolivia.

Palabras clave: MBL, carbapenemes, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, PCR.

ABSTRACT

Carbapenems are broad-spectrum antimicrobial widely used against multiresistant microorganisms; however, production by nosocomial pathogens carbapenemases enzymes metallo- β -lactamase or MBLs causes therapeutic failure of this antimicrobial. These enzymes are associated with mobile genetic elements, which facilitate their dispersion among different species of bacteria, including *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*; these are important opportunistic pathogens causing infections associated with health care. The main objective of this study is the genotypic characterization of β -lactamase variants metalloproteinase enzymes (MBLs) in strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* sent to the Bacteriology Laboratory of National Institute of Health Laboratories (INLASA) during the 2013 and 2014, and identified phenotypically as MBL producers. We worked with 42 *A. baumannii* strains and 26 strains of *P. aeruginosa* from clinical isolates from different departments of Bolivia, to them underwent DNA extraction to characterize by conventional PCR technique, the presence producer's genes MBLs: *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}* and *bla_{NDM-1}*. The results obtained were as follows: strains in 2013, the NDM-1 was detected in 2 *A. baumannii* strains and 2 strains of *P. aeruginosa*; strains in 2014, IMP-1 was detected in 8 strains of *P. aeruginosa*, the NDM-1 was also detected in one *P. aeruginosa* strain and three 3 strains *A. baumannii*. In strains of both years, the presence of VIM-1 gene was undetected. In view of the detection of MBLs type IMP-1 and mainly NDM-1 in microorganisms isolated from clinical samples of our country, it is necessary to conduct epidemiological studies on MBLs to design strategies to prevent it from spreading in hospitals in Bolivia.

Keywords: MBL, carbapenems, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, PCR.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el año 2010 investigaciones realizadas por estudiantes de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón indican que alrededor del 5 a 10% de los pacientes internados sufren infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) (Pérez *et al.*, 2010), gran parte de estas infecciones son causadas por bacilos Gram negativos no fermentadores productores de las enzimas *métalo-β-lactamasas* (MBLs). Si bien este grupo de bacterias es numeroso, el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y en menor escala *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*, son los mayores responsables de los cuadros infecciosos (Cortéz, 2013).

Desde la caracterización del primer tipo de MBL, *Imipenemase* o IMP, en 1991 en un aislado clínico de *P. aeruginosa* en Japón, se reportaron distintos descubrimientos de diferentes tipos de MBLs por todo el mundo, como la *Verona imipenemase* o VIM en Italia y la *New Delhi Metallo-β-lactamase* o NDM en la India, entre varios otros (Sánchez *et al.* 2008).

En Latinoamérica, existen reportes de países como Colombia, Argentina, Chile, y Brasil que reportaron aislamientos de especies productoras de MBLs del tipo IMP y VIM (Saavedra *et al.* 2014). Sin embargo, en el año 2011, la Organización Panamericana de Salud lanza un alerta epidemiológico por el primer hallazgo de carbapenemasas de tipo NDM en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en Guatemala (OPS, 2011). Desde entonces y hasta la fecha son numerosos los países que reportan la presencia de este mecanismo de resistencia en numerosas especies bacterianas, como *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, pero no existen estudios sobre la epidemiología molecular de MBLs en nuestro país.

A. JUSTIFICACIÓN

El valor del presente estudio radica en contribuir en el estudio epidemiológico de las MBLs que circulan en Bolivia; las complicaciones para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias productoras de MBLs son muy relevantes, dado que las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por los patógenos de este tipo son escasas (Walsh *et al.* 2005).

Aunque no hay reportes sobre la epidemiología molecular de las enzimas metalo- β -lactamasas en Bolivia, desde el año 2009 ya se observó una elevada incidencia de bacterias Gram negativas multirresistentes en nuestro país, muchas de estas presentan resistencia a los carbapenémicos, principalmente el imipenem (Colón *et al.* 2009). Por este motivo, este trabajo pretende aportar datos sobre la caracterización de genotipos circulantes de MBLs en cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aisladas en distintos hospitales de nuestro país, siendo parte de un proceso de vigilancia epidemiológica que debe ser implementado, el cual proporcionara datos para establecer posibles medidas de prevención frente a las IAAS.

B. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar genótipicamente las variantes de enzimas metalo- β -lactamasas (MBLs) en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* remitidas al Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) durante las gestiones 2013 y 2014.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar los genes de MBLs más frecuentes en las cepas estudiadas.
- Determinar los genotipos de MBLs encontrados en relación a la especie bacteriana.
- Determinar los genotipos de MBLs encontrados en relación al departamento de procedencia de la cepa.
- Determinar los genotipos de MBLs encontrados en relación al año de aislamiento de la cepa.

II. DISEÑO TEÓRICO

A. MARCO REFERENCIAL

1. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA

Las MBLs según su etiología pueden ser residentes, cuando son codificadas por genes cromosómicos, como en el caso de bacterias como *Bacillus spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, entre otros (Papa, 2015). Por otro lado las MBLs de mayor importancia clínica y epidemiológica son las adquiridas, es decir, aquellas que pueden ser transferidas a través de elementos genéticos móviles (Cornaglia, 2011).

El posible hallazgo de MBLs se remonta a 1966, donde por primera vez se encuentra una cefalosporinasa que se inhibe con EDTA en un aislado de *B. cereus* en Japón, sin embargo tal descubrimiento no tuvo mayores repercusiones. Décadas más tarde, en el año 1991 también en Japón, se anuncia que un aislado clínico de *P. aeruginosa* era productor de la primera clase de MBL adquirida conocida, la IMP-1 cuyo nombre proviene de *Imipenemase* (Sánchez *et al.* 2008). Esta enzima demostró poseer un perfil hidrolítico sobre antimicrobianos betalactámicos como las: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, oxacefamicina y carbapenem, pero no sobre los monobactámicos como el aztreonam (Rivero *et al.* 2008).

La clase *Verona Integron encoded Metallobetalactamase* o VIM-1 fue aislada en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp* en Italia en 1997. Las MBLs del tipo VIM poseen distintas variantes alélicas numeradas, dentro de las cuales la más diseminada a nivel mundial es VIM-2. Este tipo de MBL ha sido descrito en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, así como en *Enterobacterias*, y presenta una especificidad de sustrato más amplia que el IMP (Pérez, 2014)

En 2008, se ha documentado a nivel mundial la circulación de microorganismos productores de una nueva clase de MBL denominada *New Delhi metallo- β -lactamase* o

NDM-1. Originaria de India, fue encontrada en un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae* de un ciudadano sueco que retornó de un viaje a Nueva Delhi. La NDM-1 provocó un gran revuelo internacional porque se comprobó que se transfiere muy fácilmente a otras cepas por transferencia horizontal de genes y es muy eficiente en su actividad hidrolítica. Posteriormente se reportaron aislamientos de NDM-1 de otras especies en Japón, Australia, Canadá y los Estados Unidos de América. (Chinchilla *et al.* 2013).

Hasta el momento se han descrito doce tipos de MBL; en particular, en Latinoamérica se han reportado la detección de distintas variantes de las MBLs IMP, VIM y NDM en diferentes especies de Gram negativos no fermentadores. En Brasil se han reportado casos de VIM e IMP en *P. aeruginosa* y la segunda también en enterobacterias. IMP también se ha reportado en Argentina y México, mientras que VIM se ha hallado en Argentina, Chile, Venezuela, Colombia y México, principalmente en especies del género *Pseudomonas*, en México también asociada a enterobacterias (Papa, 2015; Cornaglia, 2011). Por otra parte la MBL tipo NDM es la última a reportarse en este continente, hallada primero en Guatemala en un aislamiento de *K. pneumoniae* como indica la Organización Panamericana de Salud (OPS, 2011), luego la siguieron hallazgos en Colombia, Mexico, Honduras, Brasil y Paraguay (Seija *et al.* 2015).

No se conocen artículos o reportes en revistas científicas nacionales o internacionales sobre la caracterización de los genotipos de MBLs circulantes en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en nuestro país.

2. DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

Se trabajó con cepas aisladas a partir de muestras clínicas procedentes de distintos hospitales y laboratorios que hacen parte de la Red de Vigilancia de Patógenos Intrahospitalarios dependiente del Ministerio de Salud (Tabla 1). Su procesamiento se realizó en los laboratorios de Bacteriología Clínica del INLASA donde se realiza la vigilancia epidemiológica de la sensibilidad y resistencia antimicrobiana de distintos microorganismos provenientes de todo el país y el Centro de Investigaciones Genético Moleculares (CIGMO) también de la misma institución.

Tabla 1. Hospitales y Centros laboratoriales pertenecientes a la Red de Vigilancia de Patógenos Intrahospitalarios (Fuente propia).

HOSPITAL	DEPARTAMENTO
Hospital Municipal Boliviano Holandés	La Paz
Instituto Nacional Del Tórax	La Paz
Hospital de Clínicas	La Paz
Hospital Arco Iris	La Paz
Caja Petrolera de Salud	La Paz
COSSMIL	La Paz
Hospital Materno Infantil Germán Urquidi	Cochabamba
Laboratorio San Martín de Porres	Cochabamba
Caja de Salud Banca Privada	Cochabamba
CENETROP	Santa Cruz
Hospital Municipal De Niños Mario Ortiz Suarez	Santa Cruz
Hospital Universitario Hernández Vera	Santa Cruz
Hospital Mario Ortiz Suarez	Santa Cruz
Clínica Foianini	Santa Cruz
Hospital Obrero	Santa Cruz
Hospital Santa Bárbara	Chuquisaca
C.N.S Policlínico Sucre	Chuquisaca
Hospital Santa Barbará	Chuquisaca

B. MARCO TEÓRICO

1. LOS MICROORGANISMOS

1.1. CARACTERÍSTICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa fue aislada por primera vez en muestras ambientales por Schroeter en 1872. Su nombre proviene de la coloración de las colonias azul verdoso que presentan debido a la producción de pigmentos, de ahí su denominación aeruginoso (el color del cobre oxidado) (Díaz, 2008).

Pertenece al género *Pseudomonas*, cuyas especies se caracterizan por su forma de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos y normalmente como aerobios estrictos. En general son inocuas para el hombre, pero la especie *P. aeruginosa* es considerada como un patógeno oportunista. (Martínez, 2007).

1.1.1 TAXONOMÍA DE *Pseudomonas aeruginosa*

La clasificación taxonómica vigente de *P. aeruginosa* (Ruíz, 2007) es la siguiente:

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: *P. aeruginosa*

1.1.2 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, aerobio, móvil, delgado, no formador de esporas, distribuido ampliamente en la naturaleza. Mide de 1,5 a 5 μm de largo y 0,5 a 1 μm de ancho, es catalasa y oxidasa positiva; degrada glucosa por vía oxidativa y el nitrato a nitrito. Normalmente posee un solo flagelo. Produce dos tipos de pigmentos de importancia: piocianina (azul) y pioverdina (verde fluorescente), algunas cepas además producen los pigmentos piorrubina (rojo oscuro) y piomelanina (negro). Crece bien a temperaturas de 37° y 42° C y en diferentes medios de cultivo formando colonias lisas o mucosas con olor a uva (Winn *et al.* 2008).

Presenta un requerimiento nutricional mínimo, además cuenta con una tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas y una resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos. Por estas razones tiene un papel importante como patógeno intrahospitalario (Martinez, 2007).

Aunque no es muy frecuente, hace parte de la microbiota normal humana, pudiéndose encontrarse en el tracto gastrointestinal, aunque rara vez causa enfermedad en individuos sanos (Núñez, 2009).

1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno oportunista de gran relevancia clínica que se encuentra entre los cinco patógenos más aislados en hospitales de Latinoamérica (Saavedra *et al.* 2014).

Al tener mínimos requerimientos nutricionales, este microorganismo puede sobrevivir a diversas condiciones físicas del ambiente hospitalario, y se ha podido aislar en superficies, equipo hospitalario, medicamentos, antisépticos, jabones y diversos productos de limpieza (Díaz, 2008).

El espectro de infecciones que pueden causar, va desde una foliculitis, hasta la bacteremia que puede comprometer la vida de los pacientes. Las infecciones más

comunes implican la córnea, la piel y el tracto urinario y respiratorio, sin embargo las infecciones por este patógeno pueden ocurrir en todas las localizaciones anatómicas pudiendo derivar en bacteriemia. También es particularmente importante en pacientes con quemaduras severas y fibrosis cística (Martínez, 2010).

Este microorganismo también es responsable de las neumonías asociadas a ventilación automática e infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos. Los individuos más susceptibles a las infecciones por este microorganismo son aquellos que presentan inmunodeficiencia o un epitelio pulmonar comprometido debido a fibrosis cística, así como los que han sufrido quemaduras severas, ulceraciones o abrasiones mecánicas, como las producidas como resultado de la implantación de catéteres. La inmunodeficiencia del huésped, combinada con la elevada incidencia de cepas resistentes a los antibióticos, hace que el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno se convierta en un serio reto médico (Ruiz, 2007).

1.1.4 PATOGÉNESIS DE *P. aeruginosa*

Las infecciones por *P. aeruginosa* se pueden clasificar en agudas o crónicas. Las agudas, como las neumonías asociadas a ventilación automática, son invasivas, citotóxicas y frecuentemente resultan en una infección sistémica, shock séptico y elevada mortalidad; las crónicas como las infecciones respiratorias asociadas a fibrosis cística, son muy poco invasivas, no citotóxicas y raramente progresan a infección sistémica, aunque pueden persistir durante décadas, resultando en deterioro del epitelio pulmonar (Ruíz, 2014; Martínez, 2010).

La patogénesis de este microorganismo se describe a menudo como multifactorial, esto debido a la gran variedad de factores de virulencia que *P. aeruginosa* posee (Winn *et al.* 2008):

Componentes estructurales

- Alginato: Polisacárido capsular que permite la adhesión a la superficie celular y permite la formación de biopelículas, que a su vez protege a las bacterias contra los antimicrobianos y el sistema inmune del huésped.
- Pili: Apéndices de la superficie bacteriana para la adherencia a los receptores del gangliósido GM-1 localizados en la membrana de las células epiteliales del huésped.
- Lipopolisacárido: exotoxina que causa síndrome de sepsis.

Enzimas

- Neuraminidasa: Elimina los residuos de ácido siálico de los receptores de gangliósido GM-1, para facilitar la unión con los pilis.
- Elastasa: Escinde las inmunoglobulinas y los componentes del complemento, interrumpe la actividad de los neutrófilos.
- Fosfolipasa C: Destruye la membrana citoplasmática; desnatura la sustancia tensioactiva pulmonar; inactiva las opsoninas.

Toxinas

- Exotoxina A: Causa destrucción tisular, inhibición de síntesis proteica; interrumpe la actividad celular y la respuesta de los macrófagos.
- Exoenzima S: Inhibe la síntesis proteica.
- Piocianinas: Suprime a otras bacterias e interrumpe la actividad de los cilios respiratorios; produce daño oxidativo en los tejidos.

Pese a la gran variedad de factores de virulencia de *P. aeruginosa*, es el sistema de secreción tipo III el mayor determinante de virulencia. El sistema de secreción tipo III es común en patógenos Gram negativos, y funciona transportando toxinas directamente desde la bacteria adherida a la célula eucariota adherida. Este sistema de secreción puede incrementar el riesgo de mortalidad por hasta seis veces en una infección por este patógeno (Ruiz, 2007).

La formación de biofilm también juega un papel muy importante en la patogénesis de *P. aeruginosa*, ya que le permite colonizar la superficie de instrumentos médicos

como catéteres y tubos endotraqueales; esta característica hace que presente una elevada resistencia a los antimicrobianos, a los mecanismos de eliminación mediados por el complemento y a la fagocitosis (Estepa, 2014).

1.1.5 IDENTIFICACIÓN DE *P. aeruginosa*

Los requerimientos nutricionales de *P. aeruginosa* no son exigentes, por lo que crece en la mayoría de los medios de cultivo estándares; normalmente las muestras se cultivan en agar sangre, Mac Conkey o cualquier otro medio diferencial, no fermenta la lactosa siendo fácil su diferenciación de las bacterias que sí la fermentan (Torrico, 2009).

Es muy característico su olor semejante a jugo de uvas o de maíz, algunas cepas producen hemólisis, forma colonias redondas lisas, con frecuencia produce un piocianina: pigmento azulado no fluorescente, también produce pioverdina: pigmento que confiere un color verdoso al agar, algunas producen piorrubina: rojo oscuro o piomelanina: negro; estos diferentes pigmentos se pueden apreciar mejor sobre un agar Mueller Hinton. Pero es importante observar que no todas las especies de *Pseudomonas* producen piocianina. (Winn *et al.* 2008; Torrico *et al.* 2007).

Las características más notables en la identificación de *P. aeruginosa* (Damiani, 2009; Cosme, 2013) son:

- Al microscopio se observan bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos.
- Las colonias, dependiendo del medio de cultivo utilizado, pueden ser lisas o rugosas, redondas, alargadas y pigmentadas.
- No fermentan la glucosa.
- Son aerobios facultativos.
- Dan motilidad y oxidasa positiva.
- Crecen bien en medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura de crecimiento óptima de 37°C.

- *P. aeruginosa* presenta resistencia intrínseca a los siguientes antimicrobianos: Amino penicilinas, Amoxicilina/clavulanico, Cefotaxima, Cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, Cefoxitima, Kanamicina, Cloranfenicol, Tetraciclinas, Ertapenem, Ceftriaxona, Tigeciclina.

Tabla 2. Pruebas fenotípicas para la identificación de *P. aeruginosa* (Winn *et al.* 2008; Damiani, 2014)

Prueba bioquímica	Resultado
Tinción Gram	Bacilos Gram negativos
TSI	K/K (No fermentadora)
Oxidasa	+
Movilidad	+
Citrato Simons	+
Arginina deshidrogenasa	+
Gelatina	+
Denitrificación	+
Desarrollo a 42°C	+

1.2. CARACTERISTICAS DE *Acinetobacter baumannii*

El descubrimiento de las especies del género *Acinetobacter* data de 1911, cuando el microbiólogo danés Beijerinck aisló del suelo al microorganismo que llamó *Micrococcus calcoaeticus*. Desde entonces se describieron microorganismos similares y no fue hasta 1968 que Bouvet y Grimont designaron al género *Acinetobacter* para incluir las especies encontradas hasta entonces (Vegasa, 2005).

A. baumannii fue descubierta en 1968 y fue nombrada en honor a los bacteriólogos americanos Paul y Linda Baumann, que venían realizando estudios sobre

el género *Acinetobacter* en medio a varias discusiones por su clasificación taxonómica (Ledermann, 2007).

El género *Acinetobacter* está formado por especies con forma de cocobacilos (con forma de bastón corto y grueso), son estrictamente aerobios, no fermentadores, no móviles, oxidasa negativos, con amplia distribución en la naturaleza. Son importantes en el suelo ya que contribuyen a su mineralización. (López, 1998).

1.2.1 TAXONOMÍA DE *A. baumannii*

La clasificación taxonómica actual de *A. baumannii* (Vegasa, 2005), es la siguiente:

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Moraxellaceae

Género: *Acinetobacter*

Especie: *A. baumannii*

Los organismos pertenecientes al género *Acinetobacter* sufrieron a lo largo de la historia numerosos cambios taxonómicos, en la actualidad existen 32 especies de las cuales, solo se nombran hasta la número 17. Dada la complejidad de la nomenclatura de especies y biovariedades individuales, algunos sistemas de clasificación utilizan la expresión compleja *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ABC) para agrupar a especies que tienen características fenotípicas similares, incluyendo *A. baumannii*. (Ledermann, 2007; Damiani, 2014).

1.2.2 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE *A. baumannii*

Una de sus características más sobresalientes es su forma de coco bacilo, que se debe a que durante su fase de crecimiento la bacteria es un bacilo en forma de bastón de hasta 2,5 μm de largo. Es durante la fase estacionaria que las células se tornan más cortas y arredondeadas, semejantes a pequeños cocos al encoger hasta casi la mitad de su tamaño inicial. Al microscopio las bacterias se ven normalmente en pares o en aglomerados de células adheridas (Garnacho, 2004).

Es una bacteria Gram negativa, no fermenta la glucosa y es un aerobio estricto, inmóvil, catalasa positiva y oxidasa negativa. Crece bien en todos los medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 33 a 35° C (Díaz, 2010).

Debido a la simplicidad en sus requerimientos de crecimiento y a la capacidad para usar una gran variedad de fuentes de carbono a través de diversas vías metabólicas, *A. baumannii* puede ser hallado en múltiples medios animados e inanimados; así, puede ser aislado en material hospitalario, como aparatos de ventilación mecánica, catéteres, líquido de diálisis peritoneal y una amplia variedad de instrumentos. Además, *A. baumannii* puede formar parte de la microbiota normal de la piel de los adultos sanos (especialmente las manos) y puede colonizar la cavidad oral, faringe e intestino (Galvis *et al.* 2011).

1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE *A. baumannii*

En humanos, *A. baumannii* habita normalmente en la piel, en las membranas de la mucosa respiratoria y gastrointestinal. Este organismo puede sobrevivir en el suelo, en superficies húmedas, y a diferencia del resto de bacterias Gram negativas, puede resistir por un largo periodo en ambientes secos. La resistencia a la desecación es una característica que puede influir en el aumento de la transmisibilidad de cepas epidémicas, que habitualmente se encuentran en el ambiente hospitalario (Díaz, 2010).

Se da importancia a la vía aérea como una de las principales fuentes en la transmisión de la bacteria, especialmente a través de equipos médicos contaminados, como los tubos de intubación, catéteres, respiradores y dispositivos para monitorear la presión arterial. Existen reportes que demuestran la colonización del patógeno en sábanas, almohadas, equipos de sonido, televisión y ventiladores. La habilidad de *A. baumannii* para sobrevivir en las superficies secas de la piel en adultos sanos (especialmente en las manos) y su capacidad de colonizar la cavidad oral, faringe e intestino, hacen de estos sitios, reservorios epidemiológicos importantes que promueven la transmisión a través de fómites, características determinantes en los brotes epidémicos nosocomiales (Cortez, 2013).

La infección por la bacteria se establece frecuentemente en pacientes con enfermedades crónicas, quienes presentan múltiples condiciones de morbilidad, hospitalizados por largos períodos, que han sufrido múltiples procedimientos invasivos, con edad avanzada, falla respiratoria o cardiovascular, cirugías recientes, cateterización vascular central y urinaria, traqueotomía, alimentación parenteral y tratamiento antimicrobiano con antibióticos de amplio espectro como: cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y carbapenemes (Moreno, 2013).

1.2.4 PATOGÉNESIS DE *A. baumannii*

Comparado con otros patógenos Gram negativos, son pocos los factores de virulencia identificados en *A. baumannii* (McConell *et al.* 2013), los más sobresalientes son los siguientes:

- OmpA: Induce la apoptosis de las células huésped, adherencia e invasión de células epiteliales, formación de biofilm, incremento de motilidad, resistencia serológica.
- Lipopolisacarido: Ocasiona la evasión ante la respuesta inmune y desencadena respuesta inflamatoria.
- Lipopolisacarido capsular: Ocasiona la evasión ante la respuesta inmune y crecimiento en suero.

- Fosfolipasa D: Otorga resistencia serológica, diseminación de las colonias.
- Vesículas de membrana: Entregan factores de virulencia al citoplasma de las células hospederas, transferencia de material genético entre células bacterianas.
- Sistema de adquisición de hierro mediado por acinetobactina: Provee el hierro necesario para permanecer en el hospedero, ocasiona apoptosis celular.

De forma global, todas las especies del género *Acinetobacter* son consideradas como patógenas de bajo grado con limitada virulencia comprobada. Sin embargo, puede afirmarse que estos microorganismos tienen ciertas características que les permiten incrementar la virulencia cuando están implicados en infecciones; tales características están relacionadas con su capacidad de invasividad y toxigenicidad (López, 1998).

1.2.5 IDENTIFICACIÓN DE *A. baumannii*

A. baumannii es el segundo bacilo Gram negativo no fermentador más frecuentemente aislado en laboratorios clínicos dada su facilidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos usados en la clínica, incluidos los de amplio espectro, como los carbapenemes. (Winn, 2008).

El complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* o ABC reúne a especies altamente similares que no pueden ser diferenciadas por pruebas fenotípicas, entre ellas la propia *A. baumannii*, estas especies son referidas como el complejo ABC (Vanegas y Muñera, 2014).

En la tabla 3 se muestran las principales pruebas realizadas para la identificación del complejo ABC, sus características más sobresalientes (Torrico *et al.* 2007; Damiani, 2014) son:

- Al microscopio se observan cocobacilos Gram negativos y muchas veces dispuestos en parejas.
- Las colonias miden entre 0,5 a 2 mm de diámetro, translucidas a opacas, blancas o grisáceas, a veces hemolíticas (nunca pigmentadas) convexas y enteras, son poco exigentes.

- No fermentan la glucosa.
- Son aerobios estrictos.
- Son inmóviles y oxidasa negativos.
- Crecen bien en medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura de crecimiento óptima de 33° a 35°C. Además *A. baumannii* y *A. nosocomialis* crecen a 44°C.
- El complejo ABC presenta resistencia intrínseca a: Ampicilina, Amoxicilina/clavulánico, Cefotaxima, Cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, Cefoxitima, Cloramfenicol, Tetraciclinas, Ertapenem y Fosfomicina.

Tabla 3. Pruebas fenotípicas para la identificación del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Winn et al. 2008; Damiani, 2014)

PRUEBA	RESULTADO
Tinción Gram	Coco bacilos Gram negativos
TSI	K/K (No fermentadora)
Oxidasa	-
Motilidad	-
Crecimiento en agar MacConkey	+
Crecimiento a 44°C	+
Glucosa OF	+
NO ₂ reducido	-
Gelatina	-
Urea	-
Pigmentación	-

2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA A LOS β -LACTÁMICOS CARBAPENEMES

2.1 TIPOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La resistencia bacteriana puede ser definida como el conjunto de mecanismos de adaptación de las bacterias contra los efectos nocivos o letales a los cuales están siendo expuestas (Livermore, 1995). Los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos más conocidos son: la resistencia por alteraciones de la permeabilidad, por expulsión activa, por modificación de PBPs o por inactivación por β -lactamasas (Vignoli y Seija, 2000).

2.1.1 ALTERACIONES DE PERMEABILIDAD POR PERDIDA DE PORINAS (OMPs)

En la pared celular de los microorganismos Gram negativos, existen dos membranas, una externa y una interna adyacentes. La zona exterior de la membrana externa está constituida casi exclusivamente por lipopolisacáridos y proteínas asociadas, mientras que la pared interna contiene fosfolípidos además de proteínas. Uno de los principales tipos de proteínas asociadas de la membrana externa lo constituyen las porinas. Estas pueden atravesar la membrana externa formando canales. Estos tienen un diámetro distintivo que le dan a la membrana externa una función de tamizado molecular; por el cual se da el movimiento de pequeñas moléculas como algunos nutrientes y antibióticos, como los carbapenemes (Vignoli y Seija, 2000).

Se desconocen mucha información acerca de las propiedades de OMPs, por lo que sus funciones no están muy claras. Sin embargo está asociada la disminución de la cantidad de porinas y de su tamaño para explicar el decremento en la permeabilidad de la membrana externa para antibióticos en *A. baumannii* y en otras bacterias Gram negativas, como *P. aeruginosa* (Ruiz, 2007).

2.1.2 SISTEMAS DE BOMBAS DE EFLUJO

Se denomina bombas multidrogas o de eflujo a una serie de proteínas transportadoras que son capaces de expulsar, de manera relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados estructuralmente, como los antibióticos (Cortés, 2013).

Las bombas de eflujo corresponden a una clase de transportadores involucrados en la captación de iones y nutrientes esenciales, excreción del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente. La presencia de sistemas de expulsión activa aparece ligada al operón *mexA-mexB-oprM* que afecta sobre todo a meropenem y otros β -lactámicos, confiriendo multirresistencia sobretodo en *P. aeruginosa* (Nuñez, 2009).

2.1.3 MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A PENICILINAS (PBPs)

Este mecanismo de resistencia consiste en que los microorganismos cambian la estructura de las PBPs presentes en su membrana de tal manera que no permite la unión del antibiótico a éstas. Es efectivo para antibióticos que tienen como objetivo inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana y cuyo sitio blanco son las PBPs (Felipe, 2010).

Las modificaciones de las PBPs son el principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos en bacterias Gram positivas, siendo el más destacado la adquisición del *gen MecA* en *S. aureus*; es un mecanismo raro en bacterias Gram negativas aunque puede aparecer en *Proteus mirabilis*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (Lopez, 1998).

2.1.4 β -LACTAMASAS

El mecanismo más utilizado por los bacilos Gram negativos para adquirir resistencia a penicilinas y β -lactámicos en general, ya sea que esto ocurra de manera

natural o adquirida, es la inactivación de las drogas por las enzimas β -lactamasas (Solorzano, 2004).

Para lograr su efecto los β -lactámicos necesitan tener su anillo β -lactámico intacto. Las β -lactamasas rompen este anillo inactivando el antibiótico, abriendo el anillo de las penicilinas y demás β -lactámicos entre los átomos de C y N para formar compuestos inactivos. Las cefalosporinas de 3^o generación presentan mayor estabilidad frente a las β -lactamasas, siendo más activas frente a bacterias gram-negativas que a Gram positivas. De éstas, es la ceftazidima quien tiene mejor actividad frente a Gram negativos y el cefepime, una cefalosporina de 4^o generación, que presenta actividad similar a ceftazidima. Los carbapenemes surgen como una opción terapéutica frente a bacterias multirresistentes, ya que no son hidrolizadas por la mayoría de β -lactamasas (Gonzales, 2011). Sin embargo, es una tendencia actual el surgimiento cada vez mayor de enzimas que hidrolizan los carbapenemes, las carbapenemasas (Cornaglia *et al.* 2011).

La producción de β -lactamasas en *P. aeruginosa* ocurre frecuentemente, éstas pueden ser codificadas por genes localizados en el cromosoma o en plásmidos. Existe más de una clasificación de β -lactamasas. La clasificación de Ambler, las divide en 4 clases (A, B, C y D) de acuerdo a su estructura molecular y la de Bush, que también las divide en 4 grupos funcionales (1, 2, 3 y 4) se basa en sus características de afinidad por el sustrato y la acción de los inhibidores (tabla 4) (Gonzales, 2011).

2.2 RESISTENCIA DE *P. aeruginosa* A LOS β -LACTÁMICOS

No es infrecuente que la elección del tratamiento antimicrobiano más adecuado para tratar las infecciones que produce *P. aeruginosa* sea problemática. Ello se debe básicamente a dos factores: *P. aeruginosa* posee una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos y por otra parte, es un microorganismo con extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, siendo la más importante por la transferencia horizontal de genes de resistencia (Nicolau y Oliver, 2007).

Inicialmente se pensó que esta resistencia intrínseca era debida al hecho que el microorganismo posee una membrana externa que presenta baja permeabilidad. Pero esta propiedad de la membrana externa es insuficiente por sí misma para explicar la elevada resistencia que presenta este microorganismo y se postuló la existencia de mecanismos secundarios que en el caso de *P. aeruginosa* son dos: la producción de β -lactamasas y los sistemas de reflujo o bombas de expulsión (Ruiz, 2007).

Al margen de la producción de β -lactamasas cromosómicas, como la AmpC que hidroliza a algunos β -lactámicos a la cefotaxima y ceftazidima; *P. aeruginosa* puede adquirir otros tipos de β -lactamasas mediante el intercambio de material genético. Las de tipo TEM, que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos. La enzima PER-1, que inactiva a ceftazidima, cefepima, aztreonam y ticarcilina. Las enzimas OXA, que incluyen las OXA-11, 14, 16, 17, 19, 28 y las derivadas de la OXA-24, la OXA-10 y 15, todas ellas confieren resistencia a ticarcilina, piperacilina, ceftazidima, cefepima y aztreonam; además que las enzimas OXA 23 y 48 hidrolizan a carbapenemes (Vila y Marco, 2002).

Las carbapenemasas tipo MBLs (que se codifican en su mayoría por integrones de tipo 1 de localización plasmídicos o cromosómica) hidrolizan rápidamente a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepima y carbapenemes. En cambio, aztreonam se mantiene estable y conserva su actividad. (Diaz, 2008).

En *P. aeruginosa* también se han descrito varios sistemas de activación de bombas de expulsión: siendo el más importante es el sistema MexAB-OprM, también tenemos los sistemas MexCD-OprJ, el MexEF-OprN y el MexXY-OprM. En su conjunto, contribuyen en mayor o menor medida a un aumento de las CIM (concentración inhibitoria mínima) de carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas, monobactamas, y también otros antimicrobianos distintos de los β -lactámicos como las fluoroquinolonas y, en ocasiones aminoglucósidos (Gómez *et al.* 2008).

2.3 RESISTENCIA DE *A. baumannii* A LOS β -LACTÁMICOS

El aspecto más preocupante de *A. baumannii* es la extraordinaria capacidad de la bacteria para captar resistencia de otras bacterias y así desarrollar resistencia a todos los grupos de antibióticos, principalmente los β -lactámicos (Montero, 2006).

Su capacidad para adquirir resistencia a los β -lactámicos y antimicrobianos puede deberse a la relativa impermeabilidad de su membrana externa y a la exposición ambiental a un gran reservorio de genes de resistencia. Los mecanismos de resistencia de *A. baumannii* son similares a los de *P. aeruginosa*, aunque no han sido del todo estudiados (Torres *et al.* 2010).

En la actualidad, *A. baumannii* es resistente a la mayoría de β -lactámicos, en particular en aislamientos de pacientes que se encuentran en áreas de cuidados intensivos. La resistencia a ampicilina, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas se ha relacionado con la presencia de β -lactamasas plasmídicas del tipo TEM. Sin embargo, resultados recientes sugieren que la sobreexpresión de una β -lactamasa cromosómica tipo AmpC es un mecanismo frecuente de resistencia a β -lactámicos y genera un fenotipo de resistencia caracterizado por resistencia a ampicilina, cefalotina, piperacilina, cefotaxima y ceftazidima (Vila y Marco, 2002).

Otro tipo de β -lactamasas encontrado a menudo en aislamientos clínicos de *A. baumannii* son las β -lactamasas tipo OXA. Estas enzimas inactivan amoxicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, ticarcilina, piperacilina y cefalotina, aunque algunas de estas enzimas pueden tener actividad frente a cefotaxima y ceftazidima (Vignoli y Seija 2000). La aparición de resistencia a carbapenemes se debe a la escasa penetrabilidad de su pared por la pérdida de porinas, alteración en proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) y la producción de diferentes β -lactamasas carbapenemasas, como OXA-23 y -48 de localización cromosómica que hidrolizan carbapenemes y otros β -lactámicos y las de tipo metalo- β -lactamasas (MBL) de localización plasmídica que presentan un amplio espectro hidrolítico (Montero, 2006).

Los canales de porinas y otras proteínas de membrana externa son importantes para el transporte de agentes antimicrobianos en la célula o para conseguir acceder a las

dianas bacterianas. Especialmente la resistencia a carbapenemes de *A. baumannii* se ha relacionado con la pérdida de proteínas que probablemente forman parte de los canales de porinas de la membrana externa. Es probable que las β -lactamasas y las alteraciones en la membrana externa actúen de forma conjunta para conferir resistencia a los agentes β -lactámicos. *A. baumannii* tiene además bombas de eflujo capaces de expulsar de forma activa un amplio espectro de agentes antimicrobianos que actúan sobre la pared bacteriana (Torres *et al.* 2010).

Tabla 4. Clasificación de β -lactamasas (Bush et al. 2011)

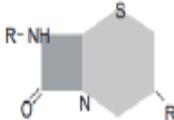
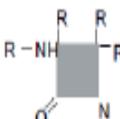
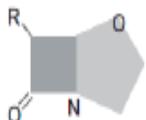
Grupo Jacoby-Bush (2009)	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Sub clase	Sustrato distintivo	Inhibido por AC o TZB	Inhibido por EDTA	Enzimas conocidas
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	n/i	C	Cefalosporinas	No	No	GCI, CMY-37
2 ^a	2 ^a	A	Penicilinas	Si	No	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas 1 ^a gen.	Si	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	Si	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, AHV-10
2ber	n/i	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Si	No	PSE-1, CARB-3
2ce	n/i	A	Carbenicilina, cefepima	Si	No	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
2de	n/i	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	n/i	D	Carbapenemes	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	CepA
2f	2f	A	Carbapenemes	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 ^a	3	B (B1)	Carbapenemes	No	Si	IMP-1, VIM-1, NDM-1, IND1, CcrA
		B (B3)				L1. CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenemes	No	Si	CphA, Sfh1

AC: ácido clavulánico; TZB: tazobactam; n/i: No incluido

2.4 CARBAPENEMES

Los carbapenemes conforman la clase de antibióticos de mayor espectro de acción dentro del grupo de los β -lactámicos. Están conformados por un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico insaturado de 5 carbonos; las diferentes clases de carbapenemes se diferencian por las sustituciones en las posiciones 1 y 2 de este último anillo (Fresnadillo et al. 2010) (Tabla 5).

Tabla 5. Estructura química de los β -lactámicos (Beltran, 2013)

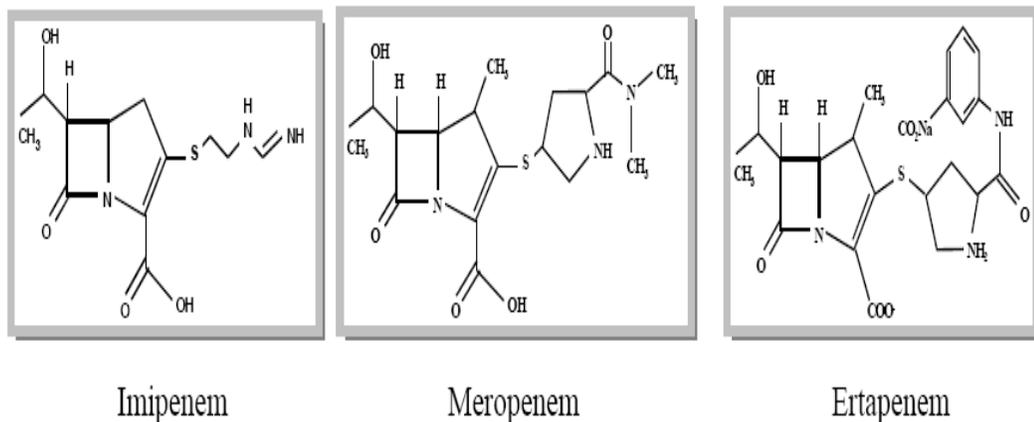
Estructura química		Grupo beta-lactámico (antibiótico representativo)
Anillo beta-lactámico + anillo tiazolidínico		PENICILINAS (Ticarcilina)
Anillo beta-lactámico + anillo dihidrotiacínico		CEFALOSPORINAS (Ceftazidima)
Anillo beta-lactámico + anillo pirrolínico		CARBAPÉNEMICOS (Imipenem)
Anillo beta-lactámico		MONOBACTÁMICOS (Aztreonam)
Anillo beta-lactámico + anillo oxazolidínico		INHIBIDORES (Ácido clavulánico)

Al presentar un amplio espectro de actividad, los carbapenemes constituyen la terapia de elección para pacientes con infecciones graves y nosocomiales, sobre todo si hay posibilidad de que estén producidas por microorganismos resistentes a las

penicilinas y cefalosporinas disponibles multiresistentes. Pueden utilizarse como tratamiento empírico en pacientes neutropénicos febriles, en bacteriemias y septicemias de origen desconocido, en infecciones intraabdominales, en neumonías nosocomiales, en meningitis (frente a bacilos Gram negativos resistentes a otros antimicrobianos), en infecciones de tejido blando y osteoarticulares, en infecciones graves y complicadas del tracto urinario (Casellas, 2011).

Actúan como cualquier otro β -lactámico; durante la última etapa de la transpeptidación de la pared bacteriana ocurre el entrecruzamiento de los pentapeptidos asociados a las moléculas de N-acetil murámico del petidoglicano, llevado a cabo por las proteínas de unión a la penicilina o PBPs (*penicillin-bindingproteins*). Los carbapenemes logran unirse covalentemente a las PBPs, lo que causa su inhibición provocando el debilitamiento en la pared celular, permitiendo su consecuente muerte por lisis osmótica. Debido a su bajo peso molecular y su estructura hidrofílica penetran a las bacterias Gram negativas a través de porinas (Papa, 2015).

Ilustración 1. Estructura química de los principales carbapenemes (Papa, 2014)



Los carbapenemes son activos frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Corynebacterium*spp., *Bacillus* spp.), frente a bacterias Gram negativas (*Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *enterobacterias*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Haemophilus*spp., *Brucella*., *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*) y bacterias anaerobias. Los tipos de carbapenemes más utilizados son el imipenem y

meropenem, en el caso del ertapenem, *P. aeruginosa* presenta una resistencia intrínseca al antibiótico, por lo que no se utiliza para su tratamiento (Fariñas y Martínez, 2013; Casellas, 2011).

2.5 CARBAPENEMASAS

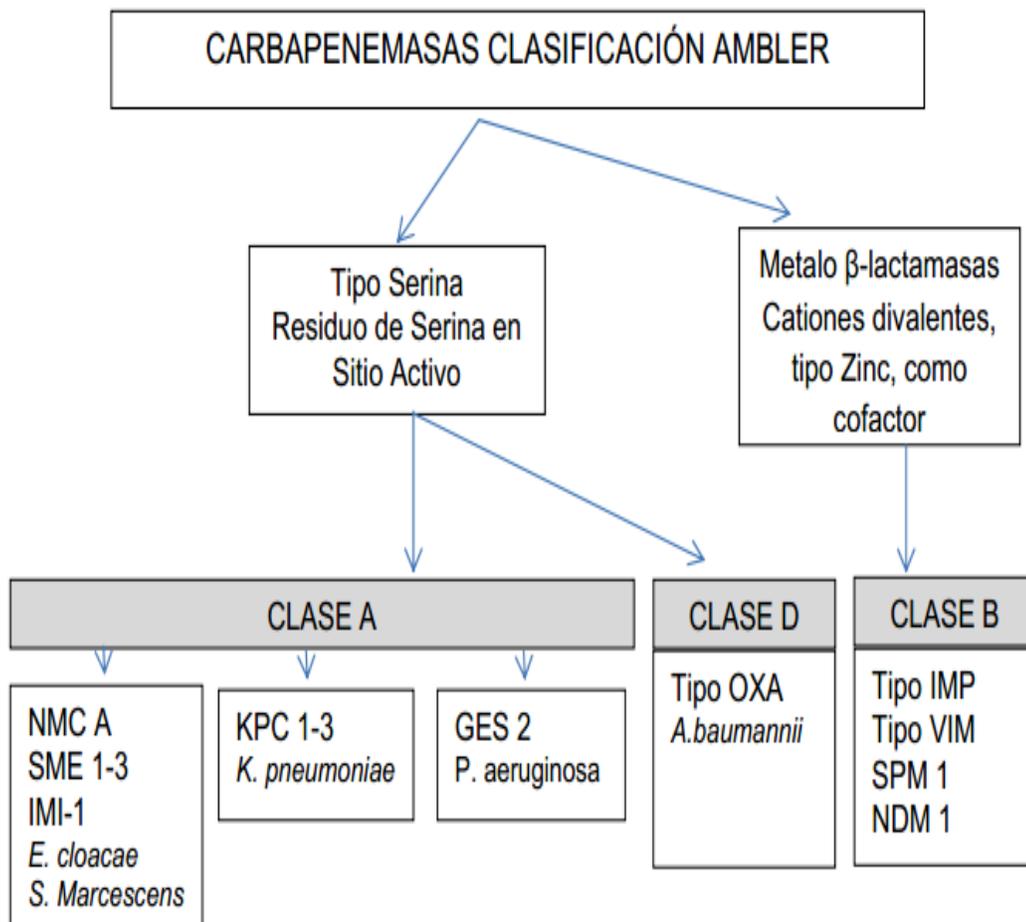
La producción de β -lactamasas tipo carbapenemasas es un mecanismo de resistencia de gran importancia en bacilos Gram negativos, observándose que los aislamientos productores en general resultan resistentes no sólo a imipenem y meropenem, sino también a otros antibióticos β -lactámicos que se utilizan para el tratamiento antimicrobiano (Gonzales, 2011). Además presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles. Estas enzimas, codificadas por genes que en su mayoría están localizados en elementos genéticos tales como los integrones o insertados en elementos móviles como transposones y plásmidos, se han extendido rápidamente entre los agentes patógenos de importancia clínica, como Enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Rojas, 2011).

Se ha propuesto una clasificación en dos grupos: las que pertenecen a la clase molecular A y D de Ambler, que poseen un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual se han denominado *serincarbapenemasas*. Y las carbapenemasas que corresponden a la clase B de Ambler, que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática; estas últimas son denominadas *Métalo- β -lactamasas*, quienes serán descritas con mayor detalle más adelante. Ambos grupos difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores (Moreno, 2013).

Las serincarbapenemasas de clase A, incluye a la variante KPC asociada a Enterobacterias y a las variantes GES halladas fundamentalmente en *P. aeruginosa*. Estas enzimas son inhibibles de forma variable por agentes como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam; además presentan un perfil de hidrólisis amplio que incluye a todos los β -lactámicos. Las serincarbapenemasas de clase D representan un grupo extremadamente heterogéneo de enzimas, dentro de las cuales algunas presentan

actividad carbapenemasa, tal es el caso de las derivadas de OXA-23, OXA-24, OXA-51 y OXA-58, predominantes en Gram negativos no fermentadores (Chinchilla, Tomas y Morales, 2013).

Ilustración 2. Clasificación de las carbapenemasas según Ambler. (Suarez *et al.* 2010).



2.6 MÉTALO-β-LACTAMASAS O MBLS

Las MBLs fueron descritas en la década de los 80, siendo el primer reporte en una cepa de *P. aeruginosa* en Japón en 1988, y en los últimos 30 años se transformaron en un problema global debido a su diseminación en los bacilos Gram negativos de mayor importancia clínica (Abarca *et al.* 2001).

Presentan un espectro de acción hidrolítico muy amplio, hidrolizan a todos los antibióticos β -lactámicos, como penicilinas, cefalosporinas y a los carbapenemes. Pero a diferencia de las carbapenemasas de clase A, no hidrolizan monobactames y tampoco son inhibibles por inhibidores convencionales de β -lactamasas (Nicolau, 2010).

Estas enzimas necesitan de un cofactor metálico divalente para activarse, como el zinc, por lo que son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiamino tetra acético) y el SMA (mercaptoacetato de sodio) (Méndez, 2013).

Según la clasificación de Buch, Jacob y Medeiros las MBLs se ubican en el grupo 3^a, 3b y 3c; según Ambler en la clase molecular B (Bush *et al.* 2011) (Tabla 2).

Las MBLs pueden ser producidas naturalmente por algunos microorganismos encontrados en el medio ambiente y por algunos patógenos oportunistas como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromona ssp.*, y *Elizabethkingia meningoseptica*, estas MBL reciben la denominación de metalo- β -lactamasas intrínsecas o cromosómicas; fue una MBL de este tipo la primera descubierta en un aislado de *Bacillus cereus* en 1966 en Japón. Como eran producidas cromosómicamente, estas MBL no tenían mucha importancia clínica dado que solo eran asociadas con infecciones oportunistas. En 1999 se observó por primera vez, en un aislado de *Bacteroides fragilis*, mediante la caracterización del gen *cfiA*, que se trataba de una MBL adquirida mediada por elementos genéticos móviles (Yamazoe *et al.* 1999). Desde entonces inúmeras MBLs adquiridas o móviles fueron identificadas en varios patógenos clínicamente importantes, como bacilos Gram negativos no fermentadores y algunas Enterobacterias (Ingold *et al.* 2011).

Las MBLs adquiridas son codificadas por elementos genéticos móviles, los que pueden ser transferidos de un microorganismo a otro, facilitando su diseminación. Los tipos IMP, VIM y NDM son las variantes de MBLs más diseminadas, con diferentes variantes más distribuidas y otras más restringidas estas variantes aunque posean baja homología en sus aminoácidos (30%) tienen propiedades muy similares (Figueiredo, 2013). Los genes que transcriben estas enzimas son transferibles, la mayoría se encuentra en genes *cassettes* localizados dentro de integrones tipo 1 en ocasiones en plásmidos y transposones. Al estar relacionados con integrones, los genes de los MBL

están asociados con otros genes de resistencia ubicadas en los mismos genes casetes lo cual permite tener resistencia a múltiples antibióticos. (Walsh *et al.* 2005).

2.6.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS MBLs

Las β -lactamasas inactivan los antimicrobianos a través de la hidrólisis del enlace C-N del anillo β -lactámico (Ilustración 2). Este mecanismo de hidrólisis difiere entre las serina- β -lactamasas y la metalo- β -lactamasas. Las MBL poseen diferentes aminoácidos que definen la estructura de su sitio activo el cual es coordinado por lo menos uno o dos iones zinc, que a su vez, coordinan dos moléculas de ataque que sirven como nucleófilos e hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico (Guido, 2010). Las MBLs poseen una secuencia HXHXD (histidina-X-histidina-X-ácido aspártico) que facilita la coordinación de los iones zinc en el sitio activo (Walsh *et al.* 2005). Este mecanismo es complejo y varía en algunas etapas de una MBL a otra, por este motivo no está completamente aclarado a pesar de haberse dilucidado la estructura tridimensional de algunas MBLs (Concha *et al.* 1996).

Ilustración 3. Sitio de ataque de las β -lactamasas sobre el anillo β -lactámico (Guido, 2010)



Las MBL tienen un sitio activo de amplio encaje que puede acomodar diferentes sustratos β -lactámicos, lo que facilita mucho su espectro de actividad. Por lo que la elucidación de la estructura tridimensional y la comprensión de los mecanismos de hidrólisis son herramientas útiles para el desarrollo de nuevos antibacterianos o inhibidores efectivos clínicamente capaces de inhibir estas enzimas para proteger la

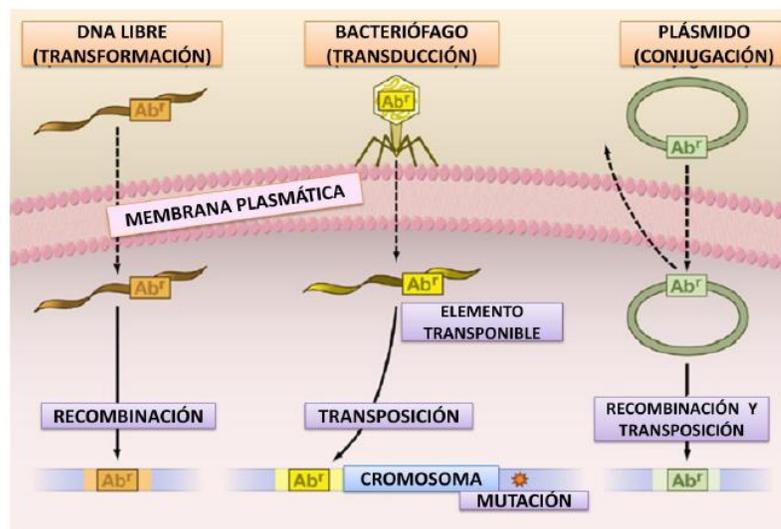
actividad de antibacterianos de amplio espectro como los carbapenemes (Garau *et al.* 2005).

2.6.2 CONTEXTO GENÉTICO DE LAS MBL – INTEGRONES

La capacidad de diseminación de los genes codificantes de MBL adquiridos entre bacterias de una misma especie, género o incluso entre géneros diferentes, se debe principalmente a eventos de transferencia horizontal, mediados por su asociación a elementos genéticos capaces de movilizar genes, como los integrones los cuales a su vez son capaces de asociarse a plásmidos o transposones (elementos genéticos móviles) que promueven su diseminación intra e interespecie (Gonzales *et al.* 2004).

La transferencia de estos elementos entre diferentes bacterias puede ocurrir por conjugación, transformación o transducción (ilustración 5), procesos básicos de transferencia de genes entre bacterias. Si bien era conocido el rol de plásmidos y transposones en la multirresistencia de las bacterias a los antibióticos y en la diseminación natural de los determinantes de resistencia, desde la década pasada se está estudiando la participación de los *cassettes* genéticos de resistencia y de los integrones en el proceso evolutivo de los plásmidos de resistencia (Felipe, 2010).

Ilustración 4. Transferencia horizontal: Adquisición de nuevo material genético mediante conjugación, transducción y/o transformación. (Aleksun y Levi, 2007).

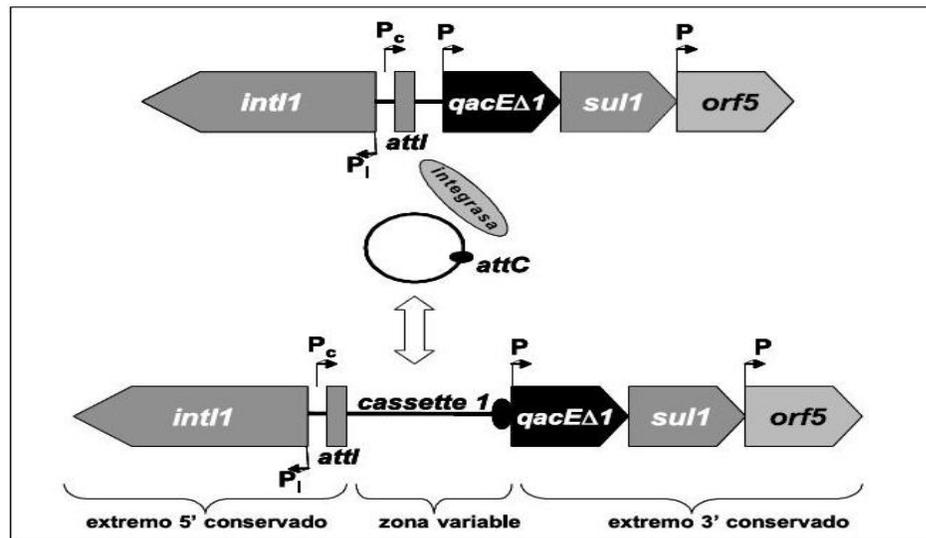


Los elementos genéticos móviles, como los transposones o plásmidos, que contienen los integrones, son la mayor fuente para la diseminación de los genes de MBLs. Estos genes frecuentemente son acompañados por diferentes genes que otorgan resistencia a otros antimicrobianos (Rojas, 2009).

Los integrones son plataformas de ADN capaces de incorporar genes en forma de *cassettes* (sistemas de recombinación génica en bacterias, en que se ensamblan varios genes detrás de un mismo promotor) mediante eventos de recombinación sitio-específica, mediados por una integrasa que ellos mismos codifican. De acuerdo a la secuencia de su integrasa, se clasifican en clases 1, 2 y 3. Es conocido que las MBLs son codificadas en su mayoría en *cassettes* génicos en integrones de clase 1 en que la resistencia a un antibiótico depende de la posición del *cassette* con respecto al promotor común del integrón. Así los *cassettes* ubicados más cerca del promotor tendrán una mayor expresión y por lo tanto mayores niveles de resistencia (Pérez *et al.* 2008).

La estructura mínima de un integrón incluye: el gen para la integrasa (*intI*), un sitio adyacente de recombinación (*attI*), y al menos un promotor (*Pc*), orientado para la expresión de los genes capturados. El gen *intI* contiene su propio promotor y, en general, se expresa en forma divergente a los genes capturados (Ilustración 6). La integrasa, que pertenece a la familia de las tirosina-recombinasas, es la que cataliza la recombinación entre las secuencias específicas. Es por ello que las bacterias que poseen integrones tienen la posibilidad de incorporar genes que se encuentran en el citoplasma bacteriano bajo la forma de genes en casete. Estos genes en casete no son parte necesaria de los integrones, pero forman parte de ellos una vez que han sido integrados. De esta manera, los integrones pueden adquirir nuevos determinantes, por ejemplo, de virulencia, de resistencia a antibióticos, nuevas funciones metabólicas, etc., lo cual brinda a la bacteria hospedadora una amplia versatilidad para adaptarse a nuevas condiciones de supervivencia (González *et al.* 2004).

Ilustración 5. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. (Gonzales *et al.* 2004).



En la mayoría de los integrones clase I descritos existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que codifican resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, a sulfonamidas y a una proteína con función desconocida. Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de *cassettes* genéticos de resistencia. Las otras clases de integrones relacionadas con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o delección de algunos genes o secuencias de inserción (Conza y Gutkind, 2010).

2.6.3 EPIDEMIOLOGIA DE LAS MBLs

La aparición de MBLs mediadores de resistencia en varios patógenos ha sido responsable por varios brotes nosocomiales en diferentes partes del mundo, demostrando la necesidad de prácticas apropiadas en el control de la infección. El aumento de interés en las MBLs no está acompañado por robustos datos epidemiológicos, esto por causa que la identificación molecular de MBLs no se realiza a menudo en estudios a larga

escala, y por causa que los denominadores a menudo faltan, la información epidemiológica no está disponible (Estepa, 2014).

Cuando la información está disponible, ellos parecen mostrar que los patrones epidemiológicos son específicos de cada región. Varios factores, incluyendo el uso local de los antibióticos y la práctica hospitalaria, podría en para contribuir con esas diferencias (Nuñez, 2009).

2.6.3.1 MÉTALO- β -LACTAMASA TIPO IMP

En 1988, la MBL tipo Imipenemase o IMP, fue descubierta en un aislado de *P. aeruginosa* (cepa GN17203) en Japón; el aislamiento poseía resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido y a ceftazidima. Después de esto, fue identificada en distintas especies diferentes sugiriendo una transferencia horizontal del *gen bla*_{IMP-1} entre especies de Gram negativos sin relación aparente, como especies del género *Acinetobacter*. A pesar que las MBLs del tipo IMP se dividen en distintos subgrupos, el porcentaje de similitud aminoacídica entre estos es superior al 90% mostrando también una actividad hidrolítica muy similar entre ellos. Los genes de las IMP se hallan en forma de *cassettes* en integrones plasmídicos, principalmente de clase 1 (Walsh *et al.* 2005).

IMP se ha descrito en *P. aeruginosa*, *Enterobacterias* y *A. baumannii*, y con menor frecuencia en otros bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas mendocina*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Aereomonas caviae*, y también en *Serratia marcescens* (Cornaglia *et al.* 2011).

Actualmente 33 de las 51 variantes de IMP conocidas fueron identificadas en *P. aeruginosa*, incluyendo la reciente descubierta de IMP-8 en aislados reportados en Alemania. Destaca, por su rareza, el hallazgo de IMP-8 en *P. mendocina*, así como la presencia de IMP-1 en *P. putida* y *P. fluorescens*, IMP-12 en *P. putida*, IMP-19 en *P. putida* e IMP-22 en *P. fluorescens* (además de en *P. aeruginosa*). El resto de variantes fueron detectadas principalmente en *P. aeruginosa* (Hong *et al.* 2015).

Era una creencia que los genes móviles de MBLs eran un problema distante de Japón. Sin embargo hasta hoy se han reportado variantes de IMP en prácticamente todo el mundo, aunque con una mayor predominancia por la región del sudeste asiático-Pacífico (Gómez, 2011); en la tabla 6 se muestra los primeros reportes sobre hallazgo de las variantes de IMP reportados hasta la fecha.

En la tabla 6 se muestran los primeros hallazgos reportados de las variantes del genotipo IMP, además de indicar el país de origen y la especie reportada.

Tabla 6. Reportes de MBLs tipo IMP (Hong et al. 2015)

IMP-1		IMP-16	
Japón	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil	<i>P. aeruginosa</i>
	Enterobacterias	IMP-18	
	<i>A. baumannii</i>	USA	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>Acinetobacter xylosoxidans</i>	IMP-19	
	<i>Pseudomonas putida</i>	Francia	<i>Aeromonas caviae</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IMP-20	
IMP-2		Japón	<i>P. aeruginosa</i>
Italia	<i>A. baumannii</i>	IMP-21	
Japón	<i>P. aeruginosa</i>	Japón	<i>P. aeruginosa</i>
IMP-3		IMP-22	
Japón	Enterobacterias	Austria	<i>P. aeruginosa</i>
IMP-4		IMP-24	
China	<i>A.baumannii</i>	Taiwán	Enterobacterias
	Enterobacterias	IMP-25	
IMP-5		China	<i>P. aeruginosa</i>
Portugal	<i>A. baumannii</i>	IMP-26	
IMP-6		Singapur	<i>P. aeruginosa</i>
Japón	Enterobacterias	IMP-29	
	<i>P. aeruginosa</i>	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
IMP-7		IMP-30	
Canadá	<i>P. aeruginosa</i>	Rusia	<i>P. aeruginosa</i>

Tabla 6. (Continuación) Reportes de MBLs tipo IMP (Hong *et al.* 2015)

IMP-8		IMP-31	
Taiwán	Enterobacterias	Alemania	<i>P. aeruginosa</i>
China	<i>A. baumannii</i>	IMP-33	
Portugal	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Italia	<i>P. aeruginosa</i>
IMP-9		IMP-35	
China	<i>P. aeruginosa</i>	Alemania	<i>P. aeruginosa</i>
IMP-10		IMP-37	
Japón	<i>P. aeruginosa</i>	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>A. xylooxidans</i>	IMP-40	
	<i>A. baumannii</i>	Japón	<i>P. aeruginosa</i>
IMP-11		IMP-41	
Japón	Enterobacterias	Japón	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>P. aeruginosa</i>	IMP-43	
IMP-12		Japón	<i>P. aeruginosa</i>
Italia	<i>Pseudomonas putida</i>	IMP-44	
IMP-13		Japón	<i>P. aeruginosa</i>
Italia	<i>P. aeruginosa</i>	IMP-45	
IMP-14		China	<i>P. aeruginosa</i>
Tailandia	<i>P. aeruginosa</i>	IMP-48	
IMP-15		USA	<i>P. aeruginosa</i>
México	<i>P. aeruginosa</i>		

2.6.3.2 MÉTALO- β -LACTAMASA TIPO VIM

Las MBLs del tipo *Verona Integron encoded Metallo- β -lactamase* o VIM, presentan el mismo espectro hidrolítico que las enzimas de tipo IMP, con una diferencia menor al 40% en relación a la secuencia de aminoácidos entre ambos. La primera variante descubierta, la VIM-1, fue reportada en Verona-Italia la cual procedía de un aislamiento de *P. aeruginosa*. Este aislamiento clínico, obtenido en 1997, presentó resistencia a varios β -lactámicos, incluyendo piperacilina, ceftazidima, imipenem y aztreonam; además el integrón que contenía al gen *bla_{VIM-1}* estaba probablemente localizado en un cromosoma, aunque lo más habitual es la presencia de estos genes en forma de casetes en integrones de clase 1 (Bebrone, 2007).

Las enzimas VIM actualmente se encuentran ampliamente diseminadas en distintos microorganismos, existiendo reportes tanto en *P. aeruginosa* como en enterobacterias, siendo más frecuente en la primera; también hay reportes de su hallazgo en *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *A. baumannii*, *A. xylosoxidans*, *S. marcescens* y *Aeromonas hydrophila* (Nordmann y Poirel, 2002).

En la actualidad la variante VIM-2 es la más diseminada, principalmente en *P. aeruginosa* que es la fuente de múltiples brotes que surgen por todo el mundo. 26 de las 46 variantes de VIM, incluyendo la variante VIM-43 hallada en USA, fueron identificadas en *P. aeruginosa* (Ingold *et al.* 2011)

De las 46 variantes conocidas hasta la fecha, las VIM-1, -2, -4 y -6 se han detectado en *P. aeruginosa* y *P. putida*. Del resto de VIM, han sido detectadas en su mayoría en *P. aeruginosa*, solamente ciertas variantes se reportaron en otras especies no pseudomonadales, como ser: VIM-12, un híbrido entre VIM-1 y VIM-2, que se ha detectado en enterobacterias; VIM-19, sólo hallada en *K. pneumoniae*, y VIM-23, en *E. cloacae* (Hong *et al.* 2015).

En la tabla 6 se muestran los primeros hallazgos reportados de las variantes del genotipo VIM, además de indicar el país de origen y la especie reportada.

Tabla 7. Reportes de MBLs tipo VIM (Hong et al. 2015)

Tipo VIM	Microorganismo
VIM-1	
Italia	<i>P. aeruginosa</i>
Francia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Grecia	<i>A. baumannii</i>
VIM-2	
Francia	<i>P. aeruginosa</i>
Corea del Sur	<i>A. baumannii</i>
Taiwán	<i>Enterobacteriaceae</i>
Grecia	<i>A. xylosoxidans</i>
VIM-3	
Taiwan	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
VIM-4	
Grecia	<i>P. aeruginosa</i>
Italia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Hungría	<i>Aeromonashydrophila</i>
Grecia	<i>A. baumannii</i>
VIM-5	
Turquia	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>
VIM-6	
Singapur	<i>P. putida</i>
VIM-7	
USA	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-8	
Colombia	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-9	
Reino Unido	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-10	
Reino Unido	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-11	
Argentina	<i>P. aeruginosa</i>
Taiwán	<i>A. baumannii</i>
VIM-12	
Grecia	<i>Enterobacteriaceae</i>

Tabla 7. (Continuación) Reportes de MBLs tipo VIM (Hong *et al.* 2015)

VIM-13	
España	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-14	
Italia	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-15	
Bulgaria	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-16	
Alemania	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-17	
Grecia	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-18	
India	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-19	
Algeria	<i>Enterobacteriaceae</i>
VIM-20	
España	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-23	
Mexico	<i>Enterobacteriaceae</i>
VIM-24	
Colombia	<i>Enterobacteriaceae</i>
VIM-25	
India	<i>Enterobacteriaceae</i>
VIM-28	
Egipto	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-30	
Francia	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-36	
Bélgica	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-37	
Polonia	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-38	
Turquía	<i>P. aeruginosa</i>
VIM-43	
USA	<i>P. aeruginosa</i>

2.6.3.3 MÉTALO- β -LACTAMASA TIPO NDM

Desde finales de los años 2000, se documentó a nivel mundial la circulación de microorganismos con un mecanismo de resistencia antimicrobiana del tipo MBL denominado *New Delhi Metalobetalactamasa* o NDM, esta variante se aisló por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* recuperadas de un paciente que previamente estaba internado en un hospital de Nueva Delhi en la India el 2009; los aislamientos presentaron resistencia a todos los antibióticos β -láctamicos excepto aztreonam (OPS, 2012).

Desde entonces, seis variantes de NDM fueron identificados en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *E. coli*. Cepas de *P. aeruginosa* productora de NDM-1 fueron reportadas en 2011, en Serbia. En 2012, cepas del mismo tipo fueron aislados en Francia, de un paciente que había sido hospitalizado en Serbia. Aislamientos de este tipo han sido reportados alrededor de todo el mundo incluyendo India, Italia, Egipto y Eslovaquia (Chinchilla, Tomas y Morales, 2013).

Actualmente la variante NDM-1 predomina en enterobacterias, la cual se ha reportado ampliamente por Asia (fundamentalmente India y países cercanos), reportándose en Europa (donde se halló en *A. baumannii*), Oceanía, África, Norteamérica y América del sur (Seija *et al.* 2015).

En 2011 la NDM-1 fue detectada en Guatemala en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y la investigación realizada no determinó conexión con viajes o viajeros internacionales. En junio de 2012, Uruguay informó sobre tres pacientes hospitalizados por una infección causada por *Providencia rettgeri* portadora de carbapenemasa del tipo NDM-1. Los tres pacientes no desarrollaron signos o síntomas de infección por este agente y fueron dados de alta. En agosto de 2012, se reportó un brote de *K. pneumoniae* en seis pacientes hospitalizados en Bogotá, Colombia. En noviembre de 2012, Paraguay notificó sobre el hallazgo de carbapenemasas del tipo NDM-1 en aislamientos de *A. baumannii* en pacientes hospitalizados. En ninguno de estos eventos se registró antecedentes de viajes recientes al exterior, ni de los pacientes, ni de familiares directos (Estepa, 2014).

En la tabla 8 se muestran los primeros hallazgos reportados de las variantes del genotipo NDM, además de indicar el país de origen y la especie reportada.

Tabla 8. Reportes de MBLs NDM-1 (Cornaglia et al. 2015)

Tipo MBL	Microorganismo
NDM-1	
India	<i>Enterobacteriaceae</i>
India	<i>A. baumannii</i>
Canadá	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Guatemala	<i>K. pneumoniae</i>
Uruguay	<i>Providencia rettgeri</i>
Colombia	<i>K. pneumoniae</i>
Paraguay	<i>A. baumannii</i>

2.6.3.4 OTROS GENOTIPOS DE MÉTALO- β -LACTAMASAS

Hasta el momento se han descrito doce genotipos diferentes de MBLs adquiridas, excluyendo las MBLs ya mencionadas, el resto tienen un solo representante cada uno, además tienen una distribución geográfica mucho más restringida, y sólo en el caso de SPM-1 se han detectado brotes por cepas portadoras. La identificación de SPM-1 (*Sao Paulo metallo- β -lactamase*) se realizó en un aislado clínico de *P. aeruginosa* en 2001. Esta MBL presentó localización plasmídica, aunque no relacionada con integrones o elementos móviles, y un porcentaje de similitud en aminoácidos del 35% con IMP-1. Hoy en día, esta MBL está ampliamente diseminada en Brasil, y recientemente se ha detectado el primer caso en Europa (Papa, 2015).

GIM-1 o *German Imipenemase* se detectó en Alemania, en diferentes aislados clínicos de *P. aeruginosa*, presentando una identidad aminoacídica próxima al 40% con respecto a las MBL tipo IMP. En cuanto a sus características de hidrólisis de β -lactámicos, GIM-1 mostró una menor actividad, en general, que el resto de MBL clínicamente relevantes (Cornaglia et al. 2011).

Seoul Imipenemase o SIM-1 se ha detectado únicamente en *A. baumannii* en Corea, y presenta un 69% de identidad en aminoácidos con respecto al genotipo IMP (Cornaglia *et al.* 2011).

FIM-1 o *Florence imipenemase* fue descubierta el 2012 en aislamiento clínico de *P. aeruginosa* en Italia. Esta nueva variante tiene una similitud de 40% en la secuencia de aminoácidos con el genotipo NDM, además de una actividad hidrolítica específica hacia las penicilinas y los carbapenemes (Hong *et al.* 2015)

Las MBL AIM-1 (*Adelaine Imipenemase*) y DIM-1 (*Dutch Imipenemase*) se han detectado en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, en Australia y Holanda, respectivamente, pero la información disponible acerca de ellas todavía es muy escasa. La MBL KHM-1 (cuyo nombre proviene de la cepa de *Citrobacter freundii* donde fue descubierta, la KHM243) se ha detectó en *C. freundii* y Enterobacterias en Japón, y presenta una moderada actividad sobre los carbapenemes, presentando una acción mayor sobre las cefalosporinas (Salabi *et al.* 2012).

Para finalizar, tenemos a los genotipos: SMB (*Serratia metallo- β -lactamase*) detectada en *S. marcescens* en Japón y TMB (*Tripoli metallo- β -lactamase*) detectada en *A. xylosoxidans* en Libia. (Wachino *et al.* 2012).

2.6.4 DETECCIÓN DE MBLs

La diseminación de genes que codifican las MBLs representa una importante amenaza para la terapia antimicrobiana con β -lactámicos, por lo tanto, la identificación de bacterias productoras de MBLs por el laboratorio de bacteriología es necesaria para evitar la diseminación de estos genes de resistencia y auxiliar en la elección de la terapia antimicrobiana adecuada. (Pitout *et al.* 2005).

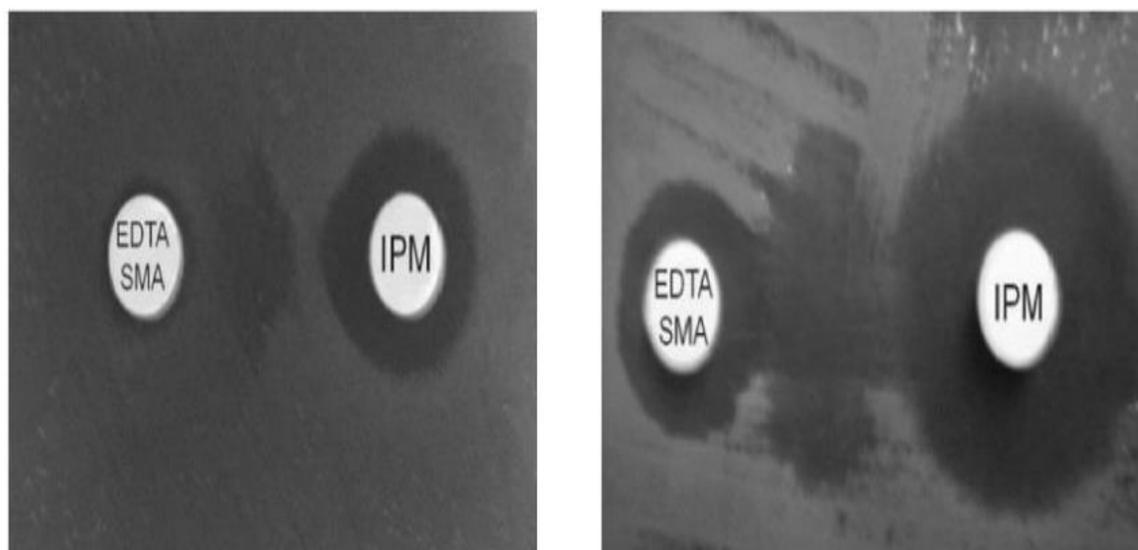
Con el aumento de reportes sobre cepas productoras de MBLs se desarrollaron distintas metodologías para la detección de estas cepas. Las pruebas genotípicas son las más seguras y eficaces para la detección de estas enzimas, los laboratorios bacteriológicos utilizan técnicas que exploran las características fenotípicas de las cepas productoras de MBLs para su identificación (Nicolau y Oliver, 2008).

2.6.4.1 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MBLs

Aprovechando el hecho de que las MBLs necesitan como cofactor a iones metálicos como el Zn^{+2} para su funcionamiento y son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA, varias técnicas fenotípicas fueron desarrolladas con el auxilio de este agente (Rojas, 2009).

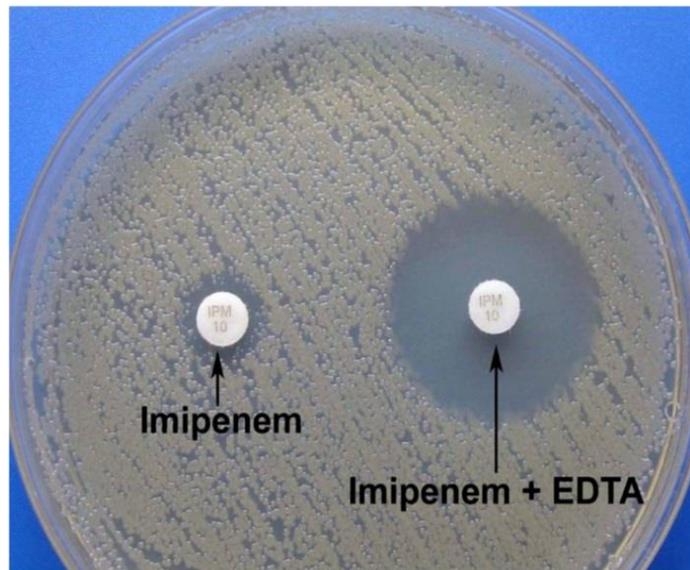
La técnica más conocida es el test de sinergia por aproximación de discos, esta prueba se realiza en una placa de agar Müeller-Hinton (MH) sembrada con un inóculo estandarizado de la cepa sospechosa, donde se coloca un disco de EDTA, que actuará como inhibidor de MBL, y a cada lado un disco de imipenem (IMI) y uno de ceftazidina (CAZ) respectivamente (Perozo *et al.* 2013). Luego de la incubación, la prueba se considerará positiva cuando se observe una ampliación o distorsión (efecto sinérgico) entre los discos de los antibióticos y el disco de EDTA (Foto 1). (Perozo *et al.* 2013).

Fotografía 1. Resultado positivo para la presencia de MBLs en el test de sinergia por aproximación de discos (Perozo et al. 2013)



Otra técnica basada en el uso del EDTA, es el método de disco combinado con EDTA, que a diferencia del método de sinergia por aproximación, en este se utiliza dos discos de antimicrobianos y uno de ellos adicionalmente posee EDTA (Fotografía 2). Para su interpretación, se comparan los tamaños de los halos de inhibición entre los discos, y en el caso de existir una diferencia entre ambos, se consideraba que la cepa era productora de MBL (Zanol, Olrich y Morsch, 2008).

Fotografía 2. Resultado positivo para la presencia de MBLs en la prueba de disco combinado (Bora *et al.* 2014)



También debe mencionarse el método E-test-MBL® que utiliza tiras enumeradas de material plástico, que a un lado contiene IMI impregnado, mientras que en el otro extremo posee una combinación de IMI y EDTA; la prueba se interpreta mediante una relación de los valores de inhibición en ambos extremos de la tira (Fotografía 3) (Nordmann *et al.* 2011).

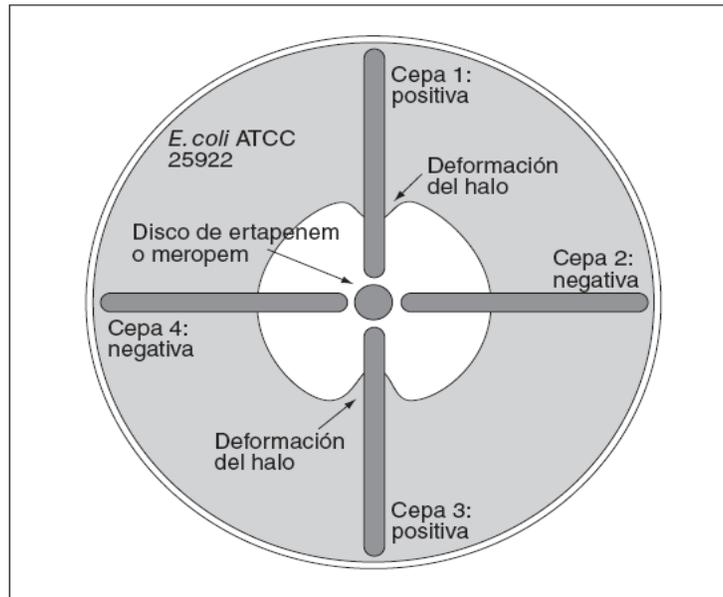
Fotografía 3. Detección de MBLs mediante la prueba de E-test-MBL® (Rojas, 2009)



Al margen de las técnicas basadas en las propiedades del EDTA, el método modificado de Hodge, es considerado una prueba bastante sensible para la detección de MBL (Perozo *et al.*, 2013).

La prueba se realiza en la superficie de una placa de agar MH, sembrada con un inóculo estándar de *E. coli* ATCC 25922, luego se coloca un disco de un carbapenem en el centro de la placa, para finalmente realizar una estría desde el borde del disco hacia la periferia de la placa para cada cepa sospechosa de la producción de carbapenemasas. Luego de la incubación, la presencia de una zona de distorsión del halo de inhibición alrededor de la estría del microorganismo se interpreta como positiva para la producción de MBL por este método (Ilustración 7) (Saavedra *et al.* 2014).

Ilustración 6. Esquema de interpretación del método de Hodge modificado para la detección de MBLs (Gómez, 2011)



2.6.4.5 DETECCIÓN GENOTÍPICA DE PRODUCTORES DE MBLs

El control epidemiológico de los microorganismos productores de MBLs, requiere la determinación de la fuente y prevalencia del microorganismo en el ambiente hospitalario. Para ello se puede recurrir a diversas técnicas basadas en rasgos genotípicos de la bacteria. En la actualidad es conocido que las técnicas moleculares basadas en el genoma poseen una sensibilidad superior a las técnicas fenotípicas debido a su alto poder discriminatorio. Entre estas técnicas se conoce a: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también conocido como PCR convencional o de punto final, la PCR de elementos repetitivos (REP-PCR), la electroforesis de campo pulsado (PFGE), *multi locus sequencetying* (MLST), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP y PCR-RFLP), entre otros (Pier y Ramphal, 2010).

Las técnica de amplificación por PCR convencional posee un buen poder de discriminación, es menos laboriosa, más accesible y de menor costo; el método consiste en el diseño de indicadores (primers) que son secuencias de

oligonucleótidos. Estos primers pueden ser desarrollados para hibridizar en regiones específicas de ADN molde, siendo estas amplificadas por la enzima Taq polimerasa, generando un producto denominado amplicón. Este producto es visualizado en gel de agarosa después de ser sometido a electroforesis (Gonzales, 2011). La confirmación mediante el PCR además permite definir el tipo de MBLs y los posibles mecanismos participantes en la diseminación de la resistencia. (Diaz, 2008).

Para el presente estudio, se utilizó la técnica de PCR convencional para la caracterización genética de las cepas estudiadas.

C. MARCO CONCEPTUAL

1. CARBAPENEMES

Son los antimicrobianos β -lactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las β -lactamasas. Estas cualidades hacen que sean imprescindibles en el tratamiento empírico donde se sospecha de un patógeno multirresistente, en la monoterapia de numerosas infecciones nosocomiales graves y en la terapia dirigida contra las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes o productoras de β -lactamasas de amplio espectro y espectro extendido. En particular el Imipenem y el Meropenem, son en muchos casos la única opción terapéutica disponible en lo que se refiere a infecciones de este por estos microorganismos. (Moreno, 2013).

2. MÉTALO-B-LACTAMASAS (MBLs)

Son una clase de enzimas β -lactamasas que tiene una mayor acción hidrolítica sobre los carbapenemes (Papa, 2015).

Las MBLs son enzimas β -lactamasas de clasificación B según Ambler, se caracterizan por tener un sitio activo que necesita un cofactor metálico, comúnmente Zn^{+2} y son inhibidas por quelantes como el EDTA o elmercapto acetato de Sodio. Presentan actividad hidrolítica sobre el anillo betalactamico de penicilinas,

cefalosporinas y carbapenemes pero no hidroliza monobactamicos como el aztreonam. Estas enzimas presentan distintos genotipos, normalmente nombradas según el sitio donde fueron encontrados. (Pitout. 2005)

3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polimerase chain reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada por Mullis en 1986. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular a partir de una única copia de ese fragmento original, o molde (Ruíz, 2007).

III. OPERALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable en estudio	Definición operacional	Medición	Relación
Gen tipo MBL	Gen MBL identificado genotípicamente	IMP, VIM y NDM	Independiente
Especie bacteriana	Cepa de bacilo Gram negativo productor de MBL	<i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>	Independiente
Departamento	Departamento de procedencia de la cepa	Porcentaje	Independiente
Gestión	Año en que la cepa fue aislada	2013 y 2014	Independiente

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

A. TIPO DE ESTUDIO

El estudio será del tipo retrospectivo descriptivo al analizarse cepas que fueron obtenidas en gestiones pasadas y al identificar genotipos circulantes.

B. POBLACION EN ESTUDIO

En este estudio se utilizaron 42 cepas de *A. baumannii* y 26 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de laboratorios y hospitales de la Red de Vigilancia de Patógenos Intrahospitalarios del Ministerio de Salud, que fueron remitidos al INLASA en los años 2013 y 2014 donde fueron descritos fenotípicamente como productores de MBLs.

C. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

1. CRITERIOS DE INCLUSION

Cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* identificadas fenotípicamente en el laboratorio de Bacteriología clínica del INLASA como productoras de enzimas MBLs en los años 2013 y 2014.

2. CRITERIOS DE EXCLUSION

Se excluyó del estudio a cepas de otras especies que no fueran *A. baumannii* y *P. aeruginosa* y que no fueran caracterizadas fenotípicamente en los años 2013 y 2014.

3. CONTROLES

Como control positivo se utilizaron cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* confirmadas genóticamente como portadoras de los genes de MBLs: *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}* y *bla_{NDM-1}* provenientes del Instituto “Dr. Carlos G. Malbrán” remitidas al INLASA.

Las cepas *A. baumannii* 163/13 y *P. aeruginosa* 150/13 identificadas en el INLASA, como no productoras de MBLs, se utilizaron como controles positivos.

4. CONTEXTO Y LUGAR

El estudio se realizó en los ambientes del laboratorio de Bacteriología Clínica y del Centro de Investigación Genético Molecular (CIGMO) del INLASA. Ambos laboratorios cuentan con todos los materiales y equipamiento necesario para la realización del estudio.

5. PROCEDIMIENTO TÉCNICO

5.1 DATOS GENERALES DE LAS CEPAS DE *P. aeruginosa* Y *A. baumannii* UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Las cepas utilizadas provienen de aislamientos clínicos de hospitales y laboratorios de los departamentos de La Paz, Cochabamba, Santa Cruz y Chuquisaca que hacen parte de la Red de Vigilancia de Patógenos Intrahospitalarios. Estas cepas fueron identificadas, mediante pruebas fenotípicas como el test de sinergia por aproximación de discos y el test de Hodge modificado, como productores de MBLs en el laboratorio de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) en los años 2013 y 2014. En las tablas 9 y 10 se puede observar que existe una mayor cantidad de cepas provenientes del departamento de Santa Cruz, también que existe una proporción mayor de cepas de *A. baumannii* y que también existe una mayor cantidad de cepas en el año 2014.

Tabla 9. Número de cepas estudiadas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en relación al departamento de procedencia en el año 2013

	La Paz	Cochabamba	Santa Cruz	Chuquisaca	TOTAL
<i>A. baumannii</i>	5	0	5	9	19
<i>P. aeruginosa</i>	0	1	9	0	10

Fuente propia

Tabla 10. Número de cepas estudiadas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en relación al departamento de procedencia en el año 2014

	La Paz	Cochabamba	Santa Cruz	Chuquisaca	TOTAL
<i>A. baumannii</i>	8	4	10	1	23
<i>P. aeruginosa</i>	2	0	14	0	16

Fuente propia

5.2 RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* utilizadas, se encontraban conservadas a -60°C en medio Skin-milk.

Para su recuperación, se realizó una resiembra de cada una en cajas de Agar nutritivo, luego se incubó las mismas a 37°C durante el periodo de 24 horas. Como se trata de una resiembra a partir de cepas que estaban en crio conservación, algunas no se desarrollaron en 24 horas, necesitando una segunda resiembra para su recuperación.

5.3 OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

Recuperadas las cepas, se tomó una carga de colonias de cada una, luego se depositaron en 100µl de agua estéril dentro de tubos Eppendorf de 1.5ml.

Para extraer el ADN de cada cepa, se utilizó el método de Boiling por microondas (Menon y Nagendra 2001); esta técnica fue utilizada por varios años en el

área de Genética Bacteriana del INLASA para la extracción de ADN de bacterias a partir de cultivos saturados.

La extracción del material genético en sí, se realizó de la siguiente manera: se homogenizó cada tubo eppendorf donde se depositaron las colonias, luego se los llevaron al microondas (marca SAMSUNG® modelo ME6124ST de potencia nominal de 1000 watts) para su exposición por tres periodo de 30 segundos, finalmente se centrifugó los tubos a 10000RPM por 10 minutos.

Terminada la centrifugación se recupera el sobrenadante, donde se encuentra el material genético, y se coloca en un tubo eppendorf nuevo. Para su conservación, se guardó los tubos a -20°C.

5.4 PCR PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES PRODUCTORES DE MBLs

La detección de los *genes* productores de MBLs: *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}* y *bla_{NDM-1}* se realizó en base a los protocolos publicados por el Instituto Dr. Carlos G. Malbrán de Argentina para la detección mediante PCR de los mencionados genes en aislamientos de bacilos Gram negativos (Instituto Malbrán 2011).

Tabla 11. Secuencia de primers para la identificación de MBLs (Ins Malbrán, 2012)

CEBADOR	SECUENCIA 5'- 3'
IMP-UF1	GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA
IMP-UR1	GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT
VIM F	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G
VIM R	ATG AAA GTG CGT GGA GAC
NDM F	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC
NDM R	GGC GTA GTG CTC AGT GTC

Por otra parte, la preparación del master mix es idéntica para cada protocolo, con un volumen final de 25µl por tubo. La cantidad de reactivos está descrita en la tabla 10.

Tabla 12. Concentración de reactivos para del Mix de PCR para la identificación de MBLs (Malbrán 2012)

REACTIVO	VOLUMEN
Tampón 10X	2,5µl
MgCl ₂ (50nM)	0,75µl
dNTPs (10mM)	0,5µl
Taqpol(5U/µl)	0,15µl
Primer Forward (10µM)	0,5µl
Primer Reverse (10µM)	0,5µl
ADN	2,5µl
Agua estéril	17,6µl
TOTAL	25µl

La duración y número de ciclos del PCR de cada protocolo se describen en la tabla 13.

Tabla 13. Tiempos de ciclaje del PCR para identificación de MBLs (Malbrán, 2012)

Nº de ciclos	Ciclo	NDM-1	IMP-1	VIM-1
1	Desnaturalización inicial	94°C por 5'	94°C por 5'	94°C por 5'
35	Desnaturalización	94°C por 30''	94°C por 30''	94°C por 30''
	Hibridación	50°C por 30''	50°C por 30''	57°C por 30''
	Extensión	72°C por 1'	72°C por 1'	72°C por 1'
1	Extensión final	72°C por 10'	72°C por 5'	72°C por 5'

5.5 CORRIDA ELECTROFORÉTICA Y REVELADO DEL GEL

El material amplificado fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2 % a voltaje constante (4 V/cm) en tampón TBE 0,5X y teñido con SybrGreen 1/100 (SIGMA-Aldrich, USA). Los resultados obtenidos fueron observados en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. La presencia del gen bla_{NDM-1} se observa como bandas de 512pb, del gen bla_{IMP-1} como bandas de 404pb y del gen bla_{vim-1} como bandas de 310 pb.

V. RESULTADOS

RESULTADOS DE CEPAS CARACTERIZADAS GENOTÍPICAMENTE COMO PORTADORAS DE LOS GENES *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}* Y *bla_{NDM-1}* EN CEPAS IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014

En la tabla 14 se puede observar los porcentajes de las muestras analizadas que resultaron positivas: 11,8% para *bla_{IMP-1}*, 10,3% para *bla_{NDM-1}* y no se detectó ninguna cepa portadora del gen *bla_{VIM-1}*. En síntesis: 22,1% de las cepas estudiadas fueron caracterizadas como portadoras de un gen MBL.

Tabla 14. Resultados de cepas caracterizadas genotípicamente como portadoras de los genes *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}* y *bla_{NDM-1}* en cepas identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014

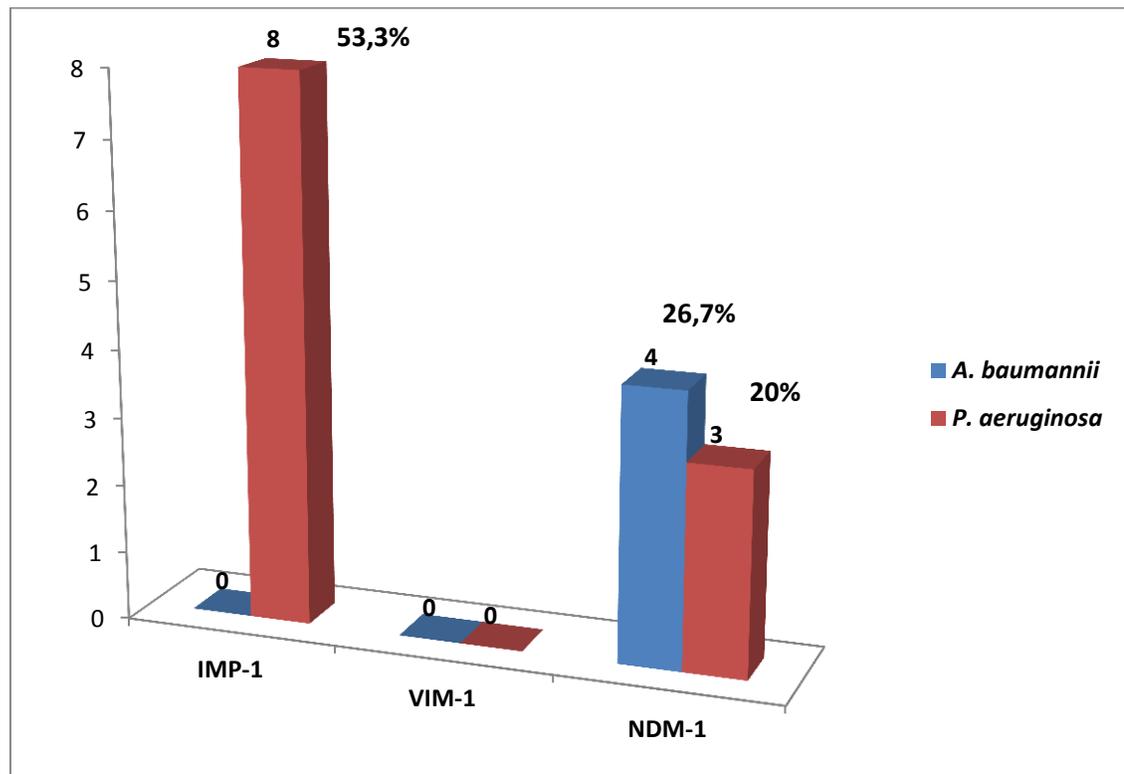
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
<i>IMP-1</i>	8	11,8	11,8
<i>VIM-1</i>	0	0	0
<i>NDM-1</i>	7	10,3	10,3
No identificado	53	77,9	77,9
TOTAL	68	100	100

Fuente propia

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MBLs EN CEPAS DE *P. aeruginosa* Y *A. baumannii* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014, EN RELACIÓN A LA ESPECIE

En este estudio se detectó la presencia del gen *bla*_{IMP-1} en 8 cepas de *P. aeruginosa* (53,3% de las cepas caracterizadas positivamente), se detectó el gen *bla*_{NDM-1} en 3 (20%) cepas de *P. aeruginosa* y en 4 (26,7%) cepas de *A. baumannii*. No se detectó el gen *bla*_{VIM-1} en ninguna cepa.

Gráfico 1. Caracterización genotípica de MBLs en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014, en relación a la especie.



Fuente propia

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MBLs EN CEPAS DE *P. aeruginosa* Y *A. baumannii* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014, EN RELACIÓN AL DEPARTAMENTO DE PROCEDENCIA DE LA CEPA

En este estudio se observó que todas las cepas, que fueron caracterizadas positivamente como portadoras de genes MBLs, provienen del departamento de Santa Cruz, lo que corresponde al 100% de las cepas caracterizadas positivamente.

Tabla 15. Caracterización genética de MBLs en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014, en relación al departamento de procedencia de la cepa

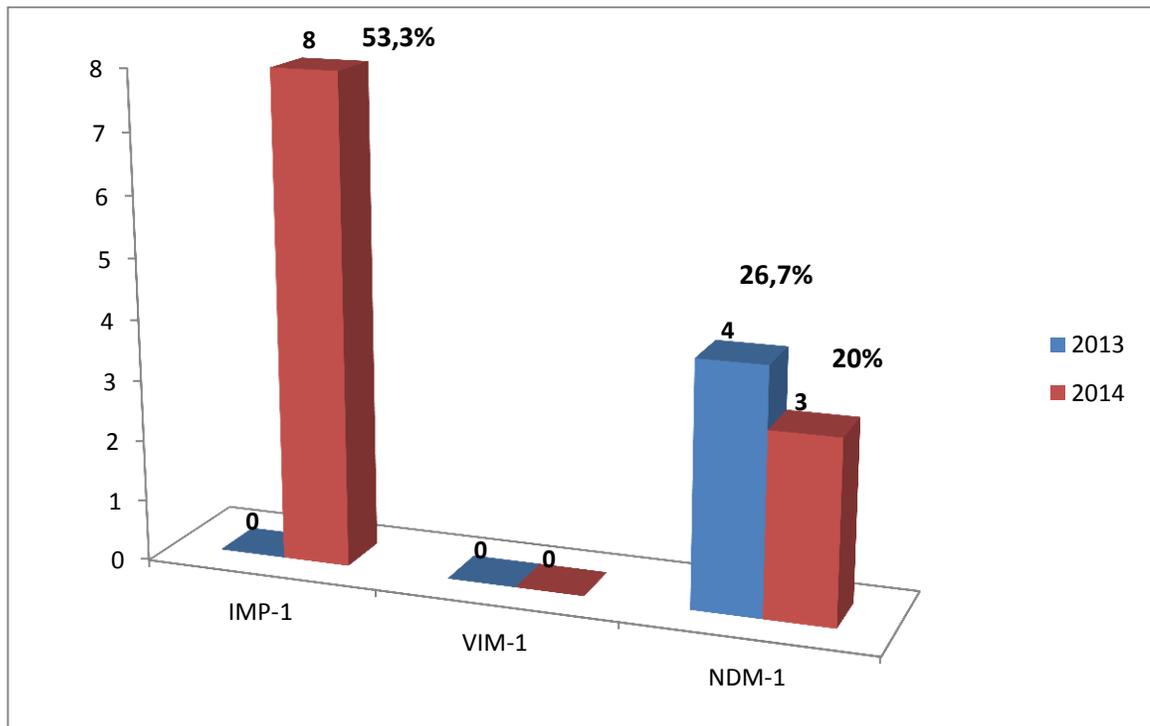
	Cepas portadoras de gen MBLs confirmadas	Porcentaje	Porcentaje valido
La Paz	0	0	0
Cochabamba	0	0	0
Santa Cruz	15	100	100
Chuquisaca	0	0	0
TOTAL	15	100	100

Fuente propia

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MBLs EN CEPAS DE *P. aeruginosa* Y *A. baumannii* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO PRODUCTORAS DE MBLs EN EL INLASA EN EL AÑO 2013 Y 2014, EN RELACIÓN AL AÑO DE AISLAMIENTO DE LA CEPA

En este estudio, en el año 2013 se detectó 4 cepas caracterizadas como portadoras del gen *bla_{NDM-1}*, lo que corresponde al 26,7% del total. Y en el año 2014 se detectó a 11 cepas caracterizadas positivamente como portadoras de los genes *bla_{NDM-1}* y *bla_{IMP-1}*, 73,3% del total.

Gráfico 2. Caracterización genética de MBLs en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* identificadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el INLASA en el año 2013 y 2014, en relación al año de aislamiento de la cepa.



Fuente propia

VI. DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* que presentan resistencia a los carbapenemes, causan gran preocupación a nivel mundial ya que estos microorganismos han emergido como patógenos importantes en los casos de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) dificultando su tratamiento, prolongando la estancia hospitalaria y aumentando la mortalidad. Este cuadro se debe en gran parte a la producción por estos microorganismos de enzimas carbapenemasas del tipo metalo- β -lactamasas (MBLs). Hasta ahora en Bolivia no se contaba con estudios epidemiológicos sobre las MBLs, por tal razón es importante la realización de este trabajo, que busca caracterizar los genotipos circulantes de las MBLs en Bolivia mediante la detección de genes de *bla_{IMP-1}*, *bla_{VIM-1}* y *bla_{NDM-1}* en cepas remitidas al Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) provenientes de los laboratorios pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología (RNLB) de nuestro país.

Se analizó un total de 42 cepas de *A. baumannii* y 26 cepas de *P. aeruginosa* que fueron confirmadas fenotípicamente como productoras de MBLs en el laboratorio de Bacteriología Clínica del INLASA en los años 2013 y 2014.

En relación a los procedimientos técnicos, se optó por seguir los protocolos para la detección de genes del tipo MBL en bacilos Gram negativos publicados el año 2012 por el servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos Malbrán” de Argentina. Esta institución coordina institutos, laboratorios y centros de salud localizados en distintos lugares de América del sur y actúa como centro centinela para la vigilancia, prevención, control e investigación de mecanismos de resistencia de microorganismos.

Para la realización de la corrida electroforética y revelado del gel, se utilizó el protocolo elaborado y utilizado por el Ms. Sc. Dr. Giovanni García Rada, profesional bioquímico del INLASA, que venía trabajando hace varios años en la detección de genes de resistencia en bacterias.

En este trabajo se detectó un porcentaje significativo (22,1 % del total de cepas analizadas) de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* como portadoras de genes de MBLs.

En función de los resultados, se observa que el gen *bla_{IMP-1}* está presente apenas en cepas de *P. aeruginosa* y no así en *A. baumannii*. Este fenómeno parece indicar que las cepas productoras de MBLs de *A. baumannii* circulantes en hospitales de nuestro país todavía no poseen el gen *bla_{IMP-1}*. Lo que estaría en concordancia con la epidemiología conocida en América latina, ya que hasta el año 2015 solamente había dos reportes de cepas de *A. baumannii* portadoras del gen *bla_{IMP-1}*, uno en Argentina y otro en Brasil como indican Rocha, Reynolds y Simons. Por otra parte, la detección del gen *bla_{IMP-1}* en cepas de *P. aeruginosa* de nuestro país corrobora las afirmaciones de Hong y sus colaboradores, quienes destacan que gracias a la promiscuidad de *P. aeruginosa* por la adquisición de genes de resistencia, cepas resistentes a carbapenemes de esta especie poseedoras del gen *bla_{IMP-1}* están diseminadas prácticamente por todo el mundo (Rocha, Reynolds y Simons, 2015; Hong *et al.* 2015).

Sobre el gen *bla_{VIM-1}*, no se detectó en ninguna cepa, lo que podría llevar a pensar que la variante VIM no se encuentra circulando en nuestro país, sin embargo, según la Asociación Argentina de Microbiología (Ingold *et al.*, 2011) es la variante VIM-2 la más frecuente en el mundo, lo cual nos plantea que si bien no se detectó al gen *bla_{VIM-1}*, es posible que se encuentre circulando el gen *bla_{VIM-2}* o incluso otra variante del tipo VIM en cepas de aislados que presentan resistencia a carbapenemes en nuestro país, lo que abre una posibilidad interesante para dar una continuidad a este tipo de estudio.

En relación al gen *bla_{NDM-1}*, quien despierta una atención mayor desde el punto de vista epidemiológico, gracias a que posee un espectro hidrolítico más amplio y cuenta con un potencial de diseminación alto; en este estudio se detectó el gen tanto en cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Su detección en nuestro país se suma a los reportes de los países de América Latina (ISP Chile, 2014). Hasta el año 2014 eran 12 países latinoamericanos que detectaron este mecanismo de resistencia, pero era desde el 2011 que la Organización Panamericana de Salud conjuntamente la Organización Mundial de Salud ya subrayaba desde entonces la importancia de reforzar la vigilancia para establecer estrategias de control para prevenir la diseminación de este tipo de MBL

en cepas hospitalarias; recomendando una serie de estrictas medidas de prevención y control de infecciones para los pacientes colonizados o infectados por un patógeno portador de *bla_{NDM-1}*, estas medidas están relacionadas con precauciones de contacto con el paciente y el refuerzo de la higiene del ambiente hospitalario (OMS, 2011).

Sobre la epidemiología regional, llama la atención que todas las cepas caracterizadas positivamente provienen del departamento de Santa Cruz, habiendo silencio en lo que se refiere a cepas de otros departamentos. Podemos interpretar este resultado si consideramos a microorganismos productores de MBLs que probablemente migraron en personas provenientes de países extranjeros (Memish *et al.* 2003); contribuye a este cuadro la tasa de inmigración en el departamento de Santa Cruz, que es la mayor de todo el país, como demuestran los datos del censo del año 2001 publicados por el Instituto Nacional de Estadística de Bolivia (INE Bolivia, 2016). Además este hecho es agravado al ser el departamento de Santa Cruz la región de más tránsito con otros países, principalmente el Brasil, país que ya reportó la detección de cepas productoras de MBLs incluyendo un genotipo propio, como es la SPM (Galetti, 2010).

Es un hecho que la migración internacional es responsable de la diseminación de mecanismos de resistencia en microorganismos es una realidad en todo el mundo (Memish *et al.* 2003) por lo que es de esperarse que los genotipos detectados en este estudio migraran del exterior, esto en vista que los mismos, IMP-1 y NDM-1, tuvieron sus descubrimientos reportados en países extranjeros (Hong *et al.* 2015) mientras que hasta la fecha no se realizó cualquier tipo de estudio o descubierta sobre un genotipo originario de Bolivia. Además, en este estudio se halló una mayor cantidad de genotipos en cepas del 2014 comparada con las cepas del año 2013, lo que parece indicar un incremento notorio en la diseminación de MBLs en nuestro país.

Sobre las muestras, cabe resaltar que las cepas utilizadas en este estudio provienen de cultivos de aislamientos de pacientes hospitalizados; pero, no todas fueron remitidas al INLASA indicando el tipo de muestra de origen, lo que nos impide hacer una correlación de la caracterización genotípica de las MBLs en relación al tipo de muestra de origen del aislamiento. Sin embargo, se puede rescatar de las muestras debidamente

identificadas que gran parte de los aislamientos provino de puntas de sondas y de catéter lo que parece indicar que la diseminación de estos microorganismos ocurrió dentro de los mismos hospitales (Fariñas y Martínez, 2013); algunas de las posibles causas de esto puede ser el número de pacientes, que supera la capacidad del hospital, la no disponibilidad de áreas separadas y aisladas, así como la falta de personal de apoyo específico para cada unidades (como enfermeras y auxiliares), lo que provoca que se ponga en aprietos la atención en los hospitales, ya que el mismo personal de enfermería tiene que circular permanentemente por todas las áreas del hospital, diseminando y rescatando microorganismos entre paciente y paciente (Felipe, 2010).

Las cepas que fueron caracterizadas negativamente pueden interpretarse desde distintos puntos de vista: una de las posibilidades es la utilización de EDTA en las pruebas fenotípicas para la identificación de MBLs; es conocido que el EDTA posee efecto en la permeabilidad de la pared bacteriana, aumentando la sensibilidad a varios antimicrobianos, lo que produce un agrandamiento del halo de inhibición, y por lo tanto ocasionar resultados falsos positivos (Galetti, 2010). Otra posibilidad es que estas cepas produzcan un tipo de β -lactamasa, cuyo fenotipo puede, en algunos casos, parecerse al de las MBLs y por lo tanto confundirse, como es el caso de las carbapenemasas de clase D como OXA-23 y OXA-48 (Nordmann y Poirel, 2002). Finalmente, como ya fue mencionado, las cepas podrían estar produciendo una variante de los genotipos que se intentaba detectar, por lo que no pudo ser amplificada por la PCR; esta una debilidad de esta técnica, ya que los primers utilizados solo permiten detectar genes conocidos (Picao *et al.* 2008). De todos modos, dado que varios mecanismos intrínsecos pueden contribuir a la resistencia a los carbapenemes en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, el método más fiable hasta el momento para el diagnóstico de MBLs continua siendo la PCR (Papa, 2015).

El impacto de la detección de cepas portadoras de genes de MBLs radica en que los genes que codifican estas enzimas se encuentran incluidos en plásmidos conjugativos que le confieren a las bacterias un gran potencial de diseminación a otros patógenos nosocomiales. Así también, la asociación en estas cepas con otros mecanismos de resistencia, como β -lactamasas de espectro extendido o BLEE y genes de resistencia a

quinolonas, se traducen en un mayor riesgo de situaciones críticas de pacientes que se encuentran infectados o eventualmente pueden infectarse durante hospitalizaciones prolongadas debido a las escasas opciones terapéuticas; además debe tomarse en cuenta que no está previsto para esta década ningún nuevo antimicrobiano con acción frente a los Gram negativos (Merejón, 2012).

Este estudio demostró que cepas productoras de MBLs están presentes en hospitales de Bolivia, pero probablemente estos hallazgos reflejan solo una parte de la situación real en nuestro país, ya que varios hospitales no cuentan con laboratorios de Bacteriología que realicen la vigilancia epidemiológica sobre cepas resistentes a los carbapenemes, principalmente los del interior, y otros no están en condiciones de detectarlas. En este estudio solo se han incluido las cepas que fueron remitidas desde hospitales que son parte de la Red de Laboratorios de Bacteriología de cuatro departamentos que cuentan con un plantel entrenado y sensibilizado con la emergencia de la resistencia a los antimicrobianos.

El hallazgo de las cepas productoras de NDM, al igual que las otras MBLs, debe ser considerado de alto riesgo epidemiológico. Para la contención de este mecanismo de resistencia se requiere su rápida identificación, como señala la Organización Panamericana de la Salud quien además subraya que las cepas sospechosas de producir MBLs, deben ser confirmadas por métodos moleculares (Ins. Malbran, 2011). La confirmación mediante PCR constituye un paso posterior importante, en vista que estudios fenotípicos pueden asociarse con resultados falsos positivos. Además, permite definir el tipo de MBLs y los posibles mecanismos participantes en la diseminación de la resistencia. La detección rutinaria de MBLs garantizará la atención óptima del paciente y la introducción oportuna de medidas de prevención (Ellington *et al.* 2007).

La rápida y fácil diseminación de los patógenos productores de MBLs por todo el mundo hace necesaria la urgente búsqueda y aplicación de estrategias por parte de equipos multidisciplinarios, que incluyan la correcta y rápida detección de estas cepas con la finalidad de que, las intervenciones terapéuticas y la implementación de medidas de contención y control sean oportunas y eficaces. Los elevados porcentajes de resistencia a otros antimicrobianos diferentes a los β -lactámicos y el uso desmedido de

los carbapenemes prácticamente nos dejan sin opciones terapéuticas aplicables para tratar infecciones por estos patógenos.

Fundamentalmente, la razón de este estudio, es el de aportar información para la vigilancia epidemiológica que viene siendo trabajada en Bolivia. Esta es una herramienta importante en la salud pública, ya que no solo permite la recolección de datos, su análisis y su evaluación; sino que a su vez, permite una toma de decisión al momento de ejecutar los diversos programas de prevención y tratamiento de enfermedades de la población (Spena y Cárdenas, 2010). A su vez nos permite dar reportes confiables a las diferentes organizaciones mundiales encargadas de monitorear la diseminación de microorganismos multirresistentes.

VII. CONCLUSIONES

En vista de los resultados del presente estudio, podemos concluir que:

- De las 69 cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* caracterizadas genotípicamente, se detectó en 14 (22%) de ellas, la presencia de los genes bla_{IMP-1} y bla_{NDM-1}. Por otra parte, no se detectó la presencia del gen bla_{VIM-1}.
- El gen bla_{IMP-1} fue detectado solamente en cepas de *P. aeruginosa*. El gen bla_{NDM-1} se detectó en cepas de ambas especies.
- Todas las cepas que fueron detectadas como portadoras de genes MBLs proceden del departamento de Santa Cruz.
- En las cepas del año 2013, se detectó solamente el gen bla_{NDM-1}. En las cepas del año 2014, además del gen bla_{NDM-1} se detectó el gen bla_{IMP-1}.

VII. RECOMENDACIONES

Es de suma importancia el hallazgo de los resultados de este trabajo, una vez que confirma la presencia de las MBLs en Bolivia, integrándose de esta manera a la alerta epidemiológica sobre este mecanismo de resistencia que engloba a los demás países de América latina y el resto del mundo.

Sin embargo, dado que este estudio es pionero en Bolivia sobre el tema, es imperativo continuar haciendo trabajos de este tipo para tener un panorama más nítido sobre la situación de las carbapenemasas y principalmente las MBLs en nuestro país; también es necesario contar con muestras procedentes de otros departamentos y realizar el secuenciamiento de los genes de MBLs encontrados. Además, en las cepas que resultaron negativas a la caracterización genotípica, pero que presentan resistencia a los carbapenémicos, explorar la posible presencia de distintos genes que podrían estar confiriendo esta resistencia, como las carbapenemasas de clase D (OXA).

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abarca G. y Herrera M. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*. 36, 1-2.

Adé M. (2009). Perfil de país Bolivia-Resistencia Antimicrobiana. *SAIDI/Organización Panamericana de la Salud*. Washington, D. C.

Ahmed O., Asghar A., Elhassan M. (2014). Comparison of three DNA extraction methods for polimerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *African Journal of Microbiology Research*. 8 (6), 598-602.

Anton D. y Hooper P. (2010). Infecciones intrahospitalarias por bacterias gram-negativas. *N Engl J Med*. 362, 1804-1813.

Ariza B. y León A. (2013). CARBAPENEMASA NUEVA DELHI TIPO 1 (NDM): DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA, EPIDEMIOLOGÍA Y TRATAMIENTO. *Laboratorio Actual*. 44.

Bora A., Sanjana R., Kumar Jha B., Narayan S. y Pokharel K. (2014). Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Kebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC Research Notes*. 7 (557).

Bebrone C. (2007). Metallo- β -lactamasas (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*. 74 (12), 1686-1701.

Bush K. y Jacoby G. (2010). Updated Classification of β -Lactamasas. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 54 (3), 969-976.

Casellas J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública*. 30 (6), 519-528.

Centro Nacional de Referencia de Bacteriología – INCIENSA (2014). Alerta: Primer hallazgo de carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas New Delhi (MBL-NDM) en Costa Rica. Cartago.

Chinchilla A., Tomas B. y Morales R. (2013). Detección de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC-2 en enterobacterias BLEE+; evaluación fenotípica con confirmación genotípica. (*Tesis de licenciatura*). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Conza J. y Gutkind G. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*. 42, 63-68.

Cortés R. (2013). Detección de Carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas en la población de *Acinetobacter baumannii complex* resistente a Imipenem y/o Meropenem aislados en las unidades de cuidados intensivos del Hospital Roosevelt. (*Tesis de Licenciatura*). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM (2011). Metallo-B-lactamasas: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*. 11, 381-93.

Cortéz R. (2013). DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS TIPO METALOBETALACTAMASAS EN LA POBLACIÓN DE *Acinetobacter baumannii complex* RESISTENTE A IMIPENEMY/O MEROPENEM AISLADOS EN LAS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL ROOSEVELT. (*Tesis de licenciatura*). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Cuesta D., Vallejo M., Kennedy G., Cárdenas J., Hoyos C., Loaiza E., Villegas MV. (2012). Infección intrahospitalaria por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: estudio de casos y controles. *Medicina UPB*. 31 (2), 135-142.

Díaz J. A. (2008). Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en *Pseudomonas Aeruginosa* resistentes a los Carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008 (*Tesis de maestría*). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.

Díaz V. (2013). *Acinetobacter baumannii*: actualidades. *Revista de enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 92, 104-105.

Diene S. y Rolain J. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*. 20, 831-838.

Estepa P. (2014). Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes orígenes. (*Tesis doctoral*). Universidad de La Rioja. La Rioja.

Ellington M., Kistler J., Livermore D., Woodford N. (2006) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 59, 321-322.

Fariñas M., Martínez L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31 (6), 402-406.

Fernandez E., Bustamante Z., Zamora J., Zabalaga S., Pinto J., Funes F., Sevillano E., Umaran A., Gallego L. (2009). Determinación de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* de hospitales de la ciudad de Cochabamba. *BIOFARBO*. 17 (1), 30-38.

Felipe E. (2010). DETERMINACIÓN DE METALOENZIMAS EN AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DEL HOSPITAL GENERAL SANJUAN DE DIOS. (*Tesis de maestría*). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Ferrero S. (2005). Incidencia y resistencia de bacilos gram negativos no fermentadores. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. *Resumen M-136*.

Figueiredo D. (2013). Pesquisa de metalobetalactamase e KPC em populações de *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp isolados do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Secretaria de Estado da Saúde –SES-SP. São Paulo.

Fresnadillo M., García M., García E., García J. (2010) Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28 (2), 53-64.

Galetti R. (2010). Estudio de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo-beta-lactamase e genes envueltos na resistencia a os carbapenemicos. (*Tesis de maestría*). Universidade de Sao Paulo, Ribeirão Preto.

Galvis C., Villabón M. A. & Ortiz K. J. (2011). FACTORES ASOCIADOS A INFECCIÓN POR ACINETOBACTER BAUMANNI EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS EN BOGOTA D. C. (*Tesis de especialidad*). Universidad del Rosario. Bogotá.

Gamero M., García A., Rodríguez F., Ibarra A. y Casal M. (2007) sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap.* 20 (2), 230-233.

Gallah F., Shams R. y Hashemi A. (2013). Detection of bla (IMP) and bla(VIM) metallo- β -lactamases genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Int J Burn Trauma.* 3 (2), 122-124.

Gallego L., Canduela MJ., Pujona I., Calvo F., Umaran A., Martin G. (2004). Detección de carbapenemasas en clones de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 22 (5), 262-266.

Garnacho Montero J. (2004). Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por *Acinetobacter* spp. *Revista Electrónica de Medicina Intensiva.* 4 (6).

Gomez A. (2011). PRESENCIA DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS DE MUESTRAS RECOLECTADAS DE NUEVE HOSPITALES DE LA CIUDAD DE QUITO, DE MAYO DEL 2009 A NOVIEMBRE DEL 2010. (*Tesis de maestría*). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito.

Gómez C., Leal A., Pérez M. y Navarrete M. (2005). MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: ENTENDIENDO A UN PELIGROSO ENEMIGO. (*Actualización*). Universidad Nacional de Colombia. Bogota.

Gonzales E. (2012). Metallo-B-Lactamasas: ¿El fin de los B-lactámicos? *Revista Peruana de Epidemiología.* 16 (3), 1-8.

Gonzales E. (2013). DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE METALO- β -LACTAMASAS EN AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RECUPERADOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO LIMA-PERÚ. *Instituto Nacional de Salud del Niño.* Lima.

González G., Mella S., Zemelman., Bello H., Domínguez M. (2004). Integrones y *cassettes* genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antimicrobianos. *Revista Médica de Chile*. 132, 619-626.

Helfand M. y Bonomo R. (2005). Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum β -lactamases and metallo- β -lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Current Opinion in Pharmacology*. 5, 452-458.

Henrichfreise B., Wiegand I., Sherwood K. y Wiedemann B. (2005). Detection of VIM-2 Metallo- β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (4), 1668-1669.

Hernández A., García E., Yague G. y Gómez J. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev Esp Quimioter*. 23 (1), 12-19.

Hernández S. (1998). Estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. (*Tesis doctoral*). Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Hong D., Bae I., Jang I., Hoon S., Kang H. y Lee K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & Chemotherapy*. 47 (2), 81-97.

Estado Plurinacional de Bolivia-Instituto Nacional de Estadística INE (2012). Censo Nacional de Población y Vivienda.

INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” (2013). Alerta epidemiológico: EMERGENCIA DE CARBAPENEMASA TIPO NDM en Argentina.

Ingold A., Castro M., Nabón A., Borthagaray G. y Márquez C. (2011). Detección del gen codificante de la metalo-B-lactamasa VIM-2 en un integron de clase 1 asociado con el gen blaCTX-M-2 en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en el Uruguay: primera comunicación. *Revista Argentina de microbiología*. 43 (3), 198-202.

Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia Instituto de Salud Pública de Chile (2014). Instituto de Salud Pública de Chile confirma aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa NDM-1. Santiago.

- Ledermann D. (2007). *Acinetobacter iwoffii* y *anitratus*. *Rev Chi Infect.* 24 (1), 76-80.
- Lee K., Yong D., Yum J., Lim Y., Bolmstrom A., Qwarnstrom., Karlsson A., y Chong Y. (2005). Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 Allele-Positive Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical Microbiology.* 43 (2), 942-944.
- Livermore D. y Woodford N. (2006). The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *TRENDS in Microbiology.* 14 (9).
- López S. (1998). Estudio de mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. (*Tesis doctoral*). Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Martínez M. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos (*Tesis doctoral*). Universidad de Barcelona. Barcelona.
- Martínez P. (2004). Emergencia de bacilos gram negativos multirresistentes: Impacto de las Betalactamasas de espectro extendido y metalo Betalactamasas en hospitales de la Costa Colombiana. *Revista MVZ Córdoba.* 9 (2), 474-475.
- Martínez J. (1992). RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETALACTAMICOS EN *Enterobacteriaceae* Y *Pseudomonas aeruginosa*. (*Tesis Doctoral*). Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Mazel D. (2004). Integrons and the Origin of Antibiotic Resistance Gene Cassettes. *ASM news.* 70 (11).
- McConnell M., Actis L. y Pachón J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* 37. 130-155.
- Melgarejo N., Martínez M., Franco R. y Falcón M. (2013). Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. *Rev. Salud Pública Paraguay.* 3 (1), 30-35.

- Mello C. y Horner R. (2008). Uma revisao sobre metalo- β -lactamases. *Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas*. 44 (4), 577-579.
- Memish Z. y Venkatesh S. (2003). Impact of Travel on International Spread of antimicrobial Resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21, 135-142.
- Merejón M. (2012). Carbapenemasas, una amenaza actual. *Hospital Clínico Quirúrgico Dr. Manuel Fajardo*. La Habana.
- Moreno K. (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*. 608, 599-605.
- Nicolau C. y Oliver A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28 (1), 19-28.
- Nordmann P. y Poirel L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 8, 321-331.
- Nordmann P., Naas T. y Poirel L. (2009). Propagación Mundial de *Enterobacterias* – Productoras de Carbapenemasas. *Dolande F*. 3506.
- Nordmann P., Poirel L., Carrer A., Toleman M. y Walsh T. (2011). How To detect NDM-1 Producers. *Clin Microbiol Infect*. 49 (2), 718-721.
- Núñez Linares A. (2009). Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalobetalactamasas. (*Tesis maestral*). Universidad del Zulia. Maracaibo.
- Organización Mundial de la Salud (2000). Resistencia a los antimicrobianos: una amenaza mundial. *Boletín de Medicamentos esenciales*. 28.
- Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de Salud (2014). Actualización Epidemiológica: Carbapenemasas tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM).
- Palzkill T. (2013). Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*. 1277, 91-104.
- Papa R. (2015). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas spp* productores de Metallo-B-lactamasas. (*Tesina*). Universidad de la República de Uruguay, Montevideo.

- Partridge S., Tsafnat G., Coeira E. e Iredell J. (2008). *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757-784.
- Pérez A., García P., Poggi H., Braun S., Castillo C., Román J., Lagos M., Romeo A., Porte L., Labarca J y Gonzáles G. (2008). *Rev Med Chile.* 136, 423-432.
- Pérez L, Zurita I, Pérez N, Patiño N y Calvimonte O (2010). Infecciones hospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención. *Rev Cient Cienc Med.* 13 (2), 94-98.
- Perozo A., Castellano M., Chavez T., Ling E. y Arraiz N. (2013). Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera.* 41 (2), 115-126.
- Picao Renata, Floristher Elaine, Gales Cristina, Venancio Emerson, Xavier Danilo, Bronharo Maria y Pelayo Jacinta (2012). Metallo- β -lactamase-production in meropenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk for silent spread. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 107 (6),
- Pitout J., Gregson D., Poirel L., McClure J., Le P. y Church D. (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo-B-Lactamases in a Large Centralized Laboratory *Journal of Clinical Microbiology.* 43 (7), 3129-3155.
- Queenan A. y Bush K. (2007). Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20 (3), 440-458.
- Rivero E., Herrera M., Larrondo H., Lozano D. y León D. (1998). Carbapenémicos y monobactámicos. *Acta Médica.* 8 (1), 66-70.
- Rocha C., Reynolds N. y Simons M. (2015). RESISTENCIA EMERGENTE A LOS ANTIBIÓTICOS: UNA AMENAZA GLOBAL Y UN PROBLEMA CRÍTICO EN EL CUIDADO A LA SALUD. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 32 (1), 139-45.
- Rodríguez M., Castillo B., Rodríguez C., Romo M., Monteagudo I. y Martínez L. (2010). Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de la metalobetalactamasa VIM-2 en Cantabria, España. *Enferm, Infec. Microbiol. Clin.* 28 (2), 99-103.

Rojas F. (2009). Identificación de Genes responsables de resistencia a carbapenémicos en cepas nosocomiales de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en algunos hospitales de México. (Tesis de Maestría). Universidad de Colima, México.

Robledo J., López J., Sierra P., Robledo C., Pfaller M. y Jones R. (1999) *El programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY en Colombia: Hallazgos iniciales en tres hospitales de Medellín. REV INFECTIO.* 3 (2).

Saavedra S., Duarte C., Gonzáles M., Realpe M. (2014). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica.* 34 (1), 217-23.

Sánchez D., Marcano E., León L., Payares D., Ugarte C., Salgado N., Maggi G., Guevara A., Torres S., Rodríguez J., Flores A. y Tarazona B. (2008). Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales de Venezuela. *Revista del instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".* 39 (2), 17-22.

Sánchez L., Sáenz E., Pancorbo J., Lanchipa P. y Zegarra R. (2004). ANTIBIÓTICOS SISTEMICOS EN DERMATOLOGÍA: Betalactámicos-Carbapenems-Aminoglucósidos-Macrólidos. *Dermatología Peruana.* 14 (1), 7-20.

Santella G., Pollini S., Docquier J., Almuzara M., Gutkind G., Rossolini G. y Radice M. (2011). Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. *Rev Panam Salud Pública.* 30 (6), 545- 548.

Spena A. y Cárdenas L. (2010). Gerencia de servicios asistenciales de Salud: Vigilancia epidemiológica. *Universidad Andrés Bello.* Caracas.

Suárez C., Kattán J., Guzmán A. y Villegas M. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Asociación Colombiana de Infectología.* 10 (2), 85-93.

Walsh T., Toleman M. y Poirel L. (2005).Metallo-B-Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews.* 18 (2), 306-325.

Tapia R. (1996). La importancia de la vigilancia epidemiológica en los servicios de medicina preventiva. *Salud Pública de México*. 38 (5).

Torrice E. (2009) Bacilos Gram negativos no fermentadores: *Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Burkholderia*. Manual de aislamiento e identificación de patógenos Gram negativos asociados a infecciones intrahospitalarias. INLASA. La Paz.

Vanegas J., Roncancio G. y Jiménez J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Rev CES Med*. 28 (2), 233-246.

Vila J. y Marco F. (2002). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 20 (6), 304-312.

Vianey J. (2010). 2ESTUDIO DE METILTRANSFERASAS INVOLUCARADAS EN LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE BACIOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES DE OROGEN CLÍNICO”. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. México.

Vignoli R. y Seija V. (2000). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 649-662.

Wachino J., Yamaguchi Y., Mori S., Kurosaki H., Arakawa Y. y Shibayama K. (2013). Structural insights into the subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- β -lactamase inhibitor mercaptoacetate. *Antimicrob Agents Chemoter*. 57(1), 101-109.

Walsh T., Toleman M., Poirel L. y Nordmann P. (2005). Metallo- β -lactamases: the Quiet before the Storm?. *Clin Microbiol Rev*. 18 (2), 306-325.

Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop W., Schreckenberger P. y Woods G. (2008) *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. Texto y Atlas. 6° edición. Editorial Panamericana.

Zanol F., Ulrich S. y Morsch F. (2010). Detecção fenotípica de metalobetalactamasa em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. *J Bras Patol Med Lab*. 46 (4), 309-314.

ANEXOS

Anexo 1: Fotografías de las corrida electroforéticas

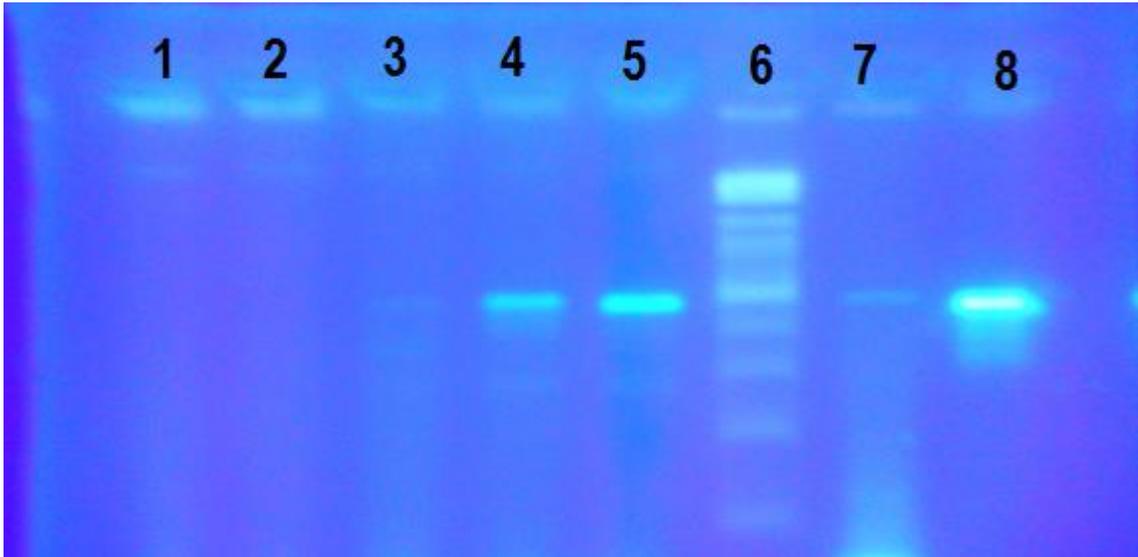
Fotografía 4. Corrida electroforética del PCR para la detección del gen *bla_{IMP-1}*. (Vino, 2016).



Fuente Propia

Se muestra: en el carril 1 la escalera de peso molecular, en el carril 2 el control negativo, en el carril 3 y 4 muestras positivas (410 pb), del carril 5 al 9 muestras negativas y en el carril 10 el control positivo (410 pb).

Fotografía 5. Fotografía de la corrida electroforética del PCR para la detección del gen bla_{NDM-1}. (Vino, 2016)



Fuente Propia

Se observa en la fotografía: en el carril 1 el control negativo, en el carril 2 una muestra negativa, en los carriles del 3 al 5 y el 7 muestras positivas (512 pb) y en el carril 8 el control positivo (512 pb).

Anexo 2: Tabla de las cepas utilizadas en el estudio.

Caracterización MBLs 2013 INLASA/Bacteriología				
Número	Código	Especie	Departamento procedencia	Resultado caracterización genotípica
1	045/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
2	048/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
3	063/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
4	064/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
5	072/13	<i>A. Baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
6	073/13	<i>A. Baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
7	078/13	<i>A. Baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
8	079/13	<i>A. Baumannii</i>	La Paz	Negativo
9	080/13	<i>A. Baumannii</i>	La Paz	Negativo
10	081/13	<i>A. Baumannii</i>	La Paz	Negativo
11	082/13	<i>A. Baumannii</i>	La Paz	Negativo
12	085/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
13	086/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
14	088/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
15	089/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
16	090/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
17	092/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
18	093/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
19	094/13	<i>A. Baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
20	133/13	<i>A. Baumannii</i>	Santa Cruz	Positivo
21	136/13	<i>A. Baumannii</i>	Santa Cruz	Positivo
22	140/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
23	151/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
24	152/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
25	157/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
26	158/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
27	161/13	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
28	164/13	<i>A. Baumannii</i>	La Paz	Negativo
29	173/13	<i>P. aeruginosa</i>	Cochabamba	Negativo

Caracterización MBLs 2014 INLASA/Bacteriología Clínica				
Número	Código	Especie	Departamento procedencia	Resultado caracterización genotípica
1	004/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
2	005/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
3	007/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
4	017/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
5	018/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
6	041/14	<i>A. baumannii</i>	Cochabamba	Negativo
7	042/14	<i>A. baumannii</i>	Cochabamba	Negativo
8	043/14	<i>A. baumannii</i>	Cochabamba	Negativo
9	050/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
10	056/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
11	057/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
12	058/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
13	060/14	<i>A. baumannii</i>	Cochabamba	Negativo
14	067/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
15	071/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
16	072/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
17	080/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
18	081/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
19	083/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
20	084/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
21	085/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Positivo
22	086/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
23	087/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Negativo
24	088/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
25	089/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
26	090/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
27	091/14	<i>P. aeruginosa</i>	La Paz	Negativo
28	093/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
29	094/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
30	108/14	<i>A. baumannii</i>	Chuquisaca	Negativo
31	109/14	<i>A. baumannii</i>	La Paz	Negativo
32	120/14	<i>P. aeruginosa</i>	La Paz	Negativo
33	129/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
34	130/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
35	131/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Negativo
36	134/14	<i>P. aeruginosa</i>	Santa Cruz	Positivo
37	135/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Positivo
38	138/14	<i>A. baumannii</i>	Santa Cruz	Positivo