



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE
METALO- -LACTAMASA PRODUCIDA POR
PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN MUESTRAS DE
PACIENTES PROCESADAS EN EL LABORATORIO DE
BACTERIOLOGÍA DEL HOSPITAL OBRERO, DESDE
ENERO A DICIEMBRE DEL 2009”**

AUTOR:

Univ. Zulema Chacolla Mena

ASESOR:

Dr. Juan E. Callisaya H.

**TESINA DE INVESTIGACIÓN PARA EL TÍTULO ACADEMICO DE
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**LA PAZ – BOLIVIA
2011**



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE
METALO- -LACTAMASA PRODUCIDA POR
PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN MUESTRAS DE
PACIENTES PROCESADAS EN EL LABORATORIO DE
BACTERIOLOGÍA DEL HOSPITAL OBRERO, DESDE
ENERO A DICIEMBRE DEL 2009”**

AUTOR:

Univ. Zulema Chacolla Mena

ASESOR:

Dr. Juan E. Callisaya H.

**LA PAZ – BOLIVIA
2011**

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación del estudio	5
1.3 Planteamiento del problema	6
1.4 Marco teórico y conceptual	7
1.4.1 Identificación de Pseudomonas aeruginosa	7
1.4.2 Pseudomonas aeruginosa como patógeno nosocomial	9
A. Factores de virulencia	13
A.1 Estructura del lipopolisacarido	13
A.2 Formación de biopelículas	13
B. Proceso de infección	14
C. Epidemiología	15
1.4.3 Resistencia Bacteriana	16
A. Resistencia natural a antibióticos	16
B. Bases genéticas de la resistencia	18
B.1 Selección de Mutantes Resistentes	18
B.2 Resistencia por intercambio genético	19
1.4.4 Mecanismos de resistencia identificados	20
A. Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa	21
B. Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de bombas de flujo	23
C. Modificación del sitio blanco	25
D. Inactivación Enzimática Del Antibiótico	26
1.4.5 Resistencia a antibióticos -lactámicos	28
1.4.6 -lactamasas	29
A. -lactamasas Inducible	30
B. -lactamasas Constitutiva	30
C. Clasificación de -lactamasas	31

1.4.7 Mecanismo de resistencia para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
1.4.8 -lactamasas involucradas en la resistencia a carbapenems	34
A. -lactamasas tipo AmpC.	34
B. -lactamasas de clase A	37
C. -lactamasas de clase D	38
D. Metallo- -lactamasas	40
1.4.9 Estrategias para el control de la resistencia	43
1.4.10 Aislamiento e identificación	46
1.4.11 Pruebas de susceptibilidad y detección de metallo- -lactamasas y otras carbapenemasas	47
A. Difusión de disco	47
B. Detección fenotípica de carbapenemasa	48
C. Diferenciación fenotípica de las diferentes carbapenemasas	51
1.4.12 Detección fenotípica de la resistencia a quinolonas	54
II. OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo general	55
2.2 Objetivos específicos	55
III. MÉTODO	55
3.1 Tipo de estudio	55
3.2 Universo y muestra	56
3.3 Criterios de inclusión y exclusión	56
3.3.1 Criterios de inclusión	56
3.3.2 Criterios de exclusión	56
3.4 Listado de variables	57
3.5 Operacionalización de variables	57
3.6 Técnicas y procedimientos	58
3.6.1 Obtención de la información	58
3.6.2 Procesamiento y análisis	59

IV. RESULTADOS	59
V. DISCUSION	67
VI. CONCLUSIONES	74
VII. RECOMENDACIONES	75
VIII. BIBLIOGRAFIA	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislamiento de P. aeruginosa según tipo de muestra “ Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	60
Tabla 2. Aislamiento de P. aeruginosa según edad “ Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	61
Tabla 3. Aislamiento de P. aeruginosa según servicio “ Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	62
Tabla 4. Porcentaje de Aislamiento de P. aeruginosa según respuesta antibiótica “ Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	64
Tabla 5. Frecuencia de Aislamiento de P. aeruginosa según respuesta antibiótica “ Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	65
Tabla 6. Aislamiento de P. aeruginosa según mecanismo de resistencia “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	66

INDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Aislamiento de P. aeuroginosa según tipo de muestra “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	60
Grafica 2. Aislamiento de P. aeuroginosa según porcentaje de edad “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	61
Grafica 3. Aislamiento de P. aeuroginosa según porcentaje de servicio “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	63
Grafica 4. Porcentaje de Aislamiento de P. aeuroginosa según respuesta antibiótica “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	64
Grafica 5. Frecuencia de Aislamiento de P. aeuroginosa según respuesta antibiótica “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	65
Gráfica 6. Aislamiento de P. aeuroginosa según mecanismo de resistencia “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009	66

DEDICATORIA

Va dedicado a mi hermano y en especial a mi padre por brindarme su apoyo incondicional respetando las decisiones que tomo, dándome la oportunidad de demostrarme a mí misma que todo en esta vida se puede si uno quiere te amo mucho papi gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los docentes que me encaminaron durante mis estudios, a seguir siempre adelante cuando hay tropiezos y a mi asesor Dr. Juan Callisaya que me enseñó que todo se puede siempre que se quiere sin dejar de actualizarse y querer aprender más cada día.

RESUMEN

OBJETIVO: Se evaluara la prevalencia de la enzima metalo- β -lactamasa producida por *Pseudomonas aeruginosa* en muestras biológicas procesadas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Obrero de Caja Nacional de Salud de la ciudad de La Paz que abarcara desde el mes de enero a noviembre de 2009.

MÉTODO: El trabajo de investigación a realizarse es un análisis retrospectivo longitudinal y descriptivo. Por lo consiguiente se tendrá el objetivo de registrar la prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* que se presenta en infecciones por el método a emplear difusión de monodiscos de EDTA en agar de diferentes tipos de muestras biológicas, se trata de establecer la relación entre la presencia de la enzima y la resistencia cruzada a otros antibióticos, la variación en el tipo de muestras y según el servicio solicitante de esta manera poder establecer los antibióticos alternativos para el tratamiento antimicrobiano para las cepas productoras de metalo- β -lactamasas.

RESULTADOS: La mayoría de los aislamientos de la bacteria procedían de orina (35 muestras-33.65%) con mayor frecuencia al sexo masculino con 54,9% en un rango de edad que oscilan entre 68 – 78 años con 35%, se detecto en las diferentes áreas de servicio que prevalece en primer lugar UTI (unidad de terapia intensiva) con 31,7%, en el perfil de susceptibilidad muestra que los carbapenems presentan una resistencia más baja de todos los grupos de antibióticos testados con un 31.85% pero que va en aumento con años anteriores es así que se obtuvo una prevalencia de metalo- β -lactamasa en *P. aeruginosa* correspondiente a 0,96 %, muy baja esto podría deberse a que presenta más de un mecanismo de resistencia.

CONCLUSION: Para desarrollar una resistencia clínicamente significativa a los carbapenem, la *P. aeruginosa* requiere la combinación de varios mecanismos de resistencia (los más comunes, producción de β -lactamasas y pérdida de porinas). Las instituciones de salud deben crear programas para el manejo adecuado de antibióticos basados en la epidemiología local y el mecanismo de resistencia bacteriana operante, así como estrategias para la prevención y control de la diseminación de estas bacterias con resistencia múltiple.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

P. aeruginosa (*Pseudomonas aeruginosa*) patógeno oportunista que ataca con mas frecuencia a pacientes internados, estas infecciones causadas por estos microorganismos es difícil de tratar ya que *P. aeruginosa* naturalmente resistente a una gran variedad de antimicrobianos y van adquiriendo mecanismos de resistencia que utilizan para ser invulnerables. Las infecciones nosocomiales causadas por esta bacteria en pacientes hospitalizados se origina a través de quienes manipulan catéteres, sonda y realizan procedimientos invasivos o una mascara de oxigeno manipulados sin asepsia adecuada por parte de médicos o enfermeras, estos son los principales vehículos para que las bacterias resistentes se diseminen en pacientes que ya tienen una patología base.

A nivel mundial, se ha notificado numerosos brotes nosocomiales causados por *P. aeruginosa*. Estos se han asociado con la contaminación de equipos de ventilación y con el abuso de antimicrobianos específicos. A menudo estos brotes exhiben patrones de multiresistencia, lo que hace muy dificultosa su erradicación desde el paciente y desde el medio ambiente.

Estudios revelan que la inmunidad de *P. aeruginosa* es alta, por lo que sólo es sensible en un 30% a los antibióticos convencionales; esto sin duda da a entender que la *P. aeruginosa* es muy resistente a los antibióticos más potentes, y una vez contraída evoluciona en tiempo récord complicando severamente distintos órganos del cuerpo (12).

La resistencia antimicrobiana se ha incrementado en los últimos 10 años. Los datos del NNIS (Nacional Nosocomial Infections Surveillance – sistemas de vigilancia de los E.E.U.U. CDC) del año 1999 han mostrado un 35% de incremento de resistencia al imipenem -14% desde 1994-1998 y 18.5% en el

año 1999- en forma similar, la tasa de resistencia a la quinolona se incrementó aproximadamente de un 15% en el período 1994-1998 a un 23% en 1999. (9) La tasa de mortalidad asociada a bacteriemia es de alrededor de 52% y la asociada a neumonía está entre 23 y 73% (10). En menos de una década después de la introducción de carbapenémicos en la práctica clínica en 1980 que las bacterias Gram negativas han sugerido resistencia a estos agentes. La resistencia a carbapenems puede ser conferida a través de varios mecanismos, incluida la expresión de carbapenemasas una β -lactamasa, en función a esta situación las Metallo- β -lactamasas (MBLs) constituyen clínicamente el más importante grupo de carbapenemasas que hidroliza prácticamente a los β -lactámicos excepto el monobactam aztreonam (3).

Los carbapenems han sido los antibióticos β -lactámicos de mayor actividad evadiendo la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana y, generalmente se reservan para el tratamiento de infecciones graves o para aquéllas causadas por organismos resistentes a los otros antibióticos (10). Aunque las tasas de resistencia se han incrementado constantemente a nivel mundial en los últimos años, varían significativamente entre las diferentes regiones. De acuerdo con el reporte global (11) y el reporte para Latinoamérica de SENTRY (12), las tasas de resistencia a los carbapenems tienden a ser mucho más elevadas en los países latinoamericanos que en Estados Unidos y Europa.

P. aeruginosa fue el tercer patógeno aislado con mayor frecuencia en el reporte de SENTRY para Latinoamérica (12). El estudio mostró tasas de susceptibilidad de 71,9% para imipenem y de 74,8% para meropenem, con una tendencia al incremento de la resistencia a lo largo del tiempo. El estudio del CIDEIM en el 2004 (13) mostró que en Colombia, las tasas de resistencia de *P. aeruginosa* al imipenem varían también considerablemente entre los diferentes hospitales de la red (2% a 71,4%) y entre las unidades (13,5% en salas Vs. 26,6% en unidades de cuidado intensivo). Además se observó nuevamente una alta producción de clones en estos hospitales.

En estas resistencias pueden estar implicados mecanismos de resistencia como la alteración en las proteínas de unión a penicilinas (PBP) o la disminución de la permeabilidad de la membrana externa o alteración en las bombas de flujo de la pared bacteriana. En los últimos años se ha observado un incremento en el número de cepas que producen carbapenemasas, siendo éste uno de los mecanismos más estudiados.

Existen dos tipos dominantes de MBLs, IMP y VIM, cada uno con múltiples variantes alélicas (18). Las enzimas tipo IMP fueron descritas inicialmente en Japón en 1991 y han sido comunicadas frecuentemente en enterobacterias y bacterias gram-negativas no fermentadoras (22), mientras que las VIM fueron detectadas originalmente en Europa en 1999, y han sido descritas fundamentalmente en *P. aeruginosa* y otros no fermentadores (15). La enzima SPM-1, descrita en 1997, y la GIM-1 son también MBLs, cuyas secuencias difieren significativamente de las enzimas tipo IMP y VIM (14). Recientemente se ha reportado una nueva MBL denominada SIM-1 (10). Prácticamente todos los genes codificantes conocidos de las enzimas tipo IMP y VIM, así como GIM-1, se encuentran como genes en *cassette* localizados en integrones de clase 1, asociados a genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (19,20). Aun que pueden localizarse en integrones de clase 3 (20). Los integrones tienen la capacidad de reclutar genes en *cassette* por un mecanismo de recombinación sitio específico entre un elemento de 59 pares de bases en el gen en *cassette* y el sitio *attI1* en el integrón (19). Si bien los genes en *cassette* tienen la posibilidad de desplazarse de un integrón a otro, estos últimos no son un sistema eficiente de transferencia entre bacterias y por lo tanto no es inusual su inclusión dentro de otros elementos como transposones o plásmidos. En los últimos años se ha registrado a nivel mundial, especialmente en Europa y Asia, un notable incremento en el informe de nuevas MBLs y en la diseminación entre microorganismos relacionados e incluso no relacionados (16, 17).

La primera metaloenzima de tipo VIM (clase B9 de la cual se tiene constancia se detecto en un aislamiento clinico de *P. aeruginosa* en Verona (Italia) en 1997 (22) se la denomino VIM-1. Posteriormente se identificaron variantes de esta primera VIM en Marsella (francia), Grecia (23), Corea, Turquía, Portugal (17), Japon (24) y diferentes paises de America del Sur (25). En España se describieron por primera vez en el Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau de Barcelona (26), en un estudio realizado entre 1996 y 2001; fue una metalo- - lactmasa de tipo VIM-2 y esta codificada por un integron de clase I en un plásmido.

Es muy frecuente la resistencia a múltiples antibióticos lo que complica su erradicación, su terapéutica en infecciones graves. Se han identificado aislados resistentes a prácticamente todos los antimicrobianos comercialmente disponibles, lo que limita extremadamente sus alternativas terapéuticas por lo tanto la prevalencia de estas cepas va incrementando si no se toman medidas adecuadas y así no convertirse en un problema de salud mayor mas adelante en la población.

En Bolivia, existe una elevada incidencia de bacterias gramnegativas multirresistentes y los datos previos con los que contamos proceden del Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica LNRBC- INLASA que datan del año 2006, en los que se informa que en ese año hubo 241 aislamientos intra-hospitalarios de *Acinetobacter* spp. Resistentes de los cuales el 1% eran resistentes frente a imipenem y al año siguiente, el número de aislamientos se incrementó a 581 con una resistencia del 4% a imipenem. Hasta la fecha no existen estudios sobre los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en esta resistencia (27). Una de las primeras bacterias que en nuestro país empezó a diseminarse y que de alguna manera la transmisión de genes de resistencia o la adaptación al medio por diferentes mecanismos de resistencia se refleja ahora en *P. aeruginosa* y que de alguna manera se requiere de estudios moleculares para identificar la multiresistencia.

1.1 Justificación del estudio

La resistencia bacteriana se ha convertido en un tema de suma importancia en el estudio de antibióticos principalmente para cepas multiresistentes como *P. aeruginosa* que presenta una sensibilidad muy baja a los antimicrobianos de uso diario con lo cual la forma de terapia se complica para poder combatir las infecciones que producen, sin embargo las relaciones de causalidad no siempre son evidentes, puesto que este puede poseer complejos mecanismos de resistencia entre ellos adquisiciones de genes por elementos móviles como los plásmidos.

Actualmente *P. aeruginosa* es considerado un patógeno emergente ya que han aumentado el número de aislamientos resistentes responsables de infecciones nosocomiales graves. Gran parte de estos aislamientos hospitalarios son además multiresistentes complicando el tratamiento y empeorando el pronóstico del paciente infectado por estos aislamientos.

Si bien la resistencia bacteriana frente a todos los antibióticos conocidos parece ser inevitable, la velocidad a la cual aparece puede ser reducida mediante el uso racional de estos medicamentos así como los factores de riesgo que deben tomarse en cuenta. La presente investigación permitirá identificar la resistencia a los antimicrobianos y su importancia en las infecciones intra-hospitalarias como en el Hospital Obrero la cual nos proporcionara una alternativa terapéutica dirigida en funciones a los perfiles de resistencia y sensibilidad de esta bacteria, de esta manera se podrá clasificar a los antimicrobinos de primera elección y una alternativa, conoceremos otros antimicrobinos según su eficacia que podrán ser incluidos en el tratamiento.

Teniendo en cuenta la capacidad de los quelantes para interactuar con el Zn^{2+} del sitio activo, muchos ensayos fenotípicos empleados en la detección

de MBLs han empleado distintas combinaciones de este tipo de inhibidores (21). Sin embargo, ningún método fenotípico ha sido suficientemente estandarizado o recomendado para la temprana detección de MBLs en el laboratorio de bacteriología en la atención primaria.

En este sentido se vio la necesidad de realizar un estudio destinado a conocer la prevalencia de MBLs en *P. aeruginosa*, el laboratorio de bacteriología del Hospital Obrero donde se observa un nivel de resistencia con una cifra significativa de pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* resulta importante determinar la prevalencia de MBLs para establecer una conducta adecuada de los funcionarios de salud en relación a un tratamiento correcto y el manipuleo de instrumental y de curación por parte de los funcionarios de salud y de esta manera reducir las complicaciones posteriores.

Por lo mismo la evaluación de MBLs en *P. aeruginosa* permitira detectar la resistencia a los antibióticos según sexo, edad y servicio a través de la prueba en placa con monodiscos de EDTA para diagnosticar las metalo- - lactamasas, de esta manera mediante un análisis estadístico se conseguirá orientar sobre la necesidad del uso adecuado de los antibióticos y un tratamiento alternativo dirigida en función a los perfiles de resistencia y sensibilidad para este tipo de cepas y poder corroborar en que tipo de muestras es mas frecuente el aislamiento y de esta manera mejorar la salud del paciente.

1.2 Planteamiento del problema

La resistencia por *P. aeruginosa* en los últimos 10 años se ha incrementado considerablemente lo que nos indica que las infecciones son exclusivamente adquiridas en los hospitales debido a que se encuentran en el medio ambiente y por su capacidad de adherencia a las superficies. Tienen como forma clínica más frecuente las bacteriemias, neumonías, meningitis, infecciones urinarias y sepsis que van aumentando cada vez más.

Se a podido observar la asociación que existe entre algunos factores de riesgo y la colonización por estas cepas tales como la internación hospitalaria, los procedimientos invasivos como cateterismo venoso de diálisis, intubación endotraqueal, hospitalización prolongada, presencia de sondas, tratamientos previos con antibióticos y la convivencia con los trabajadores de salud que están en contacto constante con los pacientes y uno de los factores mas importantes los mecanismos de resistencia que pueden presentar ya sea de forma constitutiva o inducible llevando al paciente a la muerte.

En este estudio se pretende un acercamiento al problema de resistencia antimicrobiana ya que las dificultades en su detección, así como la localización de estos genes en elementos móviles tales como los integrones, facilitan la expansión de estos elementos de resistencia, lo que supone un importante reto a la terapéutica antimicrobiana actual. Por este motivo nos plantemos el estudio de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes en nuestro hospital, con el fin de estudiar su patrón de sensibilidad antibiótica y en la determinación de prevalencia de la metalo- - lactamasa en *P. aeruginosa* en pacientes internados y aquellos que asisten al Hospital Obrero en diferentes muestras biológicas, durante la gestión del 2009 a travez de paquetes estadísticos. Se describirá el porcentaje de cepas encontradas y profundizaremos en los mecanismos de resistencia y la presencia de factores de riesgos reconocidos por la bibliografía.

1.3 Marco teórico y conceptual

1.4.1 Identificación de *Pseudomona aeruginosa*

El género *Pseudomona*, que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, esta constituido por bacterias gramnegativas, ampliamente difundidas en la naturaleza. La especie con mayor importancia médica es *P.*

aeruginosa es un bacilo gramnegativo aerobio estricto, no fermentador de los hidratos de carbono, provisto de un flagelo polar que le confiere motilidad, y de *pili* que le permite adherirse a la superficie. Crece fácilmente en los medios de cultivo ordinario como agar sangre donde forma colonias planas, de olor peculiar y color azul-verdoso debido a la producción de pigmentos, piocianina y pioverdina, crece fácilmente sobre muchos tipos de medios de cultivo, a veces produce un olor dulzón semejante al jugo de uva o de maíz, algunas cepas causan hemólisis, forma colonias redondas y lisas de color verde fluorescente (4). Pueden originar también otros pigmentos: uno de color rojo oscuro y otro negro, denominados respectivamente, piorrubina y piomelanina. El nombre de *aeruginosa* (óxido de cobre) hace referencia a estos pigmentos.

Crece bien de 37 a 42 °C y a la última temperatura ayuda a diferenciarla de otras especies de *Pseudomonas* en el grupo fluorescente, oxidasa-positiva, no fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa presencia de pigmento fluorescente. Con frecuencia se observa en escaso número en la flora intestinal normal y sobre la piel de los humanos, es el principal patógeno del grupo. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en íntima asociación con ambientes húmedos. Ello se debe a que los requerimientos nutritivos del microorganismo son mínimos, hasta el extremo de que es capaz de multiplicarse en agua destilada. *P. aeruginosa* es un microorganismo nosocomial que puede ocasionar infecciones endémicas así como brotes epidémicos. Se puede aislar en hospitales a partir del agua de grifos, de los desagües, lavados, suministros líquidos diversos e incluso de ramo de flores, sin contar presentes normalmente en la flora del personal hospitalario. Si bien su predilección son los ambientes húmedos la *P. aeruginosa* es primariamente un patógeno hospitalario y causa enfermedad en forma frecuente. (9)

1.4.2 P. aeruginosa como patógeno nosocomial

Las infecciones comunes producidas por *Pseudomonas* incluyen bacteriemias “particularmente importantes en huéspedes inmunocomprometidos” otitis externa y media, infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario, e infecciones de herida en pacientes quemados. También puede causar infecciones del sitio quirúrgico.

Otras infecciones como osteomielitis, artritis, infecciones de piel, infecciones gastrointestinales, del sistema nervioso central generalmente seguidas de una cirugía endocarditis, abscesos han implicado a la *Pseudomonas*. Las pseudo infecciones se han reportado frecuentemente en pacientes con bronoscopías donde se utilizaron endoscopios.

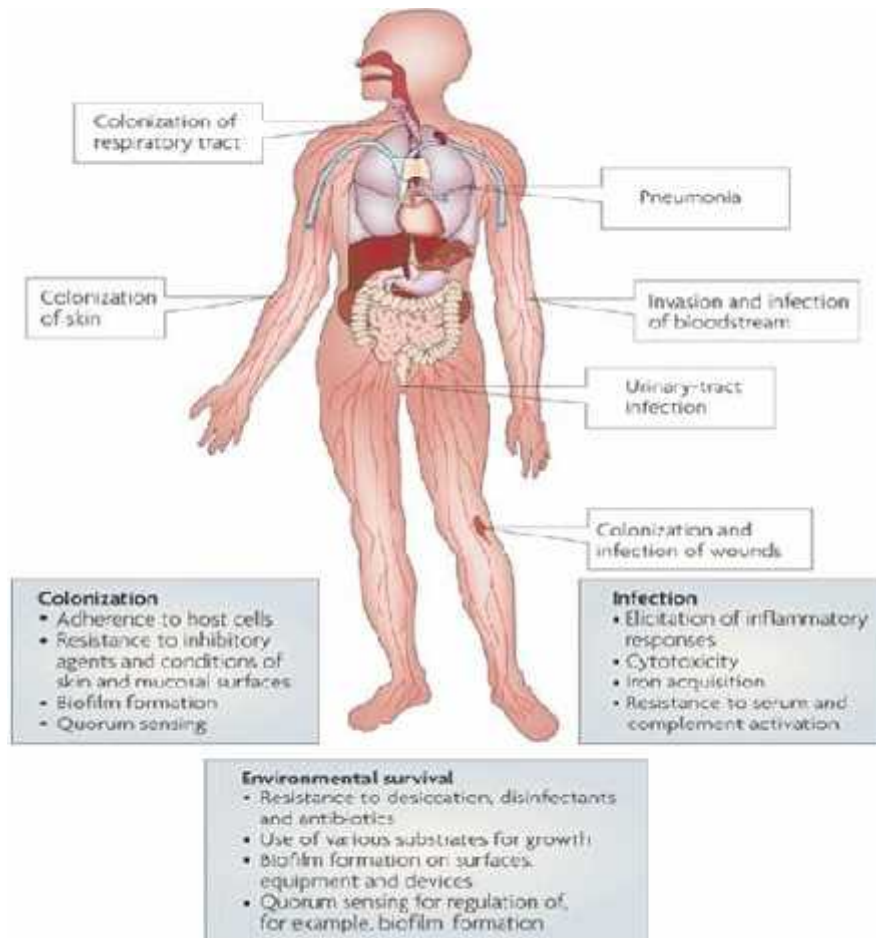


Figura 1.- Localización de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una causa frecuente de bacteriemia primaria o secundaria, siendo en la actualidad responsable del 10% - 20% del total de las sepsis por gramnegativos, esta afecta especialmente a pacientes neutropenicos por enfermedades neoplásicas tratados con citostaticos, en los extremos de la vida, diabéticos, transplantados y quemados e infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Existe una serie de factores de mal pronóstico ante una bacteriemia por *P. aeruginosa*: neutropenia persistente o inferior a 100 células/ml, shock séptico, terapia antibiótica inadecuada, origen pulmonar, cutáneo o desconocido, insuficiencia renal, focos metastasicos y presencia de enfermedad fulminante.

Se distingue una forma primaria por aspiración no bacteriémica y otra hematógena por metástasis en el transcurso de una sepsis. La primera puede aparecer en pacientes hospitalizados con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fallo cardiaco o sida así como en pacientes traqueotomizados o que reciben inhalaciones con aparatos provistos de reservorio contaminados por *Pseudomonas* mientras que las formas bacteriemias suelen aparecer en pacientes neutropenicos de gravedad.

Mientras que la meningitis extrahospitalaria por *P. aeruginosa* es excepcional, la intrahospitalaria no es infrecuente. Esta bacteria puede llegar a la meninges: a) por manipulación neuroquirurgicas, ya sean diagnósticas o terapéuticas; b) por extensión directa desde infecciones otosinomastoideas; c) por traumatismos, y d) por vía hematógena, sobre todo en pacientes con hemopatías malignas.

Las infecciones urinarias son comunes en pacientes sometidos a manipulaciones (sondajes, cistoscopia) u operaciones (resección endoureteral prostática) de las vías urinarias y también en las infecciones urinarias crónicas tratadas en forma prolongada con antibióticos.

P. aeruginosa es responsable del 70% de los casos de otitis externa. Cursa con escasa secreción sanguinolenta o purulenta. La otitis externa maligna es una forma grave que se observa en diabéticos, habitualmente ancianos que es capaz de invadir y destruir por antigüedad el cartílago y los huesos, y provocar parálisis de los pares craneales (precozmente el VII y posteriormente el IX, X y XI) y meningitis.

A excepción de algunas formas de infección por *Pseudomonas* como la otitis externa (no maligna) o la dermatitis por exposición a aguas contaminadas por ejemplo piscinas que no suelen precisar tratamiento antibiótico, la mayoría de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* requieren el uso de uno o más antibióticos. (9)

TRATAMIENTO: Habitualmente, los antibióticos de elección con capacidad antipseudomónica son: aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina), algunas cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefoperazona, cefepima), algunas penicilinas de amplio espectro (ticarciclina, ticarciclina/ ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina/tazobactam, mezlocilina, azlocilina), carbapenems (imipenem, meropenem), monobactams (aztreonam) y fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino). Las quinolonas no se aconsejan en pediatría por la posibilidad de que inhiban el desarrollo de los cartílagos de crecimiento. Todos estos antibióticos están disponibles vía parenteral y las fluoroquinolonas tanto vía oral como endovenosa. En la mayoría de las infecciones graves por *Pseudomonas* se combina el uso de dos antimicrobianos con capacidad antipseudomónica.

Los carbapenems, imipenem y meropenem, son antibióticos con un amplio espectro de actividad, pero ya se han descrito resistencias, principalmente en bacilos gram negativos no fermentadores, pero también entre las enterobacterias (30).

Los antibióticos se emplean a dosis plenas e incluso a dosis supramáximas para infecciones en lugares donde la difusión de antibióticos no es buena (por ejemplo, globo ocular o sistema nervioso central). Para algunas infecciones crónicas o de curso prolongado como la osteomielitis o la otitis externa maligna puede emplearse un único antibiótico como una fluoroquinolona por vía oral, aunque puede ser difícil erradicar totalmente el microorganismo. Especial mención merece el manejo de las infecciones pulmonares por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. Está claramente establecida la eficacia del tratamiento antibiótico durante las exacerbaciones, pero no tan clara la eficacia de distintos procedimientos en los períodos intercrisis como son: empleo periódico de antibióticos, lavado broncoalveolar periódico y antibióticos en aerosol. Ciertas infecciones por *P. aeruginosa* requieren intervenciones quirúrgicas como es el caso del desbrindamiento de abscesos (por ejemplo, cerebral), tejido necrótico (por ejemplo, otitis externa maligna u osteomielitis) o prótesis infectadas. La endocarditis izquierda es una indicación de recambio valvular precoz, la perforación intestinal (por ejemplo, enterocolitis necrosante) de laparotomía urgente y así mismo puede precisar cirugía la obstrucción urinaria.

El tratamiento de estas infecciones, ya sean de origen nosocomial o adquiridas en la comunidad, representa un verdadero reto terapéutico. En este sentido, el tratamiento de una infección grave como la bacteriemia es un claro ejemplo ya que la evolución clínica favorable del proceso está influenciada por la correcta elección de la terapéutica antimicrobiana inicial. Esta elección no suele ser fácil ya que *P. aeruginosa* se caracteriza por expresar una resistencia natural (intrínseca) a diversos antibióticos y por su capacidad para desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos durante el tratamiento mediante la adquisición de genes de resistencia situados en elementos genéticos

móviles (plásmidos, integrones) o a través de mutaciones que alteran la expresión o la función de mecanismos de codificación cromosómica.

D. Factores de virulencia

A.1 Estructura del lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El LPS de *P. aeruginosa* es un factor de virulencia, y a diferencia de otras bacterias esta molécula presenta dos componentes distintos: la banda A y la banda B. La banda A es un polímero de D-ramnosa que producen la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, mientras que la banda B tiene una estructura variable y determina el serotipo de las cepas. Esto ha sido usado para identificar y clasificar los distintos aislamientos de esta bacteria.

A.2 Formación de biopelículas

Cuando *P. aeruginosa* se adhiere a una superficie, las células se diferencian para formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una película. Las biopelículas tienen una estructura muy compleja, en la que se pueden distinguir canales por los que se intercambian oxígeno y otros sustratos con la fase acuosa. Recientemente se reportó que los ramnolípidos tienen un papel importante en la formación de estos canales. La matriz extracelular está constituida en parte por alginato, pero éste no constituye el material más abundante (11).

Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos (llamadas planctónicas), una de las diferencias más aparentes es su

disminuida sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos, incluyendo algunos elementos de la respuesta inmune. Se considera que la mayor proporción de las células de *P. aeruginosa* que viven en el medio ambiente se encuentran formando biopelículas. Asimismo, el análisis microscópico de los pulmones de pacientes con fibrosis quística muestra que *P. aeruginosa* también se encuentra dentro de este tipo de estructuras. Recientemente se demostró que el sistema Las "sensor de quorum" tiene un papel central en la formación de biopelículas, ya que mutantes en el gen *lasI* no producen estas estructuras, salvo en el caso en el que se adiciona el autoinductor PAI1.

E. Proceso de infección

Los factores que contribuyen a la patogénesis y virulencia incluyen la capacidad de adherencia, producción de toxinas y producción de glycocalix. La adherencia de la *Pseudomonas* al epitelio celular, se ve favorecida por la injuria celular "conocida como adherencia oportunista" procesos tales como la intubación, cateterización urinaria, y trauma que crea injuria celular, pueden facilitar la adherencia de la *Pseudomonas*. Las toxinas pueden causar necrosis y la producción de glycocalix puede favorecer la formación de un biofilm mucoso alrededor de las colonias de *Pseudomonas*, formando una barrera contra las defensas del huésped, los antibióticos y desinfectantes.

Los pacientes que presentan las defensas bajas son los más propensos a contraerla. Inicialmente se presenta con fiebre alta, dificultad para respirar, tos con flema o expectoración y leucocitosis, es decir, incrementan los glóbulos blancos. Luego se dan severas

infecciones urinarias, gastrointestinales y en la piel, y por último ataca agresivamente al sistema nervioso central.

F. Epidemiología

De acuerdo a distintas fuentes bibliográficas, la *Pseudomonas* es responsable del 17% de las neumonías asociadas a asistencia respiratoria mecánica, 11% de infecciones del tracto urinario, y 3.8% de bacteriemias primarias en las unidades de cuidados intensivos de adultos. Sin embargo en las unidades de pacientes quemados la *P. aeruginosa*, es causa del 21.5% de las neumonías; 20% de las infecciones urinarias y 9% de las bacteriemias primarias. Otros estudios muestran que la *P. aeruginosa* es el gram negativo mas frecuentemente aislado (27%) y el mas comúnmente encontrado en los cultivos de traqueostomías (9).

Las epidemias involucran endoscopios contaminados, provocando pseudo infecciones por inadecuado procesamiento de los mismos en el lavado automático o manual, secado e inmersión en desinfectantes sin tener en cuenta los canales y sus accesorios. Además el secado incompleto y el almacenamiento húmedo. Otros equipos como nebulizadores, analizadores de oxígeno, monitoreo urodinámico, máquinas de diálisis, también han sido reportados como responsables en epidemias por éste germen.

El agua también se ha implicado como fuente de epidemias hospitalarias por *P. aeruginosa*. Por ejemplo una epidemia encontró que el agua caliente de baño de soluciones de plasma y albúmina para transfusiones en neonatología se había contaminado con este germen. La contaminación del agua corriente, de piletas, palanganas, tanques de hidroterapia, máquinas de hielo y otros reservorios del medioambiente hospitalario con agua han sido fuente de infección de *P. aeruginosa*.

La contaminación con *P. aeruginosa* de las manos de los trabajadores de la salud, puede contribuir a la infección cruzada entre pacientes. Otra reciente epidemia sugirió que las uñas postizas de una enfermera colonizada con *P. aeruginosa* dispersó el germen en una unidad de neonatología. Otra epidemia de ventriculitis en pacientes con catéter de derivación externa, relacionó las manos colonizadas del personal con la diseminación del microorganismo.

1.4.3 Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana puede definirse como "una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. (28)

La resistencia bacteriana obliga al desarrollo y utilización de nuevos antibacterianos, que son más costosos y a veces más tóxicos que los empleados habitualmente. Cuando se lanza al mercado un fármaco antibacteriano, se define el espectro de microorganismos sobre los cuales es eficaz, pero luego este patrón va cambiando a medida que la droga se utiliza clínicamente, llegando en algunos casos a caer en el desuso.

C. Resistencia natural a antibióticos

La membrana externa de las bacterias gram-negativas es una membrana semipermeable, formada principalmente por el lipopolisacárido, que permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos. La permeabilidad de la membrana externa depende principalmente de las porinas, que son proteínas formadoras de poros con una baja especificidad, y de los sistemas de transporte específicos. La baja permeabilidad de las porinas de la membrana

externa de *P. aeruginosa* tiene un papel importante en el alto nivel de resistencia natural a los antibióticos de esta bacteria.

La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a múltiples antibióticos sin relación estructural se debe a varios factores: escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de una β -lactamasa cromosómica inducible tipo AmpC y la expresión constitutiva de diversos sistemas de expulsión activa, sobre todo MexAB-OprM. La participación conjunta de estos 3 factores condiciona resistencia natural a penicilina, aminopenicilinas, incluidas las combinadas con inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona, cefalosporinas de tercerageneración orales, cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina, novobiocina y ácido nalidíxico. La entrada de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño, como los antibióticos β -lactámicos, está restringida a unas estructuras concretas de la membrana externa, denominadas porinas, auténticos canales que generalmente están rellenos de agua. Esta limitación es más acusada en *P. aeruginosa* ya que la permeabilidad de la membrana externa es unas 90 veces inferior a la de *E. coli*. La porina más abundante en la membrana externa de *P. aeruginosa* es OprF, pero a pesar de su elevado número es una ruta poco eficiente para el paso de los antibióticos, probablemente debido a la propia "arquitectura" de la porina. La porina OprD permite el paso de moléculas zwitteriónicas, como los carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem) y OprC y OprE son porinas inducibles en anaerobiosis aun que es probable que estén presentes en pequeñas cantidades en cepas salvajes. (69)

Sin embargo, es claro que en *P. aeruginosa*, tanto la resistencia a antibióticos intrínseca como la adquirida, dependen principalmente de la presencia de un gran número de transportadores que secretan

estos compuestos al exterior de la célula. El mayor número de estos transportadores se agrupan en dos familias, según su parecido estructural, una de ellas está formada por los sistemas llamados eflux, y la otra se denomina MFS, por sus siglas en inglés (major facilitator superfamily). Los sistemas eflux están formados por tres proteínas, un intercambiador droga-protón, presente en la membrana interna, una proteína de membrana externa que parece formar un canal y una proteína periplásmica que une a las dos proteínas membranales. El sistema eflux que más contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* es el sistema AcrAB/MexAB que es capaz de transportar una amplia variedad de antibióticos como: quinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprima y -lactámicos (11).

D. Bases genéticas de la resistencia

Una de las aplicaciones prácticas más interesantes de los avances realizados en las últimas décadas en el campo de la Genética Bacteriana ha sido comprender los mecanismos genético-moleculares de la resistencia a antibióticos, lo que está permitiendo un "ataque" más racional a este problema clínico.(29) Una cepa bacteriana puede volverse resistente a un antibiótico por dos tipos principales de mecanismos: 1) Mutación espontánea en el cromosoma bacteriano 2) Obtención de plásmidos o elementos de inserción, transposones.

B.1 Selección de Mutantes Resistentes

Las mutaciones génicas se dice que son espontáneas cuando ocurren sin intervención de procedimientos mutagénicos experimentales. Las mutaciones bacterianas espontáneas son

aleatorias, y afectan a un gen cualquiera con frecuencias dentro del rango de 10^5 a 10^{10} por célula y división.

En los años 50 se observó el siguiente fenómeno: cuando un cultivo bacteriano de una cepa sensible a un antibiótico se pone en contacto con ese antibiótico, al cabo del tiempo se comprueba que todo el cultivo consta de bacterias resistentes.

Esta es precisamente la base genética del surgimiento de ciertas cepas patógenas resistentes a antibióticos: el fármaco inhibe o mata las bacterias silvestres sensibles, pero no afecta a los pocos individuos que por mutación espontánea hayan adquirido un alelo resistente; estos individuos se multiplican, de modo que al final son los más prevalentes.

El conocimiento de la frecuencia de aparición de mutación a resistencia a un quimioterápico o antibiótico en una determinada especie bacteriana, así como el sitio de acción de dicho fármaco, son factores importantes para una aproximación racional a la quimioterapia. Así en este tipo de casos hay que tratar con varios quimioterápicos simultáneamente.

B.2 Resistencia por intercambio genético

La principal amenaza al éxito de la quimioterapia está representada por la transmisión genética de plásmidos de resistencia a antibióticos (plásmidos R). Veamos un poco de historia: en los años 50, poco después de la introducción de los primeros antibióticos, se detectó en Japón un espectacular aumento de pacientes de disentería bacilar resistentes al tratamiento con varios de estos antibióticos. Pero aún más: los mismos pacientes tenían en sus intestinos cepas de *E. coli* (que

como sabemos ya, es un simple comensal que forma parte de nuestra flora endógena) que eran igualmente resistentes a esos antibióticos. Ello sugería que este tipo de plásmidos se podía transferir de unas especies a otras. La explicación del fenómeno de intercambio dependiente de contactos célula-célula, llamado conjugación.

Existen plásmidos R de distintos grupos de incompatibilidad. Son abundantes en *Pseudomonas* y en Enterobacterias, desde donde pueden ser transferidos a una amplia gama de bacterias Gram-negativas (plásmidos promiscuos). Aparte de los plásmidos R conjugativos existen otros no conjugativos, que sin embargo pueden ser transferidos entre distintas bacterias por otros medios:

Los plásmidos no conjugativos movilizables pueden ser transferidos por otro plásmido conjugativo compatible residente en la misma célula, por transducción por transformación (ADN desnudo del plásmido puede ser captado por una bacteria sensible receptora).

Los plásmidos R han evolucionado en respuesta a presiones selectivas ambientales (antibióticos usados por los humanos o inhibidores presentes en los medios naturales de las bacterias). Son capaces de conferir varias resistencias simultáneamente a las bacterias que los adquieran.

1.4.5 Mecanismos de resistencia identificados

Para poder ejercer la actividad antimicrobiana es necesario que los antibióticos penetren dentro de la célula bacteriana y que se acoplen a estructuras específicas denominadas blancos estructurales, como por ejemplo las proteínas fijadoras de penicilina al nivel de la pared celular en

el caso de las penicilinas y otros β -lactámicos. Tal requisito hace que las bacterias básicamente cuenten con cuatro mecanismos principales para defenderse de la acción de los antimicrobianos:

- Mecanismo que disminuya el ingreso del antibiótico hacia la célula bacteriana por medio de alteraciones en la permeabilidad de la pared celular.
- Mecanismo que aumenta el egreso o eliminación del antimicrobiano una vez que dicho antibiótico logró penetrar al interior de la célula bacteriana (bombas activas de egreso o bombas de flujo).
- Mecanismo que altera la conformación molecular del blanco estructural que es afectado en la célula bacteriana por el antibiótico. La modificación del blanco hace que se altere, total o parcialmente, la capacidad de fijación del antimicrobiano al blanco celular lo que disminuye o anula su efecto nocivo contra el microorganismo.
- Mecanismo de inactivación enzimático del antimicrobiano dentro o fuera de la célula bacteriana. Estos mecanismos son los más eficientes puesto que modifican o destruyen al antimicrobiano antes de que pueda ejercer su efecto contra la célula bacteriana.

E. Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa

La membrana externa de Gram-negativos supone una barrera natural que hace que muchas bacterias de este grupo sean insensibles a varios antibióticos. No todas las bacterias Gram-negativas son igualmente impermeables a los mismos antibióticos: Entre las menos

impermeables están *Haemophilus* y *Neisseria*, que dejan pasar a numerosos β -lactámicos, las Enterobacterias suelen ser intermedias.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son insensibles a la mayoría de antibióticos β -lactámicos, porque no pueden pasar a través de la membrana externa. Se han aislado mutantes que se han vuelto resistentes a los β -lactámicos de última generación: el cambio ha afectado a una determinada porina que ahora no deja pasar a estos nuevos antibióticos.

Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de bacterias Gram negativas que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Los carbapenems llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión (34). Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenems. De esta manera, la velocidad de acumulación de los carbapenems en el espacio periplasmático disminuye notablemente. Normalmente la pérdida de porinas no confiere una resistencia franca y sólo eleva los valores de CIM para carbapenems sin superar los puntos de corte que determinan resistencia (34).

En las especies de *Enterobacteriaceae*, son varias las porinas que participan en el transporte de carbapenems (35, 32); aparentemente, las porinas de gran tamaño son las más importantes en este proceso y son, entonces las que deben perderse para disminuir significativamente la permeabilidad de la membrana externa a los carbapenem (31, 32, 33). Aun que la pérdida de estas porinas ayuda

al surgimiento de resistencia, en esta bacteria no es el mecanismo más importante. Por otro lado, en *P. aeruginosa*, una porina específica de sustrato, llamada OprD, es la encargada de transportar los carbapenem a través de la membrana externa (35). Su pérdida eleva considerablemente la CIM de imipenem y, en menor grado, la de meropenem (35).

La porina OprD permite la entrada al interior de *P. aeruginosa* de aminoácidos, péptidos pequeños y carbapenémicos (70). Como OprD es la principal vía de entrada de los carbapenémicos, la pérdida de esta porina comporta una disminución de la sensibilidad de *P. aeruginosa* a estos antibióticos (70). En comparación con imipenem, la entrada al interior de la célula de meropenem parece verse menos afectada ya que en cepas sin OprD, la CIM de imipenem tiene un valor entre 8–32 mg/ml y la de meropenem entre 2–4 mg/ml (ANEXO 1). Por ello se sugirió que meropenem podría utilizar otras vías de entrada a través de la membrana externa de *P. aeruginosa*. Estudios recientes realizados empleando el fenotipo salvaje y el mutante OprD deficiente, demuestran que se produce una disminución de la sensibilidad a todos los carbapenémicos. Así, para meropenem se observa un aumento de los valores de CIM entre 4 a 32 veces, para imipenem entre 4–16 veces y para doripenem entre 8–32 veces. La potencia intrínseca de meropenem y doripenem frente a *P. aeruginosa* es 4 veces superior a la de imipenem. Por ello, como en las cepas sin mutación los valores de CIM de imipenem ya son de 1–4 mg/ml, al producirse la pérdida de la porina OprD, la CIM de este carbapenémico es más elevada que la de meropenem.

F. Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de bombas de flujo

Alteración del mecanismo de transporte del antibiótico, cuando el antibiótico accede al interior bacteriano por algún mecanismo de

transporte específico, una mutación que afecte a dicho sistema de transporte supondrá una mayor resistencia al antibiótico.

Las bombas de flujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos. La expresión de estas bombas puede ser permanente (expresión constitutiva) o intermitente (expresión que puede inducirse) (35). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna bomba de flujo capaz de expulsar al imipenem (36). En *P. aeruginosa*, el sistema de flujo MexABOprM es capaz de transportar meropenem y su expresión exagerada conduce a la elevación de la CIM del antibiótico (35). En Enterobacteriaceae no se ha reportado la participación de bombas de flujo en el desarrollo de resistencia a los carbapenem.

El análisis del genoma de *P. aeruginosa* ha revelado que este microorganismo posee diversos sistemas de expulsión activa integrados en 5 “superfamilias”, aun que predominan los que pertenecen a la familia RND (resistance-nodulation-division) (70). Este sistema está integrado por 3 componentes básicos: una proteína localizada en la membrana citoplasmática que actúa como transportador, un segundo componente representado por una proteína o factor de membrana externo y el sistema se completa con una tercera proteína situada en el espacio peripásmico que une las otras. Los sistemas de expulsión más frecuentes en *P. aeruginosa* son MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM. Afectan en mayor o menor grado la actividad no solo de los antibióticos β -lactámicos y carbapenémicos sino también de otros antibióticos (fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, lincomicina, novobiocina) (40, 45). Los sistemas MexAB-OprM y MexXY-OprM participan en los mecanismos de resistencia natural y adquirida a varios antibióticos mientras que MexCD-OprJ, MexEF-

OprN solo actúan en casos de resistencia adquirida (40). En el (ANEXO 1) se resumen los principales fenotipos de resistencia esperados según el sistema de expulsión activa expresado. La sobre producción de MexAB-OprM se produce por un incremento de la transcripción del operón mexAB-oprM debido a mutaciones en el gen de localización cromosómica mexR que codifica la proteína represora MexR. La sobre expresión de MexAB-OprM condiciona una disminución de la actividad de carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam. También se observa una disminución de la actividad de meropenem mientras que imipenem no se afecta debido a la diferente estructura molecular a nivel de la cadena lateral. El operón mexCD-oprJ está gobernado negativamente por NfxB, producto del gen nfxB. Mutantes nfxB conducen a una hiperexpresión de MexCD-OprJ que afecta a antibióticos β -lactámicos con una preferencia sobre las cefalosporinas de 4.a generación (cefepima, cefpiroma). Se han descrito 2 tipos de mutantes, A y B, con diferente nivel de producción de MexCD-OprJ y sensibilidad a los antibióticos (40). La expresión del operón mexEF-oprN, adiferencia de lo que ocurre con los comentados previamente, no está suprimida por un regulador negativo. MexT, producto del gen mexT y miembro de la familia LysR de activadores, actúa regulando de forma positiva este operón. Las cepas que sobreexpresan MexEF-oprN se caracterizan por expulsar fluoroquinolonas y por manifestar una disminución de la sensibilidad a carbapenémicos, en especial imipenem. Esta pérdida de sensibilidad se asocia a una disminución de la porina OprD en cuya expresión participa MexT (40).

G. Modificación del sitio blanco

El sitio blanco de los carbapenem, y de todos los β -lactámicos, son las proteínas unidoras de penicilinas (PUP), macromoléculas que

hacen parte de la membrana citoplasmática y participan en la síntesis de la pared bacteriana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los β -lactámicos, pero que no afectan su actividad funcional. Aun que la producción de proteínas unidoras de penicilinas con baja afinidad por los β -lactámicos no es un mecanismo de resistencia común entre los Gram negativos, el número de reportes se ha incrementado en los últimos años (37). Recientemente, en *A. baumannii* se describió que la ausencia de dos proteínas unidoras de penicilinas, una de 73,2 kd (PUP2a) y otra de 70,1 kd (PUP2b), se relaciona con resistencia de bajo grado a imipenem, meropenem o ambos (38).

H. Inactivación Enzimática Del Antibiótico

Este tipo de mecanismo depende en muchos casos de plásmidos R. Los ejemplos típicos son las resistencias a β -lactámicos, la resistencia al cloranfenicol y las resistencias a aminoglucósidos. La resistencia a β -lactámicos por acción de β -lactamasas, ciertas bacterias producen penicilinasasa (β -lactamasa), capaz de abrir el anillo β -lactámico de la penicilina para dar ácido peniciloico, que carece de actividad antibacteriana. Lo mismo ocurre con las cefalosporinas, donde la β -lactamasa (cefalosporinasasa) genera un producto inestable inactivo que se descompone rápidamente. Sin embargo, la naturaleza de la cadena lateral (grupo acilo, R) influye notablemente en la susceptibilidad de rotura del anillo β -lactámico por las lactamasas.

Las β -lactamasas codificadas por cromosoma y de bajo nivel (β -lactamasas de tipo TEM). Están muy distribuidas entre bacterias Gram-negativas, y confieren resistencia a cefalosporinas y penicilinas. La base de la resistencia en muchos casos es la siguiente: cuando se expone la bacteria al β -lactámico durante

mucho tiempo, pueden seleccionarse determinadas mutaciones en genes cromosómicos que codifican proteínas parecidas de tipo PBP, de modo que adquieren un fuerte promotor que permite su expresión a alto nivel. Este tipo de β -lactamasa es excretada al medio, donde inactiva al antibiótico.

En lo que refiere a los antimicrobianos β -lactámicos el cuarto mecanismo de resistencia arriba citado requiere la producción de enzimas, denominadas β -lactamasas, capaces de hidrolizar el anillo de la molécula β -lactámica al romper una de las uniones de tipo amida la alteración estructural resultante en la molécula β -lactámica destruye su habilidad de afectar al organismo microbiano (1).

La reducción de porinas OprD y la sobreexpresión de bombas de expulsión activa MexAB-OprM son los más frecuentes mecanismos de resistencia a los carbapenemes, pero no los únicos (26,37). Por el momento las carbapenemasas no están muy extendidas, pero constituyen un mecanismo de resistencia importante debido a que están localizadas en elementos móviles, los integrones de clase I, y tienen una transmisión horizontal. Habitualmente estos integrones contienen también cassettes de resistencia a los aminoglucosidos.

P. aeruginosa puede exhibir resistencia tanto en forma disociada a imipenem (IMI) o meropenem (MER) como también a ambos carbapenemes simultáneamente. La resistencia sólo a MER está frecuentemente asociada a la hiperproducción del sistema de flujo constitutivo MexAMexB-OprM (23). Por su parte, el mecanismo de resistencia a IMI más común es la impermeabilidad originada por el déficit de la proteína OprD (42), sumada a la presencia de β -lactamasas cromosómicas tipo AMP-C (22).

En algunas ocasiones la expresión del sistema de flujo denominado MexE-MexF-OprN podría estar implicada en la resistencia a IMI (23).

La resistencia simultánea a ambos carbapenemes indica, o bien la coexistencia de dichos mecanismos, o la producción de enzimas con capacidad de hidrolizarlos, denominadas carbapenemasas (39). Estas pueden corresponder a serino-enzimas o metalo- β -lactamasas (MBLs).

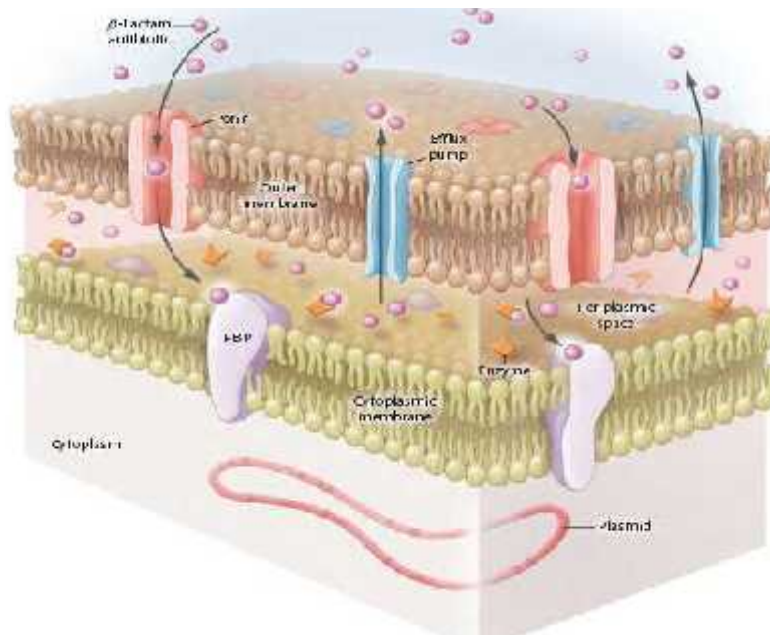


Figura 2.- Esquema de mecanismo de resistencia

1.4.5 Resistencia a antibióticos β -lactámicos

El fenotipo “salvaje” o sensible de *P. aeruginosa* a los antibióticos β -lactámicos se caracteriza por su sensibilidad a carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina), ceftazidima, cefsulodina, cefepima, cefoperazona, aztreonam y carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem). En *P. aeruginosa*, el mecanismo más importante de resistencia adquirida a los antibióticos β -lactámicos se debe a la producción de β -lactamasas. En este microorganismo podemos encontrar los cuatro tipos de enzimas descritos según la clasificación molecular de Ambler: A,C,D(serino- β -lactamasas) y B(metallo- β -lactamasas).

1.4.6 β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas producidas por bacterias que inactivan los β -lactámicos al hidrolizar el anillo beta-lactámico de los mismos. La mayoría de las betalactamasas inactivan ya sea penicilinas o cefalosporinas pero algunas son capaces de inactivar ambos tipos de antibióticos. La mayoría de bacterias gram-positivas secretan sus β -lactamasas de forma que los agentes antimicrobianos β -lactámicos son inactivados extracelularmente, en el medio que las rodea.

En contraste, las β -lactamasas de las bacterias gram-negativas permanecen dentro de la célula e inactivan los β -lactámicos en el espacio periplásmico, esto es en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplásmica. (14)

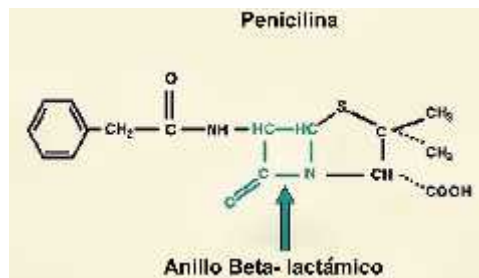


Figura 3.- Molécula de Penicilina con el anillo β -lactámico resaltado

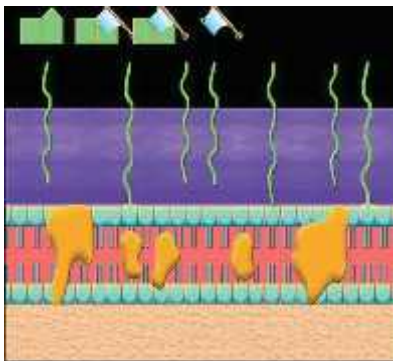


Figura 4.- Beta-lactamasas en organismos Gram (+)

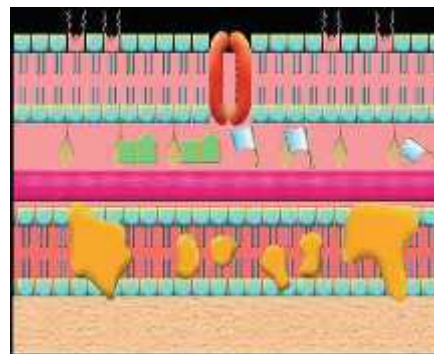


Figura 5.- Beta-lactamasas en organismos Gram (-)

Los genes que codifican a las β -lactamasas pueden ubicarse en el cromosoma bacteriano, en los plásmidos o en los elementos de transposición. Por ejemplo:

- El gen de β -lactamasa que media en la resistencia del *Staphylococcus aureus* a la penicilina está típicamente ubicado en un plásmido.
- El gen de β -lactamasa que media en la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a la ampicilina y ticarcilina está ubicado en un cromosoma.
- Los plásmidos y elementos de transposición refuerzan la diseminación de genes de β -lactamasa entre una variedad de especies bacterianas.

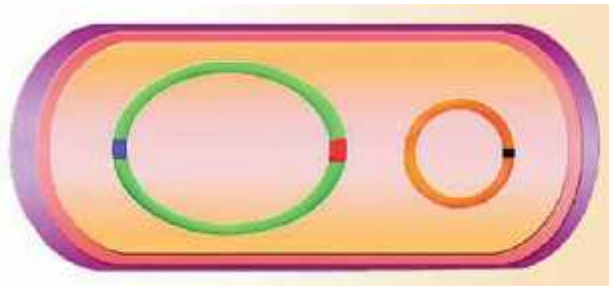


Figura 6.- Bacteria con cromosoma circular y plásmido

A. β -lactamasas Inducible

La producción de β -lactamasa inducible se inicia o induce cuando las bacterias que poseen un gen de β -lactamasa se exponen a un agente β -lactámico. La acción de los agentes antimicrobianos en la pared celular activa un mecanismo genético en cascada que inicia la producción de β -lactamasa. La producción de β -lactamasa cesa ante la ausencia de los agentes antimicrobianos en la pared celular o alrededor de ella.

B. β -lactamasas Constitutiva

Las β -lactamasas constitutivas son aquellas que la bacteria produce en forma continua. Un ejemplo de producción de β -lactamasa constitutiva es la enzima cromosómica SHV-1 de *K.*

pneumoniae que interviene en la resistencia a la ampicilina y ticarcilina (14).

C. Clasificación de β -lactamasas

Se han propuesto varios modelos de clasificación para las β -lactamasas de acuerdo con su espectro de hidrólisis, susceptibilidad a inhibidores, ubicación en genes (plásmido o cromosoma), y secuencia de genes o de proteínas. Existen dos sistemas principales de clasificación:

- Fenotípica (Bush): considera el espectro de hidrólisis y la respuesta a inhibidores.
- Estructural (Ambler): considera la secuencia genética de la enzima.

La clasificación de Ambler se basa en la estructura molecular de la β -lactamasa y su secuencia de aminoácidos. Esta clasificación que en forma inicial, fue introducida por Ambler en 1980, reconoce cuatro tipos moleculares designados de A hasta D. Los tipos A, C y D incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa. Las β -lactamasas de tipo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa y son inhibidas por EDTA.

La clasificación de Bush se basa en los sustratos que la β -lactamasa hidroliza y en la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA, y aztreonam u oxacilina. Este modelo funcional de clasificación de la β -lactamasas, propuesto por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, define los cuatro siguientes grupos de acuerdo a los sustratos hidrolizados y perfiles de inhibición (14).

- Grupo 1 cefalosporinasas que no son adecuadamente inhibidas por el ácido clavulánico.
- Grupo 2 penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas que generalmente son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Los subgrupos también se definen de acuerdo a las tasas de hidrólisis de carbenicilina o cloxacilina (oxacilina) producidas por las penicilinasas del Grupo 2.
- Grupo 3 metalo- β -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenems que son inhibidas por EDTA y no por inhibidores estructuralmente relacionados a los β -lactámicos.
- Grupo 4 penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el ácido clavulánico.

Las MBLs, pertenecientes a la clase B de Ambler, y al grupo 3 de la clasificación de Bush *et al.* (16), constituyen las carbapenemasas adquiridas de mayor relevancia clínica ya que tienen capacidad de hidrolizar a todos los antibióticos β -lactámicos, excepto el aztreonam (AZT) y no ser inhibidas por los inhibidores suicidas. En cambio, quelantes como el EDTA, el ácido dipicolínico o derivados del ácido succínico, entre otros interaccionan con el Zn^{2+} , necesario para su acción, pero ninguno de ellos presentó utilidad clínica (41).

1.4.7 Mecanismo de resistencia para *P. aeruginosa*

La resistencia múltiple en Gram negativos es producto de una combinación de mecanismos de resistencia, algunos de ellos inherentes a la especie (resistencia intrínseca o natural) y otros adquiridos (resistencia adquirida por elementos móviles como plásmidos y

transposones), que finalmente se manifiestan como resistencia a una amplia gama de antibióticos.

La resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos representa un problema de gravedad creciente en Salud Pública. El empleo masivo de estas drogas genera un entorno selectivo para microorganismos patógenos resistentes, los cuales tienden a diseminarse. El principal mecanismo de resistencia presente en tales microorganismos es la generación de enzimas capaces de inactivar los antibióticos β -lactámicos, llamadas β -lactamasas. Las metalo- β -lactamasas (MBLs) constituyen la generación más reciente de estas enzimas, y se caracterizan por un amplio espectro de acción y su insensibilidad a inhibidores de uso clínico.

Por la multiresistencia *P. aeruginosa* puede estar implicado en tres mecanismos de resistencia, el primero tiene que ver con la producción de enzimas que hidrolizan al antibiótico como las metalo- β -lactamasas un tipo de carbapenemasas, asociadas a una secuencia de inserción que hace que la enzima se sobre exprese y los aislamientos sean resistentes. Otro mecanismo se relaciona con las bombas de flujo es decir que la bacteria al resistir sustancias como antibióticos que no necesita las rechaza inmediatamente evitando su acción. Un tercer mecanismo identificado fue la alteración de las proteínas de membrana externa denominadas porinas debido a que la membrana de la bacteria actúa como un filtro que selecciona las sustancias que deban pasar, un cambio o alteración en su perfil de proteínas de membrana externa tiene como resultado impedir el paso del antibiótico (2).

Usualmente, la resistencia a los carbapenem en bacterias Gram negativas ocurre por la combinación de dos o más mecanismos de resistencia y rara vez por la acción de un mecanismo único.

1.4.8 -lactamasas involucradas en la resistencia a carbapenems

Las dos -lactamasas que con mayor frecuencia pueden llevar a resistencia a los carbapenem son las del grupo AmpC y las carbapenemasas. Se han descrito dos tipos de carbapenemasas con base en estudios moleculares. Las primeras son enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual se han denominado carbapenemasas tipo serina. El segundo grupo son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática; éstas últimas son las denominadas metalo- -lactamasas (51).

Es común pensar que la producción de una carbapenemasa es suficiente para que la bacteria presente resistencia a los carbapenems. Sin embargo, en Enterobacteriaceae se ha demostrado que, además de la carbapenemasa, se requiere de la disminución de la permeabilidad de la membrana externa mediante la pérdida de porinas. En el primer reporte de una IMP-1 en Singapur (31), se encontró que de tres cepas de *K. pneumoniae* que producían IMP-1, sólo las que carecían de una porina de gran tamaño que registraban alta resistencia a los carbapenems, con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) $\geq 128\mu\text{g/ml}$, mientras que la cepa que conservaba la porina no alcanzaba a registrar valores de CIM suficientemente elevados para considerarla resistente. Así mismo, en un artículo de revisión elaborado por Livermore y Woodford (52), se muestra que en una cepa nativa de *E. coli* transformada con IMP-1, las CIM para imipenem y meropenem no fueron altas y el fenómeno se atribuyó a que la cepa de *E. coli* expresaba todas sus porinas.

E. -lactamasas tipo AmpC.

Las -lactamasas tipo AmpC, también llamadas cefalosporinasas, median la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefemicinas (cefotaxim y cefotetán) e inhibidores de -

lactamasas (44). *P. aeruginosa* produce una β -lactamasa cromosómica inducible de clase C (AmpC) codificada por el gen ampC similar a la de algunas enterobacterias (*Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *M. morgani*), mientras otras bacterias, como *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp., han adquirido el gen a través de plásmidos (46). Las β -lactamasas tipo AmpC presentan baja afinidad a los carbapenem; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplasmático permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se registre resistencia a los carbapenem (10).

Las bacterias que poseen el gen ampC en los cromosomas presentan un sofisticado sistema molecular que regula la expresión del gen, de tal modo que sólo se sintetiza la β -lactamasa cuando es necesaria (47). En condiciones normales esta enzima con actividad cefalosporinasa se secreta en pequeñas cantidades (bajo nivel de expresión) y es la responsable de la resistencia a aminopenicilinas y a cefalosporinas de espectro reducido. No se inhibe con ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Su producción puede incrementarse de 100 a 1.000 veces en presencia de antibióticos β -lactámicos inductores, como cefoxitina o imipenem, aun que es una sobre expresión reversible que desaparece al retirar el agente inductor. La producción de AmpC también aumenta cuando se producen mutaciones cromosómicas que afectan a las proteínas involucradas en su inducción, fenómeno que condiciona una expresión constitutiva de elevado nivel. Sin embargo, la desrepresión de AmpC en *P. aeruginosa* es un fenómeno más complejo que el que tiene lugar en las especies de enterobacterias que poseen esta enzima y el fenotipo de desrepresión puede ser parcial para evolucionar posteriormente a completo o total (40). Cuando la producción de AmpC está aumentada de forma

significativa, *P. aeruginosa* expresa resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos con la excepción de los carbapenémicos. A diferencia de lo que ocurre con los miembros de la familia Enterobacteriaceae, la desrepresión de AmpC en *P. aeruginosa* también afecta a cefepima. Aunque se pensó que ello podría ser debido a diferencias en la actividad hidrolítica de AmpC, los datos disponibles no apoyan esta idea y probablemente la impermeabilidad de la membrana externa junto con la sobreexpresión de AmpC serían los responsables de la menor actividad de cefepima. En el (ANEXO 2) se presentan los diferentes fenotipos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos según la expresión de la β -lactamasa AmpC. Los mecanismos que regulan la expresión de ampC son similares a los estudiados en *E. cloacae* y en su inducción participan diversos genes (40). ampG codifica una proteína de transmembrana (AmpG) que actúa como una permeasa para los muropéptidos liberados durante el proceso de formación de la pared celular. Una vez en el interior de la célula estos muropéptidos, que son considerados la molécula señal en la inducción de ampC, son modificados por otra proteína, AmpD, producto del gen ampD, dando lugar a la formación de péptidos libres y ácido murámico. Un tercer gen ampR, codifica un factor de transcripción, AmpR, perteneciente a la familia de proteínas reguladoras. En la mayoría de cepas con desrepresión de ampC se detectan mutaciones en el gen ampD que conducen a una expresión disminuida o inactivación de AmpD. En estas cepas se afecta el procesamiento de los muropéptidos, lo que conlleva un incremento de su cantidad en el citoplasma y permite su unión a AmpR que cambiaría su conformación y daría lugar a un aumento significativo de la expresión de ampC (40).

Usualmente, las bacterias que portan genes ampC en plásmidos producen la enzima de forma constitutiva (permanentemente) y en

gran cantidad (46). En estas bacterias, la alta concentración de la enzima, asociada con la pérdida de porinas o la expresión exagerada de bombas de flujo, es suficiente para desarrollar resistencia a los carbapenem. ACT-1, CMY-4 y, recientemente, ACC-1 (34, 49-50) son algunas de las β -lactamasas tipo AmpC presentes en plásmidos que se han identificado en enterobacterias resistentes a los carbapenems.

B. β -Lactamasas de clase A

Las β -lactamasas de clase A y pertenecientes al grupo funcional 2c de Bush hidrolizan la carbenicilina, ticarcilina y piperacilina. Se inhiben con β -ác. clavulánico y tazobactam pero su detección no siempre es fácil ya que puede interferir la inducción de la β -lactamasa cromosómica AmpC. Se han descrito diversos enzimas pertenecientes a este grupo. Los enzimas PSE-1, PSE-4 y CARB-3 son similares ya que solo difieren en 1 o 2 aminoácidos pero, en cambio, solo comparten un 86,3% de homología con CARB-41. Las cepas con carbenicilinasas (CARB) pueden manifestar una sensibilidad variable a cefepima y aztreonam pero, en ausencia de otros mecanismos de resistencia, siempre son sensibles a ceftazidima y carbapenémicos (ANEXO 2).

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de clase A pertenecen al grupo funcional 2b es responsable de la resistencia a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepima, cefpiroma y aztreonam. También se inhiben con β -ácido clavulánico y tazobactam y su afinidad por los carbapenémicos es baja, por lo que se mantiene la actividad de imipenem, meropenem y doripenem (ANEXO 2). En *P. aeruginosa*, como sucede en la familia Enterobacteriaceae, se han encontrado BLEEs derivadas de enzimas tipo TEM y SHV, pero además se han descrito otros tipos:

PER (PER-1), VEB, GES y BEL (BEL-1) (45). Los genes responsables de su síntesis están localizados en el cromosoma, plásmidos o integrones. El grado de hidrólisis de ceftazidima, cefepima y aztreonam depende del tipo de enzima que, por otra parte, se puede inhibir en mayor o menor medida con los diferentes inhibidores de β -lactamasas. Las BLEEs tipo GES tienen algunas características que debemos destacar. GES-1 se caracteriza por manifestar una actividad catalítica de bajo nivel así como una baja afinidad por la mayoría de los sustratos. A diferencia de la mayoría de las BLEEs de clase A, tiene una fuerte afinidad por la cefoxitina. GES-2, que difiere de GES-1 en una sola mutación, hidroliza a los carbapenémicos, por ello debe considerarse como una carbapenemasa de clase A la GES-2 se convierte en una carbapenemasa y ha sido reportada en una cepa de *P. aeruginosa* en Sudáfrica (11). La actividad catalítica para imipenem es 100 veces más elevada que la que expresa GES-1, pero es mucho más baja que la manifestada por las metalo- β -lactamasas de clase B.

Las serin-carbapenemasas del tipo KPC fueron descritas muy recientemente y, hasta el momento, todos sus genes codificadores se han encontrado en plásmidos. Todas las KPC presentan gran actividad hidrolítica contra aminopenicilinas, ureidopenicilinas, aztreonam y los carbapenems, y baja actividad hidrolítica contra las cefalosporinas de tercera generación (15).

C. β -lactamasas de clase D (oxacilinasas)

Las oxacilinasas (enzimas tipo OXA) son enzimas de clase D que pertenecen al grupo funcional 2d. Representan un amplio grupo de enzimas con un espectro hidrolítico muy desigual que generalmente están codificadas por genes integrados en plásmidos o integrones. Una característica de estas enzimas es que no se inhiben con ácido

clavulánico, sulbactam o tazobactam, con la excepción de OXA-18, lo que dificulta su detección en el laboratorio. La clasificación de las oxacilinasas es compleja. Poirel et al (70) acaban de publicar una revisión en la que dividen estas enzimas según su espectro de actividad y diversidad genética. Las enzimas OXA clásicas (OXA-1, OXA-2, OXA-10) se caracterizan por determinar resistencia a carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, pero no a ceftazidima (43). En el sub grupo OXA-1 se incluye OXA-31, que deriva de OXA-1 por la substitución de 2 aminoácidos. Ambas tienen la capacidad de hidrolizar a cefepima pero no a ceftazidima. Las oxacilinasas con mayor importancia clínica son las que expresan un espectro de actividad hidrolítica extendido que incluye cefotaxima, ceftazidima, cefepima, cefpiroma y aztreonam aun que el grado de actividad es variable. La mayoría de estas oxacilinasas se han encontrado en *P. aeruginosa* y derivan de β -lactamasas OXA con espectro reducido que han experimentado una mutación puntual. No obstante, también se han descrito enzimas con escasa similitud de aminoácidos con las clásicas OXA y que expresan el mismo espectro extendido. En general, las derivadas de oxacilinasas clásicas afectan sobre todo la actividad de ceftazidima con una actividad hidrolítica variable frente a cefepima y aztreonam. OXA-15, que deriva de OXA-2 hidroliza más ceftazidima que a cefepima y aztreonam y encambio, OXA-32, que también deriva de OXA-2 hidroliza ceftazidima pero no cefotaxima y es inhibida por cefoxitina.

Las enzimas OXA-11, OXA-14 y OXA-19 afectan principalmente la actividad de ceftazidima mientras que el substrato preferido de OXA-17 es la cefotaxima. Las diferentes variantes de OXA-10 determinan un nivel de resistencia de bajo nivel a cefepima pero alto para ceftazidima. La enzima OXA-18 tiene un grado de similitud con el resto de OXAs según el análisis de los aminoácidos que la componen inferior al 50%. Su actividad hidrolítica se parece al de

una BLEE de clase A y, a diferencia del resto de oxacilinasas, se inhibe con ácido clavulánico. En el año 2003 se describió una nueva enzima parecida a OXA-18 (66% de similitud), OXA-45. El perfil de los substratos que afecta es parecido y también se inhibe con ác. clavulánico. En el (ANEXO 1) se incluyen algunos fenotipos de resistencia según el tipo de enzimas de este grupo. Algunas oxacilinasas adquiridas tienen la capacidad de hidrolizar los carbapenémicos sin afectar de forma significativa a las cefalosporinas de espectro extendido. La mayoría de estos enzimas se han identificado en *Acinetobacter* spp. Sin embargo, recientemente se ha comunicado la detección de OXA-40 en 2 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en España (56).

A pesar de que hasta la fecha las oxacilinasas no han recibido tanta atención como las metalo- -lactamasas, es importante considerarlas como potencialmente peligrosas, pues aun que su actividad carbapenemasa es pobre, se incrementa si otros mecanismos de resistencia están presentes (como bombas de flujo o disminución en la permeabilidad) ocasionada por cambios en las porinas o por modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas (15, 53).

D.Metalo- -lactamasas

Las carbapenemasas que necesitan la presencia de Zn^{2+} en su centro activo se conocen con el nombre de metalo- -lactamasas. Son -lactamasas de clase B que determinan resistencia a los antibióticos -lactámicos, incluidos los carbapenémicos. Las metalo- -lactamasas se caracterizan por generar resistencia a los -lactámicos (oxiimino, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenem), aminoglucósidos y quinolonas, y presentan sensibilidad variable al

aztreonam, aunque el grado de resistencia a imipenem varía, CIM entre 4 mg/dl y 128 mg/ dl. Los monobactams, como el aztreonam, no se ven afectados por la actividad hidrolítica de estas enzimas (ANEXO 2).

Las metalo- β -lactamasas no se inhiben con ácido clavulánico ni tazobactam y en cambio, sí son inhibidas por quelantes iónicos divalentes como el EDTA. En *P. aeruginosa* se han identificado cuatro tipos de metalo- β -lactamasas: IMP, VIM, SPM y GIM. La primera carbapenemasa descrita en *P. aeruginosa* (IMP-1) se encontró en Japón durante un estudio realizado con cepas aisladas en los años 1992– 1994 (61) y, para 1996, estaba diseminada entre bacilos Gram negativos en todo el país (62). El gen responsable estaba localizado en un plásmido de gran tamaño (36Kb) y formaba parte de un “cassette” incluido en un integrón de clase I (In31). Desde entonces se han comunicado diversas variantes del enzima IMP en diferentes países: IMP-7, IMP-9, IMP-13, IMP-16, IMP-18.

La carbapenemasa VIM-1 se encontró en una cepa de *P. aeruginosa* aislada en Italia en 1997 (70). Su grado de similitud con IMP, según el análisis de los aminoácidos, es inferior al 30% aun que tiene el mismo espectro de hidrólisis. Hasta la actualidad se han descrito diferentes variantes de la carbapenemasa VIM-1 con un grado de similitud muy elevado entre ellas. Los genes responsables forman parte de un integrón localizado en un plásmido o en el cromosoma. Las descripciones más frecuentes corresponden a la VIM-2, en Colombia, se han detectado la VIM-2 y la VIM-8 en *P. aeruginosa* (54, 55), una metalo- β -lactamasa que también se ha encontrado en España (68). En el año 2008 se describió una nueva carbapenemasa, VIM-13, hallada en una cepa de *P. aeruginosa* aislada en Mallorca. El gen responsable, blaVIM-13, se encontraba en un integrón de clase I que también contenía

una nueva variante del gen *aacA4* que confiere resistencia a gentamicina y tobramicina. En el año 2002 se describieron dos nuevas metalo-β-lactamasas en Brasil y Alemania denominadas SPM-1 y GIM-1. La primera de ellas, descrita recientemente en Europa (69), tiene un elevado peso molecular debido a la presencia de un bucle que contiene 23 residuos de aminoácidos y manifiesta cierta actividad frente a aztreonam. El gen responsable de la síntesis de GIM-1, *blaGIM-1* se localiza en un integrón de clase 1 (*In77*) transportado en un plásmido de 22 kb y que contiene otros genes de resistencia: *aacA4*, *aadA1* y *blaOXA-2*.

En las enterobacterias de importancia clínica, todas las metalo-β-lactamasas aisladas hasta ahora han sido identificadas en plásmidos o haciendo parte de elementos móviles como los integrones (52). Varios factores han imposibilitado hasta el momento el diseño de un inhibidor de MBLs adecuado: la falta de un conocimiento detallado del mecanismo catalítico de estas enzimas; la gran diversidad estructural exhibida por MBLs de diversas fuentes, y el desconocimiento de su origen evolutivo de las MBLs y de qué modo podrían dar lugar a nuevas variantes.

En cuanto a la prevalencia de *P. aeruginosa* portadoras de genes de metalo-β-lactamasas de tipo VIM, se habla del 20% en cepas procedentes de pacientes hospitalizados en el Hospital de emergencia de Europa del 2004, otro estudio realizado en el Hospital Universitario de Buenos Aires en 2006 se ha reportado que la prevalencia de MBLs en aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes resultó de un 11% de 91 cepas aisladas. El estudio realizado en un laboratorio centralizado en el 2005 se encontró que el 43% de 241 cepas resistentes a imipenem se aisló en orina un 7% se identificó en sangre el 21% en heridas purulentas, el 20% en muestra de tracto respiratorio. (2,6,7)

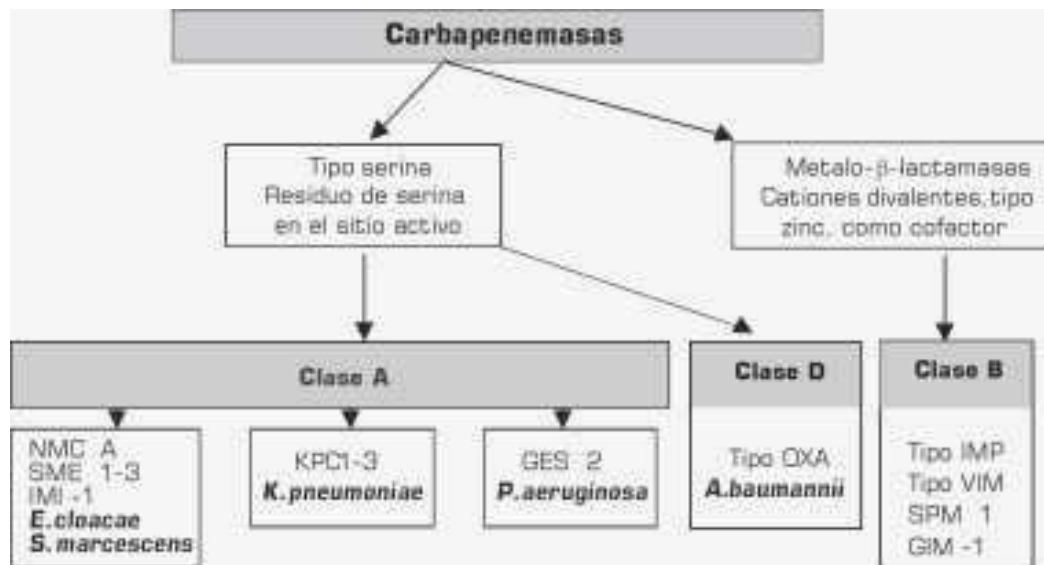


Figura 7.- Esquema de la Clasificación basada en la propuesta de Ambler

1.4.9 Estrategias para el control de la resistencia

Existen numerosas publicaciones enfocadas en diversas estrategias para la disminución de bacterias con resistencia múltiple en el medio hospitalario, pero ninguna es específica ni selectiva para el control de Gram negativos resistentes al carbapenem. Sin embargo, las medidas han sido exitosas cuando se han utilizado en forma conjunta.

Estas medidas incluyen, entre otras: revisión diaria de la resistencia antibiótica de todos los aislamientos clínicos; restricción del uso de ciertos antibióticos con base en los mecanismos de resistencia operantes; implementación inmediata de medidas estándar en aquellos pacientes en los cuales se aísla una bacteria con resistencia múltiple con énfasis en las barreras de contacto, con el fin de prevenir la transmisión cruzada de estas bacterias; asignación de una enfermera dedicada al control de infecciones para la vigilancia y la educación en el área o áreas afectadas; aislamiento y asignación a cohortes de los pacientes colonizados e infectados; generalización del uso de lavado de manos con

alcohol glicerinado; instrucción al personal de aseo para la adecuada descontaminación del ambiente inanimado en forma periódica; utilización de técnicas epidemiológicas moleculares para determinar la capacidad de clonarse de las bacterias; educación continua del personal y suministro periódico de los resultados del programa de vigilancia y las tasas de resistencia bacteriana locales.

Por lo menos, una de cada tres infecciones hospitalarias (ya sea por bacterias susceptibles o resistentes) se podría haber evitado por medio de programas de control de infecciones. Además, la administración temprana de antibióticos que tengan actividad microbiológica en contra de los organismos que más probablemente estén causando una infección, ha demostrado consistentemente un mejor desenlace para el paciente (57). Con base en esta premisa, muchos clínicos escogen antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de infecciones y los usan por períodos prolongados. Esta aproximación, aun que es muy efectiva para pacientes individuales, puede traer consecuencias profundas en cuanto al surgimiento y la generalización de la resistencia a antibióticos en el medio hospitalario (58), ya que cualquier antibacteriano puede generar una presión sobre la población bacteriana que coloniza al paciente y seleccionar cepas con resistencia múltiple. Se ha estimado que 50% de todos los antibióticos que se prescriben están mal seleccionados, la dosis no es la correcta o se toman por un periodo que no es óptimo. Esta situación puede llevar prontamente a la aparición y la diseminación de cepas de bacterias con resistencia múltiple, dejando al paciente sin opciones terapéuticas por el limitado número de nuevos productos antibacterianos que actualmente están en desarrollo. Algunos programas de manejo de antibióticos en los hospitales se basan enteramente en la educación del personal, mientras otros siguen una aproximación de tipo preventivo, correctivo o una combinación de éstas (59).

Los programas de educación del personal, encaminados a mejorar el entendimiento de los médicos sobre los alcances y las consecuencias de la resistencia bacteriana y el uso apropiado de antibióticos, tienen algunas ventajas y otras desventajas.

Entre sus ventajas están el ser relativamente económicos y el utilizar personal del mismo hospital para su implementación. Entre las desventajas se encuentra la dificultad para cambiar los hábitos de formulación de antibióticos, pues cierto tiempo después de pasadas las charlas educativas los médicos retoman sus conductas previas de formulación (57). En un estudio aleatorio en Sri Lanka, se compararon las prácticas de prescripción de médicos que habían recibido material educativo y habían atendido a seminarios, con las de médicos que recibieron material educativo pero no atendieron a los seminarios y no se encontraron diferencias significativas en la reducción general del uso de antibióticos. En contraste, un estudio en Zambia mostró que la implementación en serie de tres seminarios educativos generó una mejoría en el uso apropiado de varios antibióticos utilizados como indicadores (60). Ambos estudios resaltan que el uso de material educativo para la difusión de información es un método poco costoso y muy adecuado para hacer intervenciones en instituciones con recursos limitados.

Los programas de manejo de antibióticos de tipo preventivo consisten en controlar la disponibilidad de ciertos antibióticos mediante la exigencia de una aprobación por parte del infectólogo de la institución antes de poder formular el antibiótico o en exigir llenar formularios de solicitud de antibióticos restringidos (57).

Otro estudio evaluó las recomendaciones del equipo de infectología para el uso de antibióticos con base en los datos clínicos y microbiológicos para 127 pacientes, comparándolos con su uso en otros 125 pacientes

que sirvieron de control. Se realizaron recomendaciones en 89% de los casos y el grupo intervenido tuvo menores costos en antibióticos, menor estancia hospitalaria y menores costos extras en comparación con el grupo control.

El manejo de antibióticos con una aproximación de tipo correctivo permite el uso empírico de antibióticos de amplio espectro seguido de una revisión de las prescripciones por parte del equipo supervisor y, luego, una disminución del espectro del antibiótico o una suspensión del mismo en el segundo o el tercer día de terapia, si la decisión se apoya en los cultivos, en los resultados de susceptibilidad y en la respuesta clínica del paciente (57). Varios estudios han demostrado que, aun que el abuso de antibióticos puede promover la aparición de resistencia, los cambios apropiados en el uso de los antibióticos pueden llevar a la recuperación de la sensibilidad.

En varios artículos se han reportado los resultados de programas de manejo de antibióticos en distintos hospitales y muestran datos prometedores. Rahall et al. encontraron disminución de 44% en *Klebsiella* productoras de β -lactamasas en un hospital universitario tras la restricción del uso de las cefalosporinas (64).

Los objetivos generales de cualquier programa de control de resistencia a antibióticos deben incluir una mejor utilización de los agentes antibióticos disponibles para disminuir las tasas de resistencia bacteriana, mejorar la supervivencia de los pacientes y reducir los costos del tratamiento. Tales programas requieren un equipo multidisciplinario en colaboración continua y con una motivación adecuada.

1.4.10. Aislamiento e identificación

La tarea del laboratorio de microbiología tampoco es sencilla, un aspecto clave es determinar correctamente la sensibilidad de *P. aeruginosa* a los

antibióticos potencialmente activos empleando las diferentes metodologías desarrolladas para ello. En todas ellas es básico que tengamos en cuenta que existen diversos factores que pueden influir en el resultado final (inóculo correcto, medio de cultivo y su pH, concentración de iones, difusión de algunos antibióticos en el agar, temperatura y tiempo de incubación). El otro aspecto de enorme importancia es intentar reconocer los mecanismos de resistencia de la cepa estudiada con el empleo de antibióticos que sean buenos marcadores fenotípicos. Con frecuencia es una tarea muy complicada por diversas razones: expresión simultánea de diferentes mecanismos de resistencia que afectan, parcial o totalmente a los mismos antibióticos; la eficacia variable de estos mecanismos en diferentes cepas y la poca capacidad de los métodos empleados habitualmente para detectar las resistencias de bajo nivel. (ANEXO 3)

1.4.11. Pruebas de susceptibilidad y detección de metalo- -lactamasas y otras carbapenemasas

Para identificación de *P. aeruginosa* según el tipo de muestra se aíslan en agar enriquecido y agar sangre y la producción de pigmentación característica que presenta esta bacteria como primer paso conjunto las pruebas bioquímicas que dan negativo por no ser fermentadoras.

A. Difusión de disco.

La susceptibilidad antibiótica de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* es determinada primero por el método de difusión de disco en placas de agar Mueller Hinton, con sensidiscos de ceftazidime, cefotaxima, ceftriaxona, cefepime, imipenem, meropenem, cloranfenicol, nitrofurantoina, gentamicina, amikacina, ciprofloxacina con este método la resistencia a imipenem y todos los β -lactámicos de amplio espectro sugiere la producción de metalo- β -lactamasas.

Para la detección de metalo-β-lactamasas se emplean los métodos de difusión de disco con monodiscos de EDTA que se coloca entre los discos de imipenem y meropenem a una distancia de 25mm ya que si varía la distancia puede dar un resultado erróneo un falso positivo o negativo al momento de su interpretación.

F. Detección fenotípica de carbapenemasas

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de β-lactamasas, la epidemiología local y la identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas. En este último punto es esencial valorar la posible presencia de otros mecanismos de resistencia que puedan "enmascarar" el fenotipo que confieren las carbapenemasas, entre ellos la alteración de la permeabilidad, la presencia de bombas de expulsión, afectación de las PBPs o presencia simultánea de otras β-lactamasas. En este sentido, no es igual la expresión de una carbapenemasa en *P. aeruginosa* o en *A. baumannii*. Cada una de estas especies tiene sus peculiaridades fenotípicas naturales que deben ser contempladas.

Así mismo, la expresión de las carbapenemasas no es siempre homogénea y se producen fenómenos de heterorresistencia. Este hecho se ha demostrado claramente con las enterobacterias y las metalo-β-lactamasas que hace que los valores de CMI no sean en ocasiones reproducibles y se sitúen en un amplio rango de concentraciones, incluso por debajo del punto de corte de sensibilidad. No obstante, estas CMI también pueden ser muy

elevadas por la superposición con otros mecanismos de resistencia.

Desde un punto de vista práctico y una vez observado en el antibiograma la expresión de un fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa, generalmente ilustrado por la sensibilidad disminuida o resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y a alguno de los carbapenémicos, es importante verificar que existe un mecanismo de inactivación de los carbapenémicos. Se recomienda investigar este hecho en las cepas en las que los valores de CMI de los carbapenémicos se incrementan por encima de los correspondientes puntos de corte epidemiológicos (aquellos que separan las poblaciones salvajes de aquellas que presentan mecanismos de resistencia). El método de referencia, no siempre al alcance de todos los laboratorios de microbiología, sería el ensayo espectrofotométrico, por lo que se han propuesto métodos biológicos (bioensayos) sencillos que permiten su detección. La prueba modificada de Hodge, tiene una elevada sensibilidad pero no sirve para la diferenciación del tipo de carbapenemasa. En el caso de las carbapenemasas de tipo OXA, el test de Hodge es menos útil que con las metalo- -lactamasas o las KPC ya que la hidrólisis de los carbapenémicos es más débil.

A pesar de su sencillez, el test de Hodge modificado tiene discordancias observadas con algunas cepas. Se han observado resultados falsos negativos por la baja expresión de la carbapenemasa, sobre todo con cepas con metalo- -lactamasas y oxacilinasas. No obstante, los falsos negativos pueden evitarse añadiendo sulfato de zinc al medio que incrementa la expresión del enzima (en el caso de las metalo- -lactamasas). Así mismo, se ha discutido cuál es el carbapenémico más adecuado para el

test de Hodge modificado, recomendándose la utilización de meropenem y ertapenem en detrimento del imipenem. Además del test de Hodge modificado, se han propuesto otras pruebas basadas en el test de Masuda que consisten en una difusión con discos utilizando un microorganismo indicador sensible a carbapenémicos. Es necesario lisar la bacteria a estudiar y colocar el extracto obtenido en un disco de papel que se sitúa en el extremo del halo de inhibición del antibiótico indicador (en este caso un carbapenémico). Si la bacteria produce carbapenemasa distorsionará el halo de inhibición del carbapenémico.

Para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas directamente de muestras clínicas se ha propuesto la utilización de medios cromogénicos, entre ellos los que se emplean para la detección de BLEE y los que específicamente se han diseñado para la detección de KPC.

Los medios cromogénicos para BLEE detectan la presencia de microorganismos con carbapenemasas de las clases A y B, pero no las cepas que tienen OXA-48. No obstante tienen el inconveniente de ser poco específicos dado que en ellos también crecen los microorganismos productores de BLEE. Este hecho ha de tenerse en cuenta en aquellas áreas geográficas en las que este tipo de enzimas es muy prevalente ya que pueden enmascarar la presencia de microorganismos con carbapenemasas. Los medios cromogénicos específicos para carbapenemasas como el CHROMagar™ KPC tienen una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de cepas con enzimas tipo VIM y KPC directamente de muestras, si bien no discriminan el tipo de carbapenemasa.

G. Diferenciación fenotípica de las diferentes carbapenemasas.

Una vez confirmado que la cepa problema produce una enzima que inactiva los carbapenémicos es preciso diferenciar el tipo de carbapenemasa. Hay que tener presente que algunas carbapenemasas producen niveles bajos de resistencia. En *Enterobacteriaceae* utilizando diferentes inhibidores puede seguirse el esquema como el que se incluye en la (figura 8).

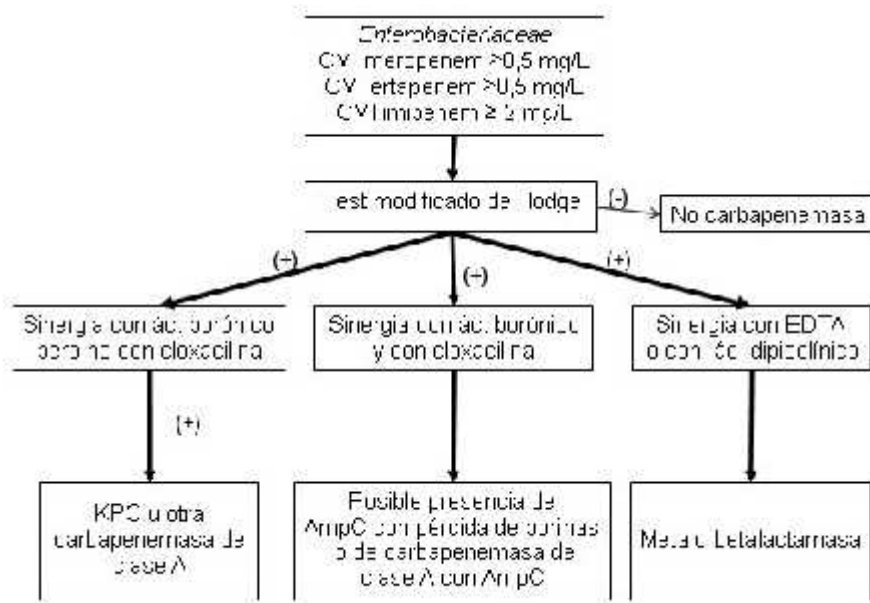


Figura 8. Identificación fenotípica de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas.

En el caso de las metalo- -lactamasas se aprovecha que no hidrolizan el aztreonam (y por tanto aparecen sensibles en el antibiograma) y la posible sinergia entre los carbapenémicos y EDTA o entre ceftazidima y EDTA para inferir su presencia. No obstante, con frecuencia las cepas con metalo- -lactamasas también producen BLEE siendo resistentes a este antibiótico. Se han diseñado pruebas de aproximación de discos, discos de carbapenémicos combinados con EDTA y tiras de Etest con un carbapenémico y EDTA para identificar fenotípicamente estas

enzimas. En algunos casos se añade además fenantrolina o se sustituye EDTA por compuestos tiólicos como el ácido mercapto-propiónico para mejorar la sensibilidad de la prueba. También se ha ensayado el ácido dipicolínico con buenos resultados. En el método de aproximación de discos es importante "acertar" con la distancia entre los discos del carbapenémico y el inhibidor, sobre todo en las cepas con baja expresión de la carbapenemasa en las que los halos de inhibición son amplios. Por este motivo existen métodos que incluyen directamente el inhibidor en el mismo disco que el carbapenémico y se compara el halo de inhibición resultante con el que se produce con el carbapenémico solo. Este mismo principio se utiliza con las tiras de Etest que en un extremo contienen imipenem y en el otro imipenem con EDTA.

Por diferencia entre los valores de CMI de imipenem sin y con inhibidor se puede inferir la presencia de las carbapenemasas. La sinergia con EDTA puede dar lugar a falsos positivos, sobre todo en *P. aerruginosa* y *Acinetobacter* spp., aunque puede evitarse añadiendo Zn^{2+} al medio de cultivo (71).

Las KPC se muestran resistentes al aztreonam y no se inhiben por el EDTA pero sí por el ácido borónico y discretamente por el ácido clavulánico. No se recomienda utilizar ácido clavulánico por su baja sensibilidad. La utilización del ácido borónico tiene como inconveniente el ser también un buen inhibidor de AmpC, circunstancia que dificulta la detección de las KPC cuando está presente esta enzima. Se ha propuesto utilizar simultáneamente una prueba de discos combinados con cloxacilina para demostrar la presencia de estas β -lactamasas tipo AmpC. La sinergia con ácido borónico en las cepas productoras de KPC se puede demostrar con los carbapenémicos y también con cefalosporinas de amplio espectro, preferentemente con cefepima. También se

puede observar esta sinergia con pruebas de aproximación de discos. Aun que se han propuesto diferentes compuestos derivados del borónico, se prefiere el ácido fenil-borónico al 3'-amino-fenil-borónico por su mayor capacidad inhibitoria. Así mismo, como sustrato se recomienda preferentemente utilizar meropenem o imipenem ya que con ertapenem pueden observarse resultados falsos positivos cuando el microorganismo estudiado produce AmpC, incluidas las AmpC plasmídicas.

Para las carbapenemasas de tipo OXA no es posible utilizar un método fenotípico como el propuesto con las carbapenemasas de clase A o B ya que no existen inhibidores específicos de enzimas de clase D. Por este motivo, se recomienda confirmar la presencia de estas enzimas por medio de métodos moleculares.

Uno de los problemas a los que se enfrenta el esquema propuesto de diferenciación del tipo de carbapenemasa utilizando diferentes inhibidores es el creciente aumento de microorganismos que producen más de un tipo de β -lactamasa, incluidas las cepas productoras de metalo- β -lactamasas y carbapenemasas de clase A e incluso algunas simultáneamente con BLEE (mayoritariamente CTX-M o SHV) y AmpC plasmídicas (generalmente de tipo CMY). Para las cepas de *Enterobacteriaceae* que producen KPC y VIM simultáneamente se recomienda utilizar en una misma placa una prueba de discos combinados con los dos inhibidores en discos independientes y en el mismo disco. Se ha propuesto también una prueba similar para las cepas con KPC que produzcan simultáneamente una BLEE pero en este caso se utiliza ácido borónico y ácido clavulánico por separado y simultáneamente en el mismo disco indicador con cefalosporinas. (ANEXO 4)

1.4.12 Detección fenotípica de la resistencia a quinolonas

En cuanto a la detección de determinantes plasmídicos de resistencia, cada vez más importantes, no existen marcadores fenotípicos claros para reconocerlos, ya que pueden estar presentes tanto en cepas sensibles como resistentes, y su detección debe hacerse por métodos moleculares, no siempre accesibles. En los últimos años se ha observado que algunas enterobacterias presentan sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas siendo sensibles a ácido nalidíxico, situación que en muchos casos se ha relacionado con la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas. Se hace necesario implementar las estrategias de detección en aislados con bajo nivel de resistencia (pero sensibles según los puntos de corte vigentes), con gran riesgo de selección de nivel más alto de resistencia. Los resultados de sensibilidad al ácido nalidíxico y ciprofloxacino son suficientes para el estudio de mecanismos de resistencias a quinolonas en enterobacterias, *Haemophilus* spp. y *Neisseria* spp. Las tiras de Etest son una herramienta idónea por su amplia escala de concentraciones de antibiótico, aunque el método de difusión con discos es una alternativa barata y válida para su uso en la rutina diaria (figura 9).



Figura 9. Diferentes patrones de sensibilidad esperados según el mecanismo de resistencia.

II. OBJETIVOS

2.3 Objetivo general

Determinar la prevalencia de la enzima metalo- β -lactamasa en *P. aeruginosa* de muestras biológicas procesadas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Obrero de la ciudad de La Paz durante Enero a Diciembre del 2009.

2.4 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de *P. aeruginosa* con respecto a la edad, sexo.
- Determinar la prevalencia de *P. aeruginosa* según el tipo de muestra.
- Determinar la prevalencia de *P. aeruginosa* según a servicio solicitante.
- Determinar la prevalencia de metalo- β -lactamasa en *P. aeruginosa* según el tipo de muestra mediante métodos fenotípicos para observar la frecuencia en la cual se presenta.
- Determinar la prevalencia de la metalo- β -lactamasa según a servicio solicitante.
- Establecer los antibióticos alternativos para el tratamiento antimicrobiano para cepas productoras de metalo- β -lactamasas.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de estudio

El estudio que se realizara en el presente trabajo de investigación es retrospectiva pero toda la información se recogerá con fines específicos de la investigación, de acuerdo con la evolución del estudio es longitudinal puesto que se mide constantemente las variables y en el caso de algunas variables

se mide en un unico momento dado y descriptivo porque cuenta con una sola población en función de un grupo de variables de infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes que asistieron al Hospital Obrero a partir de solicitudes medicas del archivo de laboratorio.

3.1 Universo y muestra

En este estudio se tomo como universo a todas las muestras clinicas derivadas al laboratorio de bacteriología con solicitud de cultivo y antibiograma durante el periodo de Enero hasta Diciembre del 2009, de todos los especimenes aislados de 104 correspondientes a *P. aeruginosa* donde no será necesario el cálculo del tamaño maestral siendo esta la unidad de observacion de analisis.

Las unidades de observación para el estudio serán personas internadas y aquellos que asistieron al Hospital por consulta y que fueron diagnosticados con infecciones de diferentes partes del cuerpo dando como diagnóstico definitivo infección por *P. aeruginosa*.

3.2 Criterios de inclusión y exclusión

3.2.1 Criterios de inclusión

Se incluirán las muestras biológicas de pacientes internados y aquellos que asistieron a consulta al Hospital Obrero que presenten diagnóstico por infecciones en diferentes partes del cuerpo.

Se procesaran todas las muestras de los pacientes sin discriminar la raza, sexo y edad.

3.2.2 Criterios de exclusión

No se tomaran en cuenta para el estudio aquellas muestras que no cuentan con la orden de laboratorio para su procesamiento.

No se tomaran en cuenta muestras que no sean tomadas adecuadamente como esta establecido para ser procesadas en el laboratorio.

3.3 Listado de variables

- Edad
- sexo
- Servicio
- Muestra
- Enzima metalobeta-lactamasa
- Resistencia

3.4 Operacionalización de variables

VARIABLE	TIPO	OPERACIONALIZACIÓN		INDICADOR
		ESCALA	DESCRIPCIÓN	
Enzima metalobeta-lactamasa (MBL)	Cualitativa nominal dicotómica	Detectable No detectable	Según el alo de inhibición	Porcentaje según tipo de muestra
Muestra	Cualitativo nominal politómica	-Sangre -Orina -Secreción faringea -Secreción de heridas -Esputo	Según la muestra procesada	Porcentaje de muestra según el microorganismo aislado
Servicio	Cualitativa nominal politómica	-UTI -Cirugía Cardiología -Quemados -Traumatolo	Según el servicio donde esta interno el paciente	Porcentaje del servicio según tipo de muestra, y perfil de susceptibilidad antimicrobiana

		gía Hemodiálisis		
Susceptibilidad antimicrobiana	Cualitativa ordinal	-Sensible -Resistente -intermedio	Según el halo de inhibición	Porcentaje de sensibilidad y resistencia en función al microorganismo aislado
Edad	Cuantitativa continua	>18 >18-28 >28-38 >38-48 >48-58 >58-68 >68-78 >78-88 >90	Según edad del paciente	Frecuencia absoluta Frecuencia relativa Frecuencia media
Sexo	Cualitativa nominal dicotónica	-Masculino -Femenino	Según sexo biológico del paciente	Porcentaje de pacientes con infecciones por P. aeruginosa

3.5 Técnicas y procedimientos

3.5.1 Obtención de la información

La información recabada durante todo este tiempo obtenida directamente de los resultados de los cultivos registrados a partir de las solicitudes de exámenes microbiológicos diariamente en forma sistemática y continua en base a un programa prediseñado que se encarga de almacenar la información de resultados.

El programa que se utilizó para la recolección de los datos fue en base a una planilla de recolección de datos diseñada en el paquete

estadístico “Epi-Info 2009” donde se registraron las variables de estudio para el análisis rápida de la información.

3.5.2 Procesamiento y análisis

Luego de recabar todos los datos los mismos fueron organizados de forma resumida para el análisis estadístico y la elaboración de las medidas para variables cualitativas y cuantitativas así tenemos:

- Frecuencia de Infecciones por *P. aeruginosa* según edad y sexo.
- Frecuencia de infecciones por *P. aeruginosa* según sensibilidad antibiótica.
- Prevalencia de metalo- -lactamasa de Infecciones por *P. aeruginosa* según edad y sexo.
- La prevalencia de metalo- -lactamasas en pacientes con infección por *P. aeruginosa* según tipo de muestra.
- Prevalencia de metalo- -lactamasas en pacientes con infección por *P. aeruginosa* según servicio.

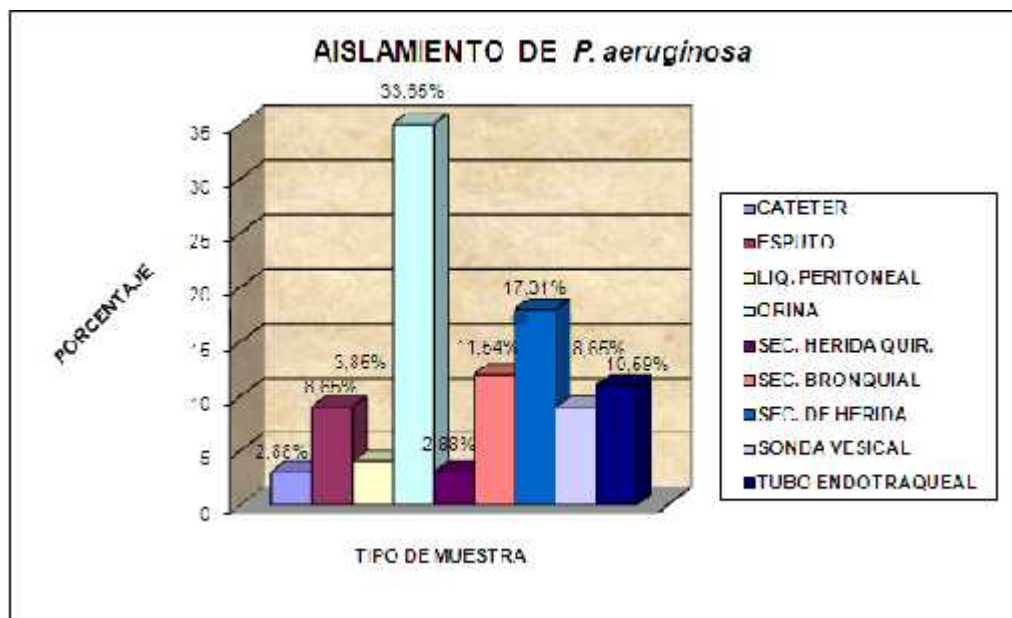
IV. RESULTADOS

En este estudio se analizaron un total de 104 aislamientos clínicos de *P. aureginosa* en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Obrero de la ciudad de La Paz la mayoría de los aislamientos procedían de orina (35 muestras-33.65%), secreción de heridas (18 muestras-17.31%), aparato respiratorio con secreción bronquial (12 muestras-11.54%) tubo endotraqueal (11 muestras-10.58%) en esputo (9 muestras-8.65%), en sonda vesical (9 muestras-8.65%) y en menor proporción de liquido peritoneal (4 muestras-3.85%), de la misma forma de catéter (3 muestras- 2.88%) (Tabla y grafica 1).

Tabla 1. Aislamiento de *P. aeruginosa* según tipo de muestra “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

MUESTRA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
CATETER	3	2,88%
ESPUTO	9	8,65%
LIQ. PERITONEAL	4	3,85%
ORINA	35	33,65%
SEC. HERIDA QUIR.	3	2,88%
SEC. BRONQUIAL	12	11,54%
SEC. DE HERIDA	18	17,31%
SONDA VESICAL	9	8,65%
TUBO ENDOTRAQUEAL	11	10,59%
TOTAL	104	100,00%

Grafica 1. Aislamiento de *P. aeruginosa* según tipo de muestra “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009



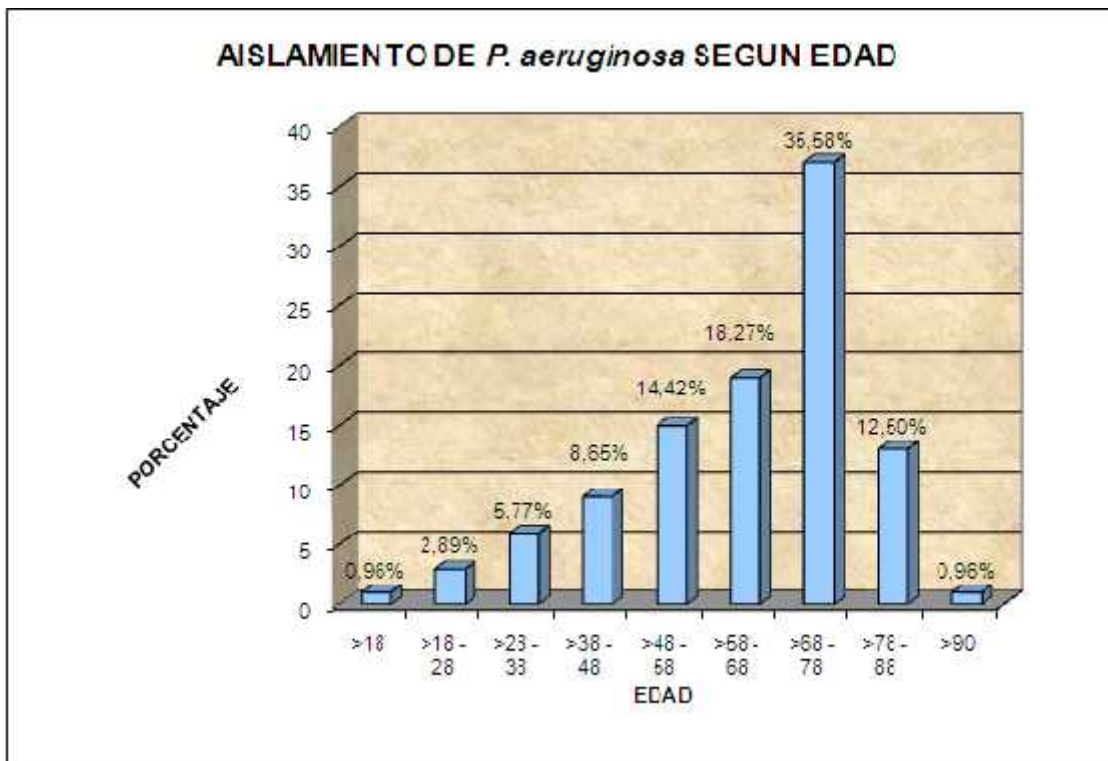
Las cepas aisladas de *P. aeruginosa* se encuentra afectando con mayor frecuencia al sexo masculino con 54,9%. Por otra parte se logra observar que la mayor frecuencia de infecciones se detecta en un rango de edad que oscilan entre 68 – 78 años con 35%, seguido de 58 – 68 años con una frecuencia de

18,6% y por ultimo entre 48 – 58 años con un 14,7% lo que nos indica que la tercera edad es mas propenso a presentar infecciones por esta bacteria.

Tabla 2. Aislamiento de *P. aeruginosa* según edad “ Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

EDAD	FRECUENCIA	PORCENTAJE
>18	1	0,96%
>18 - 28	3	2,89%
>28 - 38	6	5,77%
>38 - 48	9	8,65%
>48 - 58	15	14,42%
>58 - 68	19	18,27%
>68 - 78	37	35,58%
>78 - 88	13	12,50%
>90	1	0,96%
Total	104	100,00%

Grafica 2. Aislamiento de *P. aeruginosa* según porcentaje de edad “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

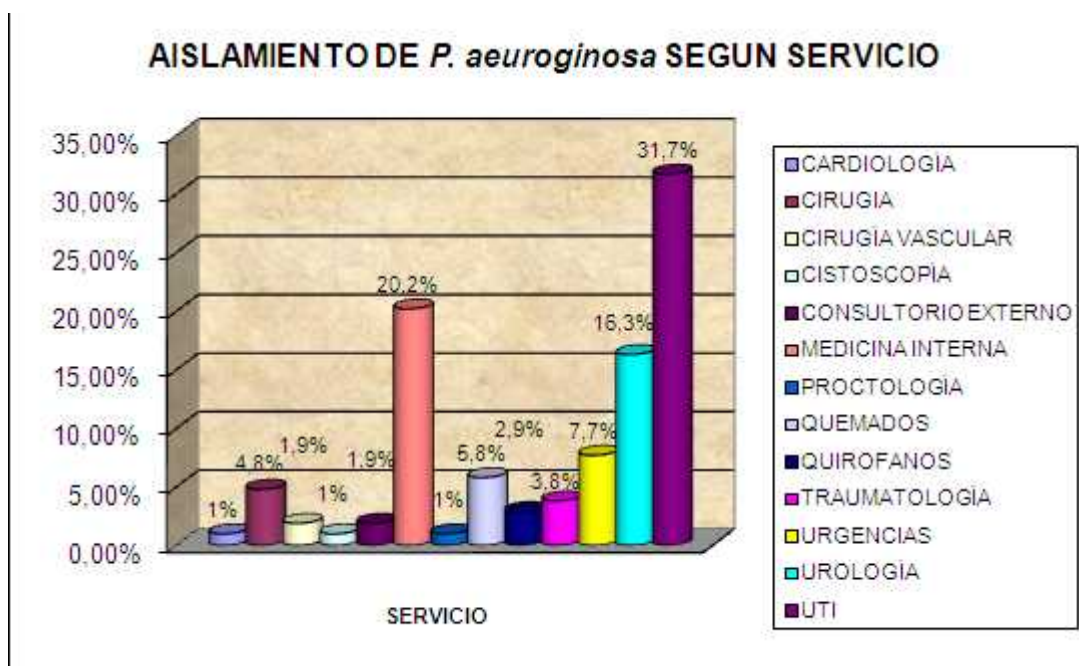


Al ser *P. aeruginosa* un potogeno nosocomial de gran importancia por encontrarse esta en el medio ambiente se detecto en las diferentes áreas de servicio que prevalece en primer lugar UTI (unidad de terapia intensiva) con 31,7% seguido por Medicina Interna con 20,2% y por ultimo Urología con 16,3%. Como sabemos UTI una sala donde los pacientes requieren sumo cuidado, atención y limpieza por las condiciones en las que se encuentra el paciente en esta área con las defensas bajas (Tabla 3).

Tabla 3. Aislamiento de *P. aeruginosa* según servicio “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

SERVICIO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
CARDIOLOGÍA	1	1,00%
CIRUGIA	5	4,80%
CIRUGÍA		
VASCULAR	2	1,90%
CISTOSCOPIA	1	1,00%
CONSULTORIO		
EXTERNO	2	1,90%
MEDICINA INTERNA	21	20,20%
PROCTOLOGÍA	1	1,00%
QUEMADOS	6	5,80%
QUIROFANOS	3	2,90%
TRAUMATOLOGÍA	4	3,80%
URGENCIAS	8	7,70%
UROLOGÍA	17	16,30%
UTI	33	31,70%
TOTAL	104	100,00%

Grafica 3. Aislamiento de *P. aeruginosa* según porcentaje de servicio “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009



UTI: Unidad de Terapia Intensiva

El análisis de susceptibilidad a los antibióticos se llevó a cabo mediante la técnica de disco-placa. Mediante el antibiograma se logra observar el alto índice de resistencia en la mayoría de los aislamientos destacando que dieciocho aislamientos eran multirresistentes. Observando la figura 2 que recoge el perfil de susceptibilidad de aislamientos de *P. aeruginosa* vemos que la resistencia es bastante alta para nitrofurantoina (100%) seguido de cloramfenicol (95.7%), tetraciclina (88.1%) ciprofloxacina (80.4%), y encontramos una resistencia intermedia muy baja para todos los antibioticos aminoglucósidos. Los carbapenems presentan una resistencia más baja de todos los grupos de antibióticos testados con un 31.85% al igual que las cefalosporinas de tercera generación 24.35% (Tabla 4).

En lo que respecta a imipenem, meropenem, ceftazidima y cefepime es buena pero con el pasar del tiempo esta sensibilidad va disminuyendo como se

observa en estos resultados es así que la detección de diferentes mecanismos de resistencia que están llevando al desuso de antibióticos.

Tabla 4. Porcentaje de Aislamiento de P. aeruginosa según respuesta antibiótica “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

ANTIBIOGRAMA ANTIBIOTICO	PORCENTAJE			
	S	I	R	TOTAL
Ciprofloxacina	12,70%	6,90%	80,40%	100%
Gentamisisina	47,50%	4%	49,50%	100
Nitrofurantoina	0%	0%	100%	100
Tetraciclina	7,50%	4,50%	88,10%	100
Amikacina	72,10%	4,80%	23,10%	100
Ceftazidima	60,30%	8,20%	31,50%	100
Cloranfenicol	2,10%	2,10%	95,70%	100
Imipenem	69,50%	6,30%	24,20%	100
Meropenem	55,80%	4,70%	39,50%	100
Cefepime	73,40%	9,40%	17,20%	100

Grafica 4. Porcentaje de Aislamiento de P. aeruginosa según respuesta antibiótica “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

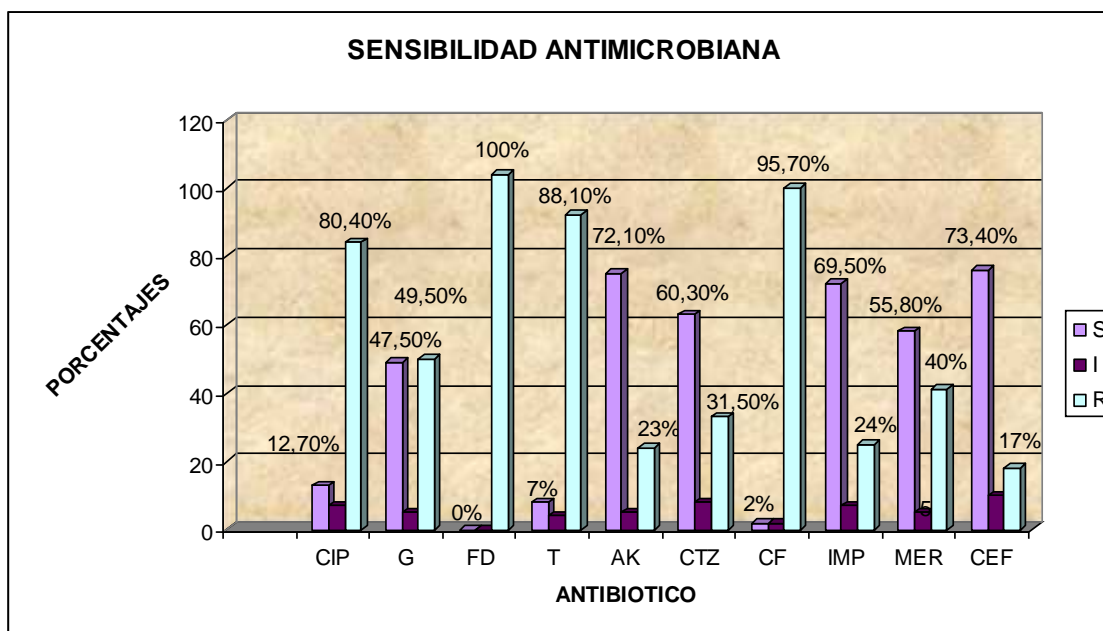
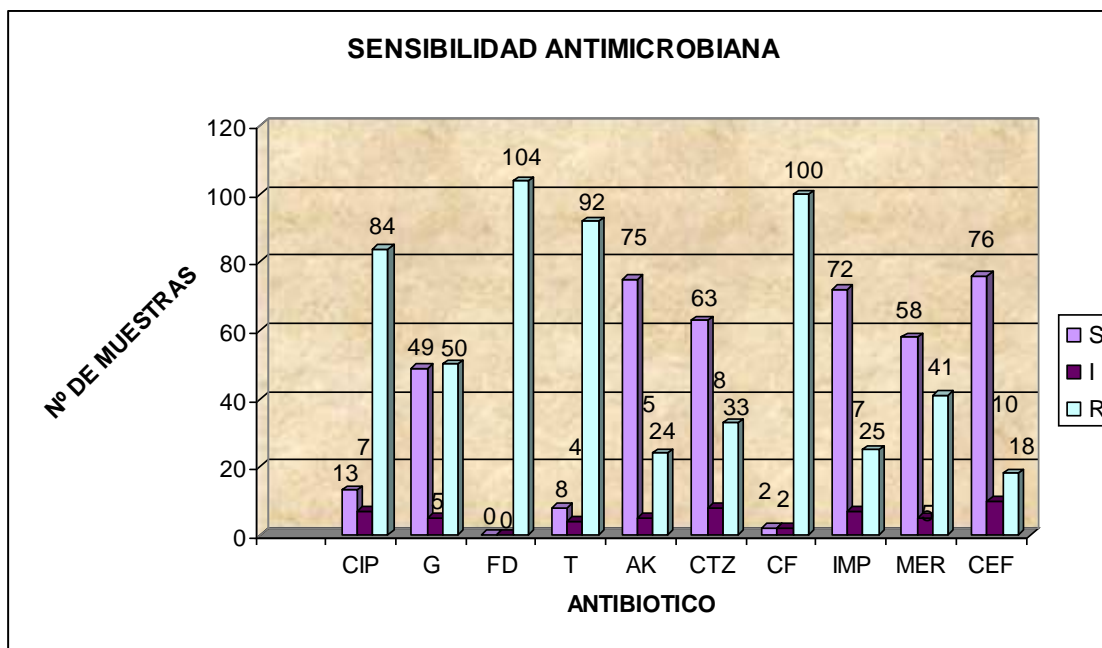


Tabla 5. Frecuencia de Aislamiento de P. aeruginosa según respuesta antibiótica “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

ANTIBIOGRAMA ANTIBIOTICO	FRECUENCIA		
	S	I	R
Ciprofloxacina	13	7	84
Gentamicina	49	5	50
Nitrofurantoina	0	0	104
Tetraciclina	8	4	92
Amikacina	75	5	24
Ceftazidima	63	8	33
Cloranfenicol	2	2	100
Imipenem	72	7	25
Meropenem	58	5	41
Cefepime	76	10	18

Grafica 5. Frecuencia de Aislamiento de P. aeruginosa según respuesta antibiótica “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009



La detección de metalo- -lactamasas se lleva a cabo mediante técnicas fenotípicas, para lo cual se realizaron con discos de EDTA. Mediante este método se obtuvo un resultado positivo, lo cual indica la presencia de esta enzima, así mismo modo resultados negativos se encuentran para todos los demás aislamientos (Tabla 6).

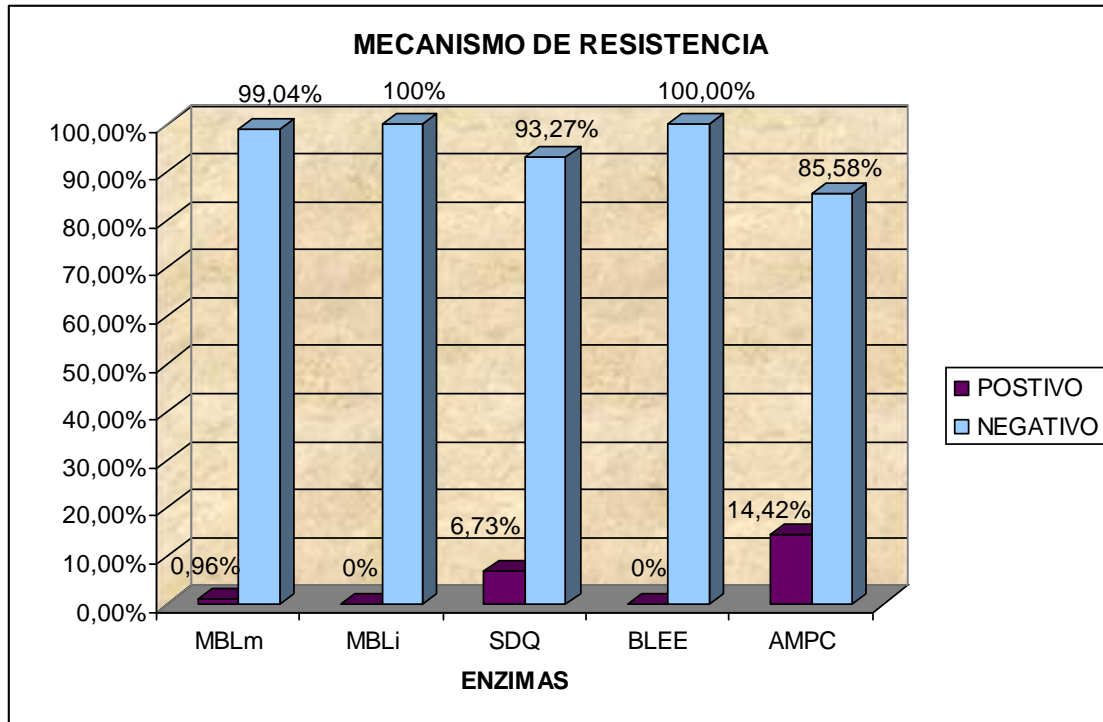
En este trabajo obtuvimos una prevalencia de la metalo- -lactamasa de *P. aeruginosa* correspondiente a 0,96 %, muy baja esto podría deberse a que presenta más de un mecanismo de resistencia. Así mismo se determina la presencia del AMPc con 82,7% y BLEE 0% estos resultados no indican que podría estar involucrado una carbapenemasa diferente a la metalobetalactamasa que en este trabajo no se identificaron ya que se requieren de pruebas genotípicas específicas (Gráfica 6).

En cuanto a la SDQ (sensibilidad disminuida a quinolonas) se reporta con un porcentaje 6,73% lo que nos demuestra que la bacteria va adquiriendo nuevas formas de resistencia que tienen que ver con los cuatro sistemas de resistencia ya mencionados pero sobre todo podría estar involucrado una nueva forma de resistencia relacionado con sistemas de expulsión activa poco frecuentes, por lo mismo el bajo porcentaje que se obtuvo.

Tabla 6. Aislamiento de *P. aeruginosa* según mecanismo de resistencia “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009

ENZIMA	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL %
MBLm	0,96%	99,04%	100
MBLi	0%	100%	100
SDQ	6,73%	93,27%	100
BLEE	0%	100,00%	100
AMPC	14,42%	85,58%	100

Grafica 6. Aislamiento de *P. aeruginosa* según mecanismo de resistencia “Hosp. Obrero N°1” de Enero a Diciembre de 2009



MBLm: Metalo- -lactamasa para meropenem; **MBLi:** Metalo- -lactamasa para imipinem;
BLEE: -lactamasa de espectro expandible; **SDQ:** Sensibilidad Disminuida a Quinolonas;
AMPC: -lactamasa clase C cromosomal

V. DISCUSION

P. aeruginosa es un importante patógeno por ser causa frecuente de infecciones, especialmente nosocomiales, así como por presentar una elevada resistencia intrínseca a los antibióticos y una gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, ya sea por mutaciones o por la adquisición de nuevos genes. En el laboratorio del Hospital Obrero de la ciudad de La Paz se trabajó con aislamientos clínicos principalmente de heridas, secreciones de aparato respiratorio, aparato digestivo y sistema renal. *P. aeruginosa* fue el tercer patógeno aislado con mayor frecuencia en el reporte de SENTRY para Latinoamérica (12).

El aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems es cada vez más frecuente, sobre todo en Latinoamérica como el reportado por SENTRY, comenzando a reportarse en varios países como el estudio del CIDEIM en el 2004 (13) que mostro en Colombia, las tasas de resistencia de *P. aeruginosa* al imipenem varían también considerablemente entre los diferentes hospitales de la red. En nuestro caso fue lo contrario la mayor resistencia a carbapenemes era para meropenem y las infecciones con mayor frecuencia se dan en la sala de medicina interna en muestras de orina por chorro medio.

El porcentaje global de susceptibilidad encontrado en nuestro estudio indica que los carbapenems son más activos, con un 62,65% de sensibilidad y un 31,85% de resistencia así también las cefalosporina de tercera generación presentan muy buena sensibilidad antimicrobiana. De las 104 cepas aisladas la sensibilidad a carbapenemes fueron 72 (69,5%) para imipenem y para meropenem 58 (55,8%) El estudio de SENTRY (12) mostró tasas de susceptibilidad de 71,9% para imipenem y de 74,8% para meropenem, con una tendencia al incremento de la resistencia a lo largo del tiempo, como se observa va aumentando la resistencia a los carbapenemes como aquellos estudios realizados en Madrid donde de las 133 cepas seleccionadas, 109 (82%) fueron resistentes a ambos carbapenemes, 23 (17,3%) fueron resistentes solo al imipenem y una (0,75%) fue resistente solo al meropenem. Entre las 109 resistentes a ambos carbapenemes Cincuenta y dos cepas (39%) fueron resistentes a alguno de los aminoglucósidos probados: 34 (25,5%) fueron resistentes a la gentamicina y la tobramicina, 17 (12,7%) solo a la gentamicina (manteniendo la sensibilidad a la tobramicina) (7). Otro estudio demuestra que los perfiles de resistencia de los aislamientos fueron muy variados. Cinco de ellos fueron resistentes sólo a IMI y 6 lo fueron sólo a MER. El resto de los microorganismos, 80 fueron resistentes a ambos carbapenemes. (2) De alguna manera este resultado coincide con respecto a que meropenem es más resistente que imipenem.

El tratamiento de las infecciones graves causadas por este microorganismo suele ser dificultoso ya que, por un lado *P. aeruginosa* es naturalmente resistente a una gran variedad de antimicrobianos y, además, puede adquirir mecanismos de resistencia para prácticamente la totalidad de los antimicrobianos disponibles para su tratamiento. Por ello, es cada vez más frecuente la necesidad de emplear los carbapenemes, antibióticos β -lactámicos de amplio espectro y con actividad contra la mayoría de los patógenos, con la consiguiente selección de aislamientos resistentes que se refleja en el 26% de resistencia a ambos carbapenemes informado por el programa de relevamiento de la resistencia SIR (Sistema Informático de Resistencia) para el período 2002-2003 (Informe SIR 2002-2003, www.aam.org.ar). Con la diferencia que no se tiene el porcentaje de resistencia global para ambos carbapenemes al igual que los aminoglucosidos que solo se tomaron en cuenta los que son resistentes a ambos carbapenemes pero mayor resistencia la presento contra meropenem.

Otros estudios realizados en 2008 de los 9 aislados presentaron una sensibilidad intermedia o resistencia a ceftacidima, cefepima, gentamicina, tobramicina, amikacina y ciprofloxacina. Ocho de los 9 aislados fueron sensibles a aztreonam (3). Con respecto a los demás antibioticos los reportados en nuestro trabajo no coinciden con las investigaciones realizadas por otros autores debido a que solo consideran los que son resistentes a los carbapenemes que en nuestro caso a pesar de que se toma en cuenta a los que son y no resistentes a carbapenemes se observa una elevación con relación a los demás antibióticos encontrando una mejor actividad de cefepime y amikacina.

P. aeruginosa por ser un microorganismo multirresistente con elevado porcentaje de resistencia a todas las cefalosporinas incluida cefotaxima o ceftriaxona, debido a la producción de β -lactamasas, en el hospital se ha observado una buena sensibilidad a los ceftazidima, aztreonam, cefepima y aminoglucosidos con respecto a amikacina pero no así a la gentamicina. Cabe destacar que en este estudio solo un 17.2 % de las cepas estudiadas

demonstraron resistencia a cefepime. Lo preocupante de este germen es que entre un 17.2% y 24.2% de los aislamientos de *P. aeruginosa*, presentaron resistencia conjunta a imipenem, amikacina, y cefepime que son los antimicrobianos más frecuentemente utilizados en el hospital. Este hecho es preocupante ya que con el pasar del tiempo va en aumento los aislamientos de cepas multirresistentes, lo cual haría extremadamente difícil el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas*. Las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio demostraron resistencia a imipenem como meropenem y por tanto a pesar de que imipenem es el antimicrobiano que presentó menor resistencia después de cefepime la mejor actividad frente a este germen, este hecho llevado a cabo en el 2009 en el hospital nos demuestra esta afirmación ya que el antimicrobiano imipenem en este estudio muestra una resistencia baja pero que va aumentando debido a la capacidad de ir adquiriendo diferentes mecanismos de resistencia con el tiempo.

Bueno en nuestro medio con lo que respecta a la sensibilidad antimicrobiana de esta bacteria dos estudios realizados en el 2005 hasta el 2007 en este Hospital se pudo observar que imipenem va disminuyendo su sensibilidad de 87% a 82% pero lo contrario sucede con amikacina que va de 81,5% a 88,5% así mismo durante 2006 a 2007 tanto gentamicina y ciprofloxacina la sensibilidad es muy baja y ceftazidima de igual forma va en descenso considerablemente (56, 72). Como se puede recalcar la comparación que se hace indiscutible ya que en relación con nuestros resultados se comprueba que va en aumento la resistencia a estos antibióticos y sin duda que esta bacteria va evolucionando o adaptándose a medida que transcurre el tiempo para sobrevivir.

En relación a la respuesta de las quinolonas fluoradas, la bibliografía refiere sensibilidades que van desde 100% a 25,8%. Nosotros obtuvimos una sensibilidad de 50,4% que por tanto están enmarcados dentro de esos valores y por lo mismo podemos indicar que su actividad es reducida. En relación a este grupo de antibacterianos se ha demostrado con este estudio que todo el grupo

es resistente completamente por lo cual va emergiendo la multirresistencia en *P. aeruginosa*. La descripción de nuevas carbapenemasas es cada día más frecuente, y en la actualidad, es uno de los mecanismos emergentes considerado responsable del aumento de la resistencia a imipenem y a meropenem. Este hecho hace necesario el desarrollo de técnicas rápidas y específicas para lograr la identificación de estas enzimas.

Los test fenotípicos que permiten determinar la presencia de metalo- -lactamasas son fáciles de realizar. Los discos de EDTA ofrecieron resultados claros y fácilmente interpretables. En este test hay que añadir que las variaciones en el disco o distancia entre los discos en la placa varía de forma importante el resultado. Los test fenotípicos descritos son utilizados como técnicas rápidas de laboratorio para la detección de carbapenemasas y esto lo encontramos en varios trabajos publicados. A pesar de la utilidad de los test fenotípicos los resultados obtenidos en este estudio indican y apoyan la sugerencia de otros autores con respecto a la necesidad de realizar también test de identificación genética para la caracterización específica de nuevas carbapenemasas. Esto debido a que este test no detecta más que metaloenzimas, por tal motivo es que la prevalencia encontrada en nuestro trabajo es muy baja en lo que respecta a otras investigaciones en las cuales se realizaron con otros métodos. En Bolivia Cochabamba se obtuvo como resultados que los 4 aislamientos de *A. baumannii* son resistentes a imipenem y de *P. aeruginosa*; dos son resistentes a imipenem y uno presenta resistencia intermedia. En cuanto a la presencia de carbapenemasas mediante el test de Hodge, fueron positivos cuatro aislamientos de *A. baumannii* mientras que los tres de *P. aeruginosa* son negativos. En el test fenotípicos de Hodge+ZnSO₄ para la presencia de metalo- -lactamasas, se obtuvo resultado positivo para tres de los 4 aislamientos de *A. baumannii*. El test DDST mostro resultado negativo. (67)

En relación a la prevalencia que presenta la metalobetalactamasa en el Hospital Obrero para *P. aeruginosa* es uno (0,96%) lo que nos demuestra que esta enzima no esta presente en la resistencia que presenta esta bacteria en los demás aislamientos, pero de alguna manera no quiere decir que no tengan otros tipos de carbapenemasas los cuales no se evaluaron debido a que no se realizaron pruebas genotípicas, de la misma forma también dicha resistencia puede deberse por otros mecanismos de resistencia ya descritos. Probablemente estemos infravalorando la presencia de metaloenzimas cuando son otros los mecanismos que podrian estar implicados. Así también en otras investigaciones realizadas para la detección de esta enzima se realizaron con tiras de EDTA, Hodge y otro denominado DDST.

Los resultados de la búsqueda de metaloenzimas con tiras de E-test al igual que la prueba disco-placa llegaron al mismo resultado se aislaron cuatro probables portadores de metaloenzimas para imipenem y meropenem (3%) y estos fueron sensibles a todos los betalactamicos probados, así como al aztreonam y las quinolonas. (67) En cuanto a la prevalencia de *P. aeruginosa* portadores de genes de metaloenzimas de tipo VIM (16), se habla de un 20% en cepas procedentes de pacientes hospitalizados (17). En Argentina es importante notar que la prevalencia de MBLs en aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes, resultó al menos del 11%. (2) Lo que nos demuestra que esta enzima no esta presente en la resistencia que presenta esta bacteria en los demás aislamientos, pero de alguna manera no quiere decir que no tengan otro tipo de carbapenemasas los cuales no se evaluaron debido a que no se realizaron pruebas genotípicas, de la misma forma también dicha resistencia puede deberse por otros mecanismos de resistencia ya descritos.

Estas investigaciones no coinciden del todo con nuestros resultados dado que presenta un porcentaje muy bajo quizá debido a que no se realizo otro tipo de prueba fenotipica seguido de pruebas genotípicas confirmatorias de que tipo de carbapenemasa corresponde o definitivamente es otro tipo de resistencia como bombas de eflujo, sierre de porinas o la disminución de las mismas para el resto

de cepas resistentes obtenidas. Es así que el estudio de los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* es importante para una buena aproximación terapéutica, ya que no siempre se expresan fenotípicamente.

Por otra parte la resistencia múltiple que presentan los aislamientos de *P. aeruginosa* puede ser debido a otros mecanismos de resistencia como la presencia de estructuras genéticas móviles como los integrones o plásmidos. Estas estructuras permiten a la bacteria captar genes que le confieren ventajas selectivas y le permiten una rápida adaptación a los cambios ecológicos, como a la quimioterapia antimicrobiana. Por lo mismo podemos indicar que existen algunos datos preliminares a nivel fenotípico, pero no se conocen los genes que podrían estar involucrados en esta resistencia a imipenem, por lo que es necesario conocer estos aspectos para orientar sobre la necesidad de un uso adecuado de los antibióticos.

La presencia de las carbapenemasas intrínseca de la especie de *P. aeruginosa* junto con la presencia de integrones o plásmidos que posiblemente presente en los aislamientos, hace que presenten una múltiple resistencia a los antimicrobianos analizados así como a los carbapenems que recordemos que actualmente siguen siendo de primera elección en la terapia antimicrobiana frente a cepas multirresistentes.

Al no haber realizado pruebas genotípicas para comprobar el tipo de resistencia que presenta la cepa nos deja con una incógnita que corresponde a los cuatro mecanismos de resistencia principalmente la presencia de carbapenemasas de tipo serina o metalo enzimas sobre todo si son inducibles o resistentes como en el caso de *P. aeruginosa* obtuvimos un bajo porcentaje de prevalencia de la enzima pero la resistencia a carbapenems va aumentando así como a los demás antibióticos demostrándonos que presenta otro tipo de mecanismo. En el caso de este estudio nos ayudo a detectar la presencia de unas enzimas entre ellas la AMPC indicándonos que la posibilidad de presentar otro tipo de - lactamasa tipo AMPC en este caso *P. aeruginosa* la presenta de tipo

cromosómica. Las bacterias que poseen el gen *ampC* en los cromosomas presentan un sofisticado sistema molecular que regula la expresión del gen, de tal modo que sólo se sintetiza la β -lactamasa cuando es necesaria (65).

Es así que nuestros resultados sugieren la necesidad de un riguroso control de estos aislamientos para evitar su diseminación en el ambiente hospitalario y evitar un grave problema de resistencia al tratamiento. Con la ayuda de diferentes controles y programas que ayuden a los trabajadores en salud para evitar una diseminación y resistencia de esta bacteria ambiental.

VI. CONCLUSIONES

La resistencia de *P. aeruginosa* a los carbapenems constituye una amenaza para los pacientes y las instituciones de salud, ya que por muchos años han sido los antibióticos más estables y activos contra bacterias con resistencia múltiple.

Concluimos indicando que las metalobetalactamasas no son la única forma para presentar resistencia en *P. aeruginosa* sino que la resistencia puede estar dada por otros mecanismos es por tal motivo que en el Hospital Obrero la prevalencia es baja lo que demuestra que está implicado otro mecanismo de resistencia, de igual forma la frecuencia con la que se presenta estas infecciones se encuentra afectando sobre todo a la tercera edad en unidad de terapia intensiva. Del mismo modo la sensibilidad reportada nos demuestra que va en aumento por lo mismo se debe tomar medidas adecuadas contra esta forma de resistencia que va aumentando y una de las formas de frenar este problema es realizando estudios de tipo genotípico que debe implementarse así como la acción del personal de salud para un servicio adecuado al paciente.

Con lo que respecta a la terapia antibiótica alternativa cuando va aumentando la resistencia a la gran mayoría de los antimicrobianos como se observó todavía

se puede dar uso a la amikacina y cefepime por el menor porcentaje de resistencia que se reporto de la misma forma el uso de colistina y de aztreonam que son mucho mas efectivos contra multiresistencias demostradas y así se puede dar uso adecuado con las correspondientes formas de uso terapéutico. El aztreonam, que no se ve afectado por la acción de las metaloenzimas, es el único también cuya actividad in Vitro refleja su actividad in vivo.

VII. RECOMENDACIONES

El manejo de antibióticos con una aproximación de tipo correctivo permite el uso empírico de antibióticos de amplio espectro seguido de una revisión de las prescripciones por parte del equipo supervisor y luego, una disminución del espectro del antibiótico o una suspensión del mismo en el segundo o el tercer día de terapia, si la decisión se apoya en los cultivos, en los resultados de susceptibilidad y en la respuesta clínica del paciente (57). Varios estudios han demostrado que, aunque el abuso de antibióticos puede promover la aparición de resistencia, los cambios apropiados en el uso de los antibióticos pueden llevar a la recuperación de la sensibilidad.

Las instituciones de salud deben crear programas para el manejo adecuado de los antibióticos basados en la epidemiología local y el mecanismo de resistencia bacteriana operante, así como utilizar estrategias para la prevención y el control de la diseminación de estas bacterias con resistencia múltiple. La educación para el uso racional de los antibióticos, el lavado de manos, la implementación de medidas estándar y el control en la formulación, son estrategias que han sido útiles y costo-efectivas para el control de la resistencia bacteriana. De esta manera se puede mantener la eficacia de los antibióticos que todavía son sensibles contra las infecciones de *P. aeruginosa* o bueno que de alguna manera a pesar de aumentar la resistencia a estos antibacterianos se pueda mantener o parar implementando dichos programas y así evitar la diseminación de esta multirresistencia tanto en el Hospital como en la población en general.

Los objetivos generales de cualquier programa de control de resistencia a antibióticos deben incluir una mejor utilización de los agentes antibióticos disponibles para disminuir las tasas de resistencia bacteriana, mejorar la supervivencia de los pacientes y reducir los costos del tratamiento. Tales programas requieren un equipo multidisciplinario en colaboración continua y con una motivación adecuada.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Dr. Christian Trigo, Dra. Ester Damani, Dr. Luis E. Jáuregui, El impacto de la resistencia antimicrobiana en Bolivia, Instituto Nacional del Laboratorio de Salud INLASA, ed. Nº 1, 2005, pag 188
2. G. Pagniez, M. Radice, A. Cuirolo, O. Rodriguez, H. Rrodriguez, C. Vay, A. Famiglietti, G. Gutkind, Prevalencia de metalo-b-lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires, Revista Argentina de Microbiología (2006) 38: 33-37
3. Helen C. Maltezou, Metallo-B-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?, International Journal of Antimicrobial Agents 33 (2009) 405.e1-405.e7
4. Jawetz S. Batel, MICROBIOLOGIA MEDICA, ed Nº 18, 2005, pag 786
5. Nam Hee Ryoo, Kyungwon Lee, Jong-Baeck Lim, Yong Hwan Lee, Il Kwon Bae, Seok Hoon Jeong, Outbreak by meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-6 metallo-β-lactamase in a Korean hospital, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 63 (2009) 115-117
6. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L. y colaboradores, Detección de *Pseudomonas aeruginosa* Productora de metalo-β-lactamsas en un Gran Laboratorio Centralizado, Journal of Clinical Microbiology 43(7): 3129-3135

7. A. Sánchez, S. Salso, E. Culebras y J.J. Picazo, Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, Rev. Esp. Quimioterap. Diciembre 2004; Vol. 17 (Nº4), 336-340
8. Yoshiko Miyajima, Kazufumi Hiramatsu, Eri Mizukami, Ryotaro Morinaga, Hiroshi Ishii, Ryo Shirai, Kenji Kish, Issei Tokimatsu, Tetsunori Saikawa, Jun-ichi Kadota, In vitro and in vivo potency of polymyxin B against IMP-type metallo-
-latamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, International Journal of Antimicrobial Agents 32 (2008) 437-440
9. Sanford Jay P. *Pseudomonas*. En: Mandell, Dougals y Benenett. Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica (4.^aed.). Abuenos Aires: Editorial Panamericana, 1997; 2.217-2.252.
10. LIVERMORE DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. Curr Opin Investig Drugs. 2002; 3:218-24.
11. JONES RN (ED). Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobial Program. Clin Infect Dis. 2001; 32:S81-156.
12. SADER HS, JONES RN, GALES AC, SILVA JB, PIGNATARI AC, THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis. 2004; 8:25-79.
13. VILLEGAS MV, OLIVERA MR, CORREA A, SUÁREZ CJ, MIRANDA MC, LOLANS K, QUINN JP, COLOMBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. High prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Colombian hospitals: evidence for nosocomial outbreaks. Presented at 34th Annual Meeting IDSA. San Francisco, California; 2005.

14. Pai, H., Kim, J. Kim, J., Lee, J., Choe., K. Gotoh, N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 480-484.
15. Nordmann, P., Poirel, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 65: 321-331.
16. Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
17. Yatsuyagani, J., Saito, S., Harata, S, *Class I integron containing metallo-beta-lactamase gene bla VIM-2 in Pseudomonas aeruginosa clinal strains isolated in Japan*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 626-628
18. National Commitee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S14, Wayne, PA 2004; 24: 1.
19. Yan, J.Y., Hsueh, P., Ko, W. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identificaction of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agentes Chomether* 2001; 45: 2224-2228.
20. Mesa Española de Normalizacion de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). Recomendaciones de grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 13: 73-86.
21. Bellais, S., Mimos, O., Leotard, S. *Efficay of batalactams for treating experimetally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamese-producing strain of Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2032-2034.

22. Poumaras, S., Tsakris, A., Maniati, M., Tzouvelekis, L.S., Maniatis, A.N. Novel variant (VIM-4) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 4026-4036
23. Cardoso, O., Leitao, R., Figueiredo, A. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist* 2002; 8: 93-97
24. Mendes, R.E., Castaheira, M., García, P. First isolation of bla (VIM-2) in Latin America; Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 131-135
25. Luzzarro, F., Endimiani, A., Docquier, J.D., Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 131-13
26. Lagatolla, C., Tonin, E.A., Monti-Bragadin, C. Endemic carbapenem resistant *P. aeruginosa* acquired metallo-beta-lactamase determinants in European Hospital. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 535- 538
27. Trigo C, Damiani E. Guía práctica para la interpretación clínica del antibiótico. Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica LNRBC-INLASA Y APUA (Alianza para el uso Prudente de los Antibióticos) 2007.
28. Departamento de Biología Molecular. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud pública mexicana*, 1998; 36(4):428-438.
29. Trexler M. *et cols. Antibacterial therapy. Principles of selection and use of antibacterial agent.* *Infectious Disease clinic of North America*, June 2000; 14(2).
30. Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med* 1991; 324: 601-12.

31. KOH TH, SNG LH, BABINI GS, WOODFORD N, LIVERMORE DM, HALL LM. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Singapore producing IMP-1 beta-lactamase and lacking an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:1939-40.
32. BRADFORD PA, URBAN C, MARIANO N, PROJAN SJ, RAHAL JJ, BUSH K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC betalactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:563-9.
33. WOODFORD N, TIerno PM JR, YOUNG K, TYSALL L, PALEPOU MF, WARD E, PAINTER RE, SUBER DF, SHUNGU D, SILVER LL, INGLIMA K, KORNBLUM J, LIVERMORE DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A betalactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:4793-9.
34. HANCOCK RE. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* 1997; 5:37-42.
35. LIVERMORE DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002; 34:634-40.
36. GRKOVIC S, BROWN MH, SKURRAY RA. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66:671-701.
37. VILA J, MARCO F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; 20:304-10.
38. FERNÁNDEZ-CUENCA F, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, CONEJO MC, AYALA JA, PEREA EJ, PASCUAL A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of

carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51:565-74.

39. Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A. Cloning and characterization of bla-VIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate, *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584-1590.

40. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.*2009; 22: 582–610.

41. Livermore D. Acquired carbapenemases. *J. Antimicrob Chemother* 1997; 39: 673-6.

42. Tamber S, Ochs M, Hancock R. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 2006; 188: 45-54

43. Moya B, Dotsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of nonessential penicillin-binding protein. *PloS Pathog.* 2009; 5: e1000353.

44. JACOBY GA, MUNOZ-PRICE LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med.* 2005; 352:380-91.

45. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 1133–48.

46. PHILIPPON A, ARLET G, JACOBY GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1-11.

47. JACOBS C, FRERE JM, NORMARK S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell.* 1997; 88:823-32.

48. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 24–38.
49. CAO VT, ARLET G, ERICSSON BM, TAMMELIN A, COURVALIN P, LAMBERT T. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46:895-900.
50. BIDET P, BURGHOFFER B, GAUTIER V, BRAHIMI N, MARIANI-KURKDJIAN P, EL-GHONEIMI A, BINGEN E, ARLET G. In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:3562-5.
51. WALSH T, TOLEMAN MA, POIREL L, NORDMANN P. Metallo- - lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:306-25.
52. LIVERMORE DM, WOODFORD N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* 2000; 3: 489-95
53. HERITIER C, POIREL L, LAMBERT T, NORDMANN P. Contribution of acquired carbapenem–hydrolyzing oxacilinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3198-202.
54. VILLEGAS MV, LOLANS K, OLIVERA MR ET AL. First detection of metallo-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:226-9.
55. CRESPO M P, WOODFORD N, SINCLAIR A, KAUFMANN ME, TURTON J, GLOVER J, VELEZ JD, CASTAÑEDA CR, RECALDE M, LIVERMORE DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5094-101.

56. Univ. Daniel Alvarez Villca, Determinación del perfil de sensibilidad antimicrobiano de cepas que presentan multirresistencia, aisladas en muestras procesadas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Obrero N°1 durante el segundo semestre del 2005; pag 82.
57. PATERSON DL. The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals. *Clin Infect Dis.* 2006;42:S90-5.
58. SAFDAR N, MAKI DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med.* 2002; 136:834-44.
59. PARRINO TA. Controlled trials to improve antibiotic utilization: a systematic review of experience, 1984- 2004. *Pharmacotherapy.* 2005; 25:289-98.
60. MASTERTON RG. Antibiotic cycling: more than it might seem? *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55:1-5.
61. WATANABE M, IYOBE S, INOUE M, MITSUHASHI S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 147-51.
62. SENDA K, ARAKAWA Y, NAKASHIMA K ET AL. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40:349-53.
63. YAMAGUCHI H, NUKUGA M, SAWAI T. Appearance of an R-plasmid mediated metallo β -lactamase in Gramnegative enteric bacteria. 1994, Gen Bank accession number D29636. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>

64. RAHAL JJ, URBAN C, HORN D ET AL. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial Klebsiella. JAMA. 1998; 280:1233-7.

65. CARLOS JOSÉ SUÁREZ, JUAN NICOLÁS KATTÁN, ANA MARÍA GUZMÁN, MARÍA VIRGINIA VILLEGAS¹ Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control, Asociación Colombiana de Infectología vol. 10-2, 2006

66. Lee K, Lim YS, Yong D et al. *Evaluation of the Hodge test and imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. And Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol 2003; 41:4623-6.

67. Laboratorio de Microbiología del Instituto gastroenterológico Boliviano-Japonés del Complejo Hospitalario Viedma en Cochabamba, Bolivia durante los meses comprendidos de abril hasta octubre del 2006.

68. Rodríguez MC, Ruizdel B, Rodríguez-Mirones C, Romo M, Monteagudol, Martínez-Martínez L. Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de la metalobetalactamasa VIM-2 en Cantabria, España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28: 99–103.

69. El Salabi A, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-β-lactamase SPM-1 in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:582.

70. Jordi Vila* y Francesc Marco, Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores, Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.2010; 28(10):726 736

71. Jorge Calvo, Rafael Cantón, Felipe Fernández Cuenca, Beatriz Mirelis, Ferran Navarro, Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en

gramnegativos. 2011, Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (D:\interpretacion antibiograma\cap38.asp.htm)

72. Univ. Mabel Xiomar Cochi Coaquira, Perfil de sensibilidad antimicrobiana de microorganismos no fermentadores aislados en muestras de pacientes del Hospital Obrero N°1 de la ciudad de La Paz durante la gestión 2006 y 2007; pag 54.

ANEXOS

ANEXO 1.

Fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*. Deficiencia de porinas y sistemas de expulsión activa

Fenotipos de resistencia									
TIC	TCL	PIP	PTZ	CAZ	CEF	ATM	IMP	MER	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	S	S	R	r	Pérdida porina OprD
R	R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	r	Sistema MexAB-OprM
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r/R	S	S	Sistema MexCD-OprJ
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r	Sistema MexEF-OprN*
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	S	Sistema MexXY-OprM

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefepima; IMP: Imipenem; MER: meropenem; PIP: piperacilina; PTZ: piperacilina/tazobactam; R: resistente; S: sensible; r: sensibilidad disminuida; TCL: ticarcilina/ác. Clavulánico; TIC: ticarcilina.

* MexEF-OprN esta regulado por el factor de transcripción MexT, el cual también regula negativamente la expresión de OprD, por lo que la disminución en la sensibilidad a carbapenémicos en este fenotipo es debido a la sobreexpresión de MexT.

ANEXO 2.

Fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*. Mecanismos de resistencia enzimáticos

Fenotipos de resistencia									
TIC	TCL	PIP	PTZ	CAZ	CEF	ATM	IMP	MER	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
r	R	r	r	r	S/r	r	S	S	Desrepresión parcial AmpC
R	R	R	R	R	r/R	R	S	S	Desrepresión total AmpC
R	S	R	S	S	S/r	S/r	S	S	β-lactamasa de clase A-No BLEE [*]
R	S/r	R	S/r	R	R	R	S	S	β-lactamasa de clase A-BLEE ^{**}
R	S	R	S	R	R	R	r/R	r/R	GFS-2
r/R	r/R	r/R	r/R	S	R	S	S	S	OXA-1, OXA-31
R	R	R	R	R	r/R	r/R	S	S	OXAs-BLEE
R	R	R	R	R	R	S	r/R	r/R	Metallo-β-lactamasa ^{***}

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefepima; IMP: Imipenem; MER: meropenem; PIP: piperacilina; PTZ: piperacilina/tazobactam; R: resistente; S: sensible; r: sensibilidad disminuida; TCL: ticarcilina/ác. Clavulánico; TIC: ticarcilina.

* TEM 1-2, PSE-1, PSE-4, CARB-3, CARB-4.

** Derivadas de enzimas TEM y SHV, PER, VER.

*** IMP, VIM, SPM y GIM.

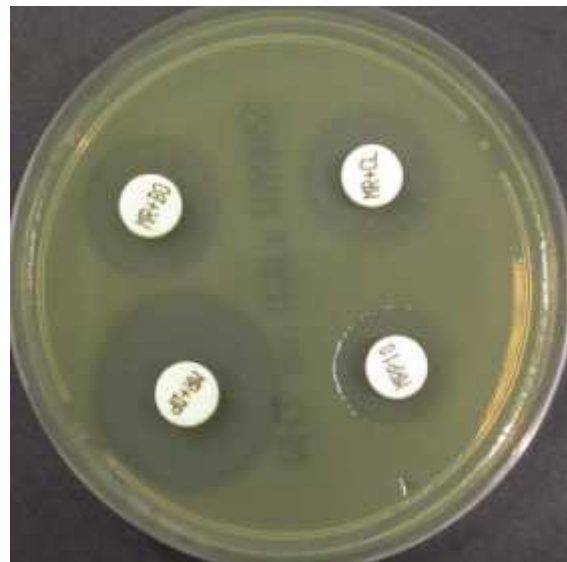
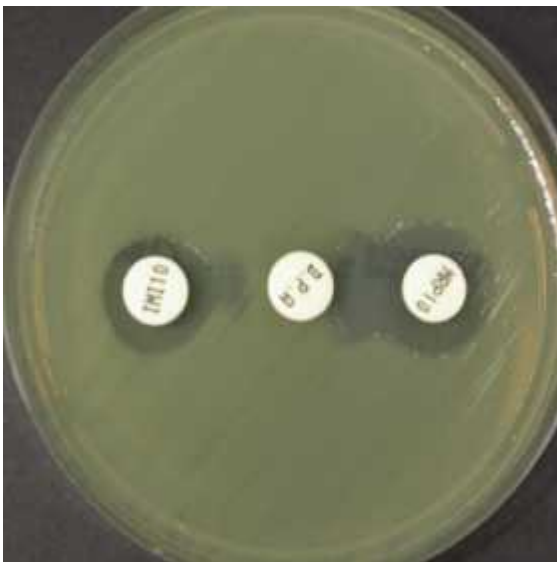
ANEXO 3.

A) Desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* en agar nutritivo y B) agar sangre respectivamente.



ANEXO 4.

A) Prueba de sinergia de doble disco positiva en el caso de una cepa *Pseudomonas aeruginosa* portadora de la betalactamasa VIM-2. B) Prueba de discos combinados con inhibidor positivo en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* portadora de la betalactamasa VIM-2.



IMI, imipenem; MRP, meropenem; D.P.A, ácido dipicolínico. MRP, meropenem; MR+DP, meropenem + ácido dipicolínico; MR+CL, meropenem + cloxacilina; MR+BO, meropenem + ácido borónico.