

JUNTA DIRECTIVA

Lic. Oscar Cobar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A Dios

Por ser quién guía mi vida.

A mi madre

Alicia López. Por brindarme su amor, apoyo, comprensión, por sus consejos, por escucharme, por brindarme educación, por ayudarme en todo momento y sobre todo por luchar y creer en mí.

A mi abuela

Maria Zapeta (QEPD) por su amor incondicional, por ser mi respaldo, por todos sus esfuerzos y preocupaciones, por criarme y por los valores inculcados en mí.

A mis hermanos

Por apoyarme siempre, por que son las personas que más quiero en la vida y que a pesar de todo siempre estarán allí para ayudarme.

A mis amigos

Por su amistad, que es uno de los sentimientos más sinceros, puros y valiosos que uno puede encontrar en la vida. Gracias por su apoyo, consejos, cariño y por los momentos que hemos compartido.

A todos mis compañero de promoción

AGRADECIMIENTOS

Universidad de San Carlos de Guatemala

Por permitirme estudiar y formarme como profesional en esta magnífica casa de estudios.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Por todos los conocimientos que me brindó para poder llegar a ser profesional.

Escuela de Química Biológica

Por permitirme recibir los conocimientos impartidos y formarme como profesional.

Mis asesores

Lic. Jorge Matheu por todos los conocimientos, orientación, paciencia y apoyo brindado.

Lic. Carlos Pérez por sus consejos, conocimientos, ayuda y orientación.

Mis revisores

Lic. Osberth Morales y Licda. Amanda Gálvez por el tiempo y dedicación que tomaron para realizar aportes tan valiosos para la finalización de este trabajo.

Hospital General San Juan de Dios

Por abrirme las puertas para poder realizar esta investigación.

Laboratorio Nacional de Salud

Por permitirme realizar parte de mi trabajo y brindarme conocimientos.

ÍNDICE

I. RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	4
III. ANTECEDENTES	6
A. Generalidades de <i>Acinetobacter</i> spp.	6
1. Microbiología	6
2. Epidemiología	6
3. Factores de riesgo	7
B. Mecanismos de acción de los antimicrobianos	7
1. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	8
2. Alteración de la membrana celular	9
3. Inhibición de la síntesis proteica	9
4. Alteraciones de la síntesis de ácidos nucleicos	9
C. Resistencia bacteriana	9
D. Mecanismos de resistencia bacteriana	10
1. Bombas de expulsión activa	10
2. Disminución de la permeabilidad de la membrana	10
3. Cambios estructurales de las proteínas de unión de penicilina PBP's	10
4. Producción de beta lactamasas	11
a. Beta lactamasas de espectro extendido	11
b. Beta lactamasas con mecanismo tipo Amp-c	12
c. Mecanismo de acción de las beta lactamasas	12
d. Clasificación de las beta lactamasas	12
E. Mecanismos de resistencia en <i>Acinetobacter</i> spp.	14
F. Metaloenzimas	16
1. Clasificación de las metaloenzimas	17
2. Codificación cromosómica	18
3. Aparato genético de metaloenzimas transferibles	19
4. Bioquímica	20
5. Metaloenzimas transferibles	21
a. Metaloenzimas tipo IMP	21
b. Metaloenzimas tipo VIM	24
c. Metaloenzimas tipo SPM-1	29

d. Metaloenzimas tipo GIM-1	29
e. Inhibidores experimentales de metaloenzimas	30
f. Detección de metaloenzimas	30
IV. JUSTIFICACION	32
V. OBJETIVOS	33
VI. HIPÓTESIS	34
VII. MATERIALES Y METÓDOS	35
VIII. RESULTADOS	39
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
X. CONCLUSIONES	48
XI. RECOMENDACIONES	49
XII. REFERENCIAS	50
XIII. ANEXOS	56

I. RESUMEN

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural, el cual se ve aumentado muchas veces debido a la mala utilización que hace el hombre de los antibióticos y a la indiferencia demostrada a las consecuencias de ese hecho.

Las metaloenzimas (MBL) son una clase de β -lactamasa cuya característica química es poseer metales en su estructura (zinc). Actualmente se relacionan con la resistencia a los carbapenemes entre los cuales se encuentra el Imipenem y a la mayoría de beta lactámicos y cefalosporinas.

Debido a la importancia que ha cobrado el fenómeno de la resistencia antimicrobiana a nivel mundial se realizó este estudio observacional descriptivo con el propósito de determinar la presencia de metaloenzimas en 106 aislamientos de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenemes provenientes del Hospital General San Juan de Dios.

Para evidenciar la presencia de este mecanismo de resistencia se observó el sinergismo entre el disco de imipenem y el de EDTA utilizando la técnica de doble disco.

Los resultados se analizaron con el programa WHOnet versión 5.4 encontrándose 28 (26%) aislamientos de *Acinetobacter* spp. con metaloenzimas. De éstos la única especie del género *Acinetobacter* que se identificó fue *Acinetobacter baumannii*.

En lo que respecta a las salas, se encontró más aislamientos con MBL en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos, la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología (UCIN) y la Unidad de Terapia Intermedia de Pediatría (UTIP).

Los microorganismos que presentaron el mecanismo de resistencia estudiado provenían de distintos tipos de muestras, principalmente de secreciones varias, catéter y orina.

En los aislamientos con metaloenzimas estudiados se observó una alta multirresistencia, específicamente en carbapenemes y penicilinas.

Es necesario este tipo de estudios para que el personal de salud comprenda la necesidad del control sobre el uso adecuado y racional de los antibióticos que aún disponen de vida útil ante los agentes microbianos importantes a nivel hospitalario.

II. INTRODUCCION

En las últimas dos décadas, *Acinetobacter* sp. ha emergido como un patógeno nosocomial de gran relevancia mundial, debido a que puede ocasionar infecciones como neumonía, bacteremia, meningitis e infecciones del tracto urinario, asociándose a alta mortalidad. Las unidades más afectadas son las de cuidados intensivos y quemados, donde el uso masivo de antibióticos puede causar la aparición de cepas multirresistentes (1). Diversas comunicaciones nacionales y extranjeras revelan el aislamiento de cepas resistentes a casi todos los antibióticos comercialmente disponibles, por lo que las opciones terapéuticas se han limitado drásticamente (2). El incremento en la resistencia antimicrobiana en estas especies de bacterias es un ejemplo de cómo éstas pueden procurar, mantener y expresar nueva información genética que confiera resistencia a muchos antibióticos. Esta característica genética es debida entre otras causas al uso indiscriminado e inadecuado de todo tipo de antimicrobianos (3).

Estas bacterias tienen a su disposición una amplia variedad de mecanismos de resistencia que pueden utilizar para eludir la acción de carbapenemes y otros beta lactámicos. La mayor forma de resistencia es a través de evadir la penetración de la droga (bombas de expulsión), hiperproducción de beta lactamasas, como las beta lactamasas hidrolizadoras de carbapenem. Basados en estudios moleculares, se han descubierto dos tipos de enzimas hidrolizadoras de carbapenem: las tipo serina y metaloenzimas (MBL), que requieren cationes divalentes, usualmente zinc, como un cofactor metálico para la actividad enzimática (3).

En los pasados tres años se encontraron nuevos tipos de MBL transferibles las cuales se han diseminado rápidamente. En algunos países, cepas de *P. aeruginosa* que poseen metaloenzimas, constituyen cerca del 20% de todos los aislamientos nosocomiales. En años recientes los genes de MBL se han trasladado a *Enterobacteriaceae* y el escenario clínico que se está desarrollando muestra un posible brote global de beta lactamasas de espectro extendido. Además, dado que las metaloenzimas pueden hidrolizar virtualmente casi todas las clases de beta lactámicos y que se está a varios años de la implementación de inhibidores terapéuticos, su continua diseminación puede producir serios problemas clínicos (4). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es determinar la presencia de metaloenzimas en aislamientos de *Acinetobacter* spp. obtenidos de pacientes de las distintas salas del Hospital General San

Juan de Dios por medio del método de doble disco sinérgico; así mismo, señalar el porcentaje de éstas en las diferentes áreas de cuidado del hospital y según el tipo de muestra con el propósito fundamental de informar a las autoridades de salud pública para que tomen medidas contra posibles brotes.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades de *Acinetobacter* spp.

1. Microbiología

El género *Acinetobacter* engloba cocobacilos Gram negativo, oxidasa negativo, no fermentadores, no esporulados y aerobios estrictos (1).

Se encuentra ampliamente disperso en la naturaleza, mayoritariamente en agua y suelo. Se ha aislado en personas sanas a partir de la piel, faringe y varias otras localizaciones. El género *Acinetobacter* se clasificaba antiguamente bajo unos quince nombres diferentes incluyendo *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella glucidolytica* y *Moraxella lwoffii*. En 1954, Brisou y Prévot identificaron el género como *Acinetobacter*, con dos especies *A. calcoaceticus* y *A. lwoffii*. Sobre la base de recientes estudios genéticos se han identificado 19 especies diferentes, pero sólo 7 cuentan con nombre (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii* y *A. radioresistens*). Existe una estrecha relación entre el genoma de *A. calcoaceticus* y *A. baumannii*, de manera tal que a veces se les menciona como complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*. En algunos reportes, estos aislados son referidos como *A. calcoaceticus* subespecies *anitratum*. Esta complicada historia taxonómica ha llevado tanto a diagnóstico como clasificaciones equivocadas de las especies en la práctica clínica (1,5).

Acinetobacter se comporta generalmente como especies no virulentas pero, en pacientes críticamente enfermos, está bien documentado su rol patogénico. Los brotes de infecciones nosocomiales han sido comúnmente asociados con *A. baumannii*, otras especies son muy raras (1,5).

2. Epidemiología

Las especies de *Acinetobacter* se encuentran en objetos animados e inanimados. Crecen en casi todas las muestras de suelos y agua fresca (5). En el medio hospitalario, estos microorganismos han sido aislados de humidificadores, equipos de ventilación, la piel del personal de salud, colchones, cojines y otros (5,6). Se ha reportado sobrevivida en superficies secas mayor a 7 días para *A. lwoffii* y mayor a 25 días para *A. baumannii*.

Acinetobacter calcoaceticus sobrevive hasta 13 días en superficies de formica. La persistencia de las especies de *Acinetobacter* en las superficies medioambientales es su característica más distintiva entre los patógenos nosocomiales, explicando su mayor patogenicidad entre pacientes hospitalizados (1).

Acinetobacter sp. es parte de la microbiota cutánea. El 31% del personal de salud es portador de bacilos gramnegativo en sus manos. La faringe, vagina y recto son sitios excepcionales de colonización. Tanto la persistencia sobre superficies secas como su presencia en la piel del personal sanitario, contribuyen a la transmisión cruzada entre pacientes (1).

3. Factores de riesgo

Las especies de *Acinetobacter* se consideran generalmente microorganismos de baja virulencia, salvo en pacientes críticamente enfermos o inmunocomprometidos. Estos microorganismos se asocian más a menudo con infecciones nosocomiales que comunitarias (1).

La identificación de factores de riesgo es importante para el desarrollo de medidas de prevención de colonización e infección. Los múltiples factores identificados para la adquisición de infecciones por *Acinetobacter* incluyen enfermedad grave, infección o sepsis previa, ventilación mecánica prolongada, antibioterapia previa, colonización previa por *Acinetobacter* y estadía prolongada en unidad de cuidado intensivo (UCI) (1).

Se ha asociado el uso previo de antimicrobianos con la colonización e infección por *Acinetobacter*, situación que refuerza la necesidad de un uso prudente de los antimicrobianos (1).

B. Mecanismos de acción de los antimicrobianos

Los principales mecanismos de acción de los antimicrobianos son:

1. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.
2. Alteración de la membrana celular.
3. Inhibición de la síntesis proteica.
4. Alteración de la síntesis de ácidos nucleicos (Anexo 1).

1. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana

Es acción de los antimicrobianos destruir o inhibir el crecimiento de las bacterias, para producir este efecto deben dañar o alterar una o varias estructuras del microorganismo. El mecanismo de acción de algunos antibióticos es el mismo ya sea que actúen sobre bacterias gram positivo o gram negativo. Este mecanismo está condicionado por la anatomía bacteriana y sus constituyentes químicos. Se debe tener en cuenta que los antibióticos para poder actuar deben penetrar a su sitio de acción y por lo tanto ser capaces de llegar a la pared, a la membrana o a otras estructuras de la bacteria. Prácticamente todos los antibióticos aunque poseen un modo de acción primario, actúan de manera secundaria en otras partes de la anatomía o fisiología del microorganismo (8).

Los bacilos gram negativo poseen una capa de mucopéptido delgada que representa el 10% o menos, revestida por un estrato de lipopolisacáridos y uno de lipoproteínas, siendo estos dos últimos elementos los principales componentes de la pared (8).

La resistencia de la pared celular está dada por los mucopéptidos, estos tienen una forma de bloque y son la unidad más importante de la pared celular de la bacteria. Tiene una cadena horizontal formada por aminoazúcares, de la cual se desprenden unas cadenas peptídicas cortas y cerrando el bloque un pentapéptido. Cuando una bacteria se va a dividir aumenta el volumen de su citoplasma y en proporción la pared celular se adelgaza. En el crecimiento normal de la célula hay un equilibrio entre la síntesis y la lisis de la pared celular sin llegar a producirse la destrucción de la célula. La lisis es efectuada por enzimas autolíticas de la pared, entre las cuales se encuentra la acetil muramidasa. Cuando se agrega un antibiótico del grupo activo a nivel de la pared celular, se detiene rápidamente su síntesis, mientras continúa el ritmo de producción en sus otros sistemas (proteínas, productos metabólicos, material genéticos, etc.) incrementando el volumen celular. Las enzimas autolíticas continúan desgastando la pared y por ello ésta deja de ser una protección adecuada ante la gran presión osmótica en el interior de la célula, esta combinación de factores hace estallar la célula en sus puntos defectuosos (8).

El grupo de antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana tienen poca oportunidad de dañar a los bacilos gram negativo, aunque se detiene la síntesis de los mucopéptidos, la función de los otros elementos de la pared celular, y la baja presión osmótica, predominan preservando por más tiempo la integridad del bacilo (8).

2. Alteración de la membrana celular

La membrana impide la entrada o salida de sustancias del citoplasma y por ello la alteración de ésta, lesiona procesos vitales de manera irreversible para el microorganismo. Algunas moléculas de antibióticos poseen un extremo liposoluble y otro hidrosoluble; cuando esta molécula llega a la membrana se inserta entre la capa lipídica y la de proteínas, produciendo una abertura entre estas capas conduciendo a la ruptura de la membrana. Otras sustancias desacoplan la fosforilación oxidativa con un estímulo transitorio del consumo de oxígeno (8).

3. Inhibición de la síntesis proteica

La síntesis proteica tanto en eucariotas como en procariotas, es el mecanismo mediante el cual se expresa la información genética contenida en el ADN. Este mecanismo reviste importancia fundamental puesto que es así como la célula produce las sustancias indispensables para el mantenimiento de sus funciones vitales y para garantizar su reproducción. Cuando uno o ambos procesos son interferidos, el resultado es la muerte de la célula o la inhibición de su crecimiento, este resultado es el que se busca con el empleo de los antibióticos en las infecciones bacterianas (8).

4. Alteración de la síntesis de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano consiste en un solo cromosoma circular de ADN de doble cadena, dentro del nucleoide. La mayoría de los inhibidores de la replicación del ADN se unen con éste de forma irreversible y son muy tóxicos para su utilización clínica. Entre éstos se encuentran inhibidores de enzimas y productores de mutagénesis (8).

C. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente. La mayor parte de la resistencia a antimicrobianos es debida a genes de resistencia que se transfieren por intercambio genético (9).

Dicha resistencia es generada por la aparición de genes de origen cromosómico y extracromosómico cuya diseminación a casi todas las especies bacterianas es debida entre otras causas al uso indiscriminado e inadecuado de todo tipo de antimicrobianos. Esta modificación en el genoma es debida a cambios en los procesos evolutivos

bacterianos que llevan a mutaciones en los nucleótidos del ADN así como a fenómenos de mutación, duplicación, delección o transposición, siendo estos la causa de la dispersión de las cepas resistentes (9).

D. Mecanismos de resistencia bacteriana

Los mecanismos generales de resistencia bacteriana son los siguientes:

1. Salida incrementada del antimicrobiano gracias a bombas de expulsión activa, también llamadas bombas de flujo.
2. Disminución de la permeabilidad de la membrana.
3. Cambios estructurales de Proteínas fijadoras de penicilina (PBP's).
4. Inactivación de la droga (reversible o irreversible) debido a la presencia de beta lactamasas (10).

1. Bombas de expulsión activa

Las bombas de expulsión activa son proteínas capaces de eliminar antimicrobianos, algunas sólo eliminan un tipo de compuestos, pero otras expulsan una amplia variedad de sustratos, con escasa relación química entre sí, por lo que se denominan bombas de expulsión multidroga (10).

2. Disminución de la permeabilidad de la membrana

La penetración de los antimicrobianos a través de la membrana externa de las bacterias ocurre por medio de porinas, que son proteínas transportadoras específicas para compuestos con características fisico-químicas determinadas. Por lo que la permeabilidad de la membrana bacteriana a los antimicrobianos está determinada por la presencia y cantidad de porinas. La resistencia bacteriana por este mecanismo se da cuando la bacteria deja de sintetizar las porinas que permiten el ingreso de los antimicrobianos, o cambia su estructura (10).

3. Cambios estructurales de las proteínas de unión de penicilina (PBP's)

Las PBPs tanto en bacterias gram positivo y gram negativo pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los beta lactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto la bacteria es resistente a agentes antimicrobianos.

Es efectivo para antimicrobianos que tienen como objetivo inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana y cuyo sitio blanco son las PBP's (10).

4. Producción de beta lactamasas (BL)

Las beta lactamasas son proteínas enzimáticas que catalizan la hidrólisis del anillo beta lactámico, separando el enlace amida, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular (2, 10).

Las BL en las bacterias gram negativo se encuentran en el espacio periplásmico entre la pared celular y la membrana externa. Aunque todas las beta lactamasas catalizan la misma reacción, se han aislado y caracterizado numerosos tipos de enzimas que se clasifican en forma diversa de acuerdo, por ejemplo, a su secuencia de aminoácidos, peso molecular o especificidad del sustrato. La localización del gen que codifica la beta lactamasa es variable, pudiendo localizarse en el cromosoma o estar codificada por plásmidos. Las BL cromosómicas son universales en una bacteria específica mientras que la presencia de ellas codificadas por plásmidos es variable y transferible entre las diversas especies bacterianas (10, 11).

a. Beta lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Los organismos productores de beta lactamasas de espectro extendido han aparecido en clínicas y hospitales en los últimos años constituyendo un problema de salud pública grave. Las BLEE se derivan de enzimas TEM (Anexo 2) y sulfhidrilo por sustitución de uno o más aminoácidos (denominada SHV). La frecuencia de BLEE difiere según el área geográfica e institución de salud. Se reportan con un 45% de frecuencia en Latinoamérica y solo 7% en los EE.UU. En Latinoamérica no se habían reportado BLEE hasta 1985 (10).

Estas enzimas son producidas más comunmente por *Klebsiella* y *Escherichia coli* pero se presentan también en otras bacterias gram negativo como *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, y *Citrobacter*, *Morganella Morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, y *Capnocytophaga ochracea* (10).

Los organismos que producen BLEE tienen importantes implicaciones por su resistencia a antibióticos que incluyen cefalosporinas de tercera generación, penicilinas de espectro extendido y monobactámicos. Las tasas de susceptibilidad son variables

para fluoroquinonas, aminoglucósidos y cefalosporinas de cuarta generación. Los carbapenémicos y los beta lactámicos con inhibidores de las BL como la piperacilina-tazobactam son los únicos antibióticos en la actualidad activos contra las BLEE. Desafortunadamente, la utilización de los carbapenémicos ha aumentado en un 67% la aparición de *Pseudomonas aeruginosa* resistente al Imipenem (10, 12).

b. Beta lactamasas con mecanismo tipo AmpC:

Es un mecanismo de resistencia que se activa a partir de la hipersaturación intracelular de monómeros de la pared celular. Se divide en cuatro grupos:

Grupo 1: Antibiótico es un buen inductor, activa la producción de beta lactamasa, pero es sensible a ésta. En este grupo están las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación e inhibidores de beta lactamasas (amoxicilina ácido clavulánico, ampicilina).

Grupo 2: Antibiótico es un buen inductor, es resistente a la enzima. La bacteria produce beta lactamasa pero no destruye al antibiótico. En este grupo están los carbapenemes.

Grupo 3: Antibiótico mal inductor, es sensible a la enzima. El antibiótico se destruye únicamente al contacto con la enzima por lo que es necesario un buen inductor para ello. Ejemplos: Cefalosporinas de tercera y cuarta generación, ticarcilina.

Cuando se presenta una cepa mutante, desreprimida, la producción de beta-lactamasa se mantiene activa debido a que no hay regulador enzimático (Amp R) (3).

c. Mecanismo de acción de las beta lactamasas

Pocas beta lactamasas utilizan iones de zinc para destruir el anillo beta lactámico, pero un grupo numeroso utiliza el mecanismo ester serina. Las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) también reaccionan con beta lactámicos para dar ester serina, pero a diferencia de los ésteres formados por las beta lactamasas, estos no los hidrolizan (3).

d. Clasificación de las beta lactamasas

Se han propuesto varios modelos de clasificación para las beta 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:

La clasificación de Ambler se basa en la estructura molecular de la beta lactamasa y su secuencia de aminoácidos. Esta clasificación que, en forma inicial, fue introducida por Ambler en 1980, reconoce cuatro tipos moleculares designados como A a D. Los tipos A, C y D incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa. Las beta lactamasas de tipo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa y son inhibidas por EDTA (3,13).

La clasificación de Bush se basa en los substratos que la beta 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 las beta lactamasas, propuesto por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, define los cuatro siguientes grupos de acuerdo a los substratos hidrolizados y perfiles de inhibición (13).

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 beta-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 beta lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenemes que son inhibidas por EDTA y no por inhibidores estructuralmente relacionados a los beta lactámicos.

Grupo 4: penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el ácido clavulánico (13).

Tabla 1. Clasificación de beta lactamasas (13).

Grupo Funcional de Bush, Jacoby- Mendeiros		Molecular de Ambler	Atributos de las beta lactamasas en el Grupo Funcional
Grupo	Subgrupo	Tipo	
1		C	AmpC, beta lactamasas en bacteria gram negativa. Los genes a menudo son cromosómicos pero pueden ser plásmido-codificados. Confiere resistencia a todos los tipos de beta-lactámicos, excepto los carbapenemes (a menos que se combinen con cambios en porinas). No son inhibidas por el ácido clavulánico.
2		A, D	La mayoría de enzimas del Grupo 2 son inhibidas por el ácido clavulánico (a menos que se indique lo contrario).
	2a	A	Incluyen penicilinas estafilocócica y enterocócica. Confiere alta resistencia a las penicilinas.
	2b	A	Beta lactamasas de amplio espectro, incluyen TEM-1 Y SHV-1, primordialmente de bacterias gram negativas.
	2be	A	Las beta lactamasas de espectro extendido (BLEEs) confieren resistencia a las penicilinas, oxymino-cefalosporinas y monobactamicos.
	2br	A	Beta lactamasas tipo TEM (IRT) y una tipo SHV que son resistentes a los inhibidores.
	2c	A	Enzimas que hidrolizan la carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolizan la cloxacilina-(oxacilina); inhibidas moderadamente por el ácido clavulánico.
	2e	A	Cefalosporinasas.
	2f	A	Enzimas que hidrolizan los carbapenemes con serina en la zona activa.
3	3a, 3b, 3e	B	Metalo beta lactamasas que confieren resistencia a los carbapenemes y todos los tipos de beta lactamicos excepto los monobactames. No inhibidas por el ácido clavulánico.
4		?	Penicilinasas misceláneas que no caben en otros grupos. No son inhibidas por el ácido clavulánico.

Fuente: Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Mendeiros. 1995. A Functional Classification Écheme for Betalactamasas and its Correlation to Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 39:1211-1233.

E. Mecanismos de resistencia de *Acinetobacter* sp.

Acinetobacter spp. tiene beta lactamasas y es resistente a muchos beta lactámicos, pero la relación entre éstos es poco clara. El problema se debe a la reciente reclasificación, con la separación de los biotipos de *A. calcoaceticus* sub. *anitratu*s y *A. calcoaceticus* sub. *Iwoffii* en 17 grupos relacionados por DNA, de los cuales *A. baumannii* es el mayormente aislado clínicamente. Los miembros de esta especie son más resistentes que las beta lactamasas que son miembros de *A. Iwoffii*, que es la siguiente especie más frecuente en aislamientos de especímenes clínicos (3).

Diversos reportes han comunicado altas tasas de resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter* sp, sus patrones de resistencias varían según especies aisladas y zona geográfica. Seifert y cols informaron que *A. baumannii* es generalmente más resistente

que *A. Iwoffi* (14). El género *Acinetobacter* tiene una rápida tendencia a desarrollar resistencia antimicrobiana (1). Los mecanismos de resistencia contemplan alteraciones de las proteínas ligadoras de penicilinas (PBP), disminución de la permeabilidad de la membrana externa, mutaciones de los sitios blanco e inactivación por enzimas modificantes. Dado que *Acinetobacter* spp son microorganismos gramnegativo, poseen una membrana externa adicional que actúa como barrera de permeabilidad. El transporte a través de la membrana externa está mediado por porinas que producen canales llenos de agua por difusión de moléculas hidrofílicas (por ej.: beta lactámicos y carbapenémicos). Algunos reportes sugieren que la expresión reducida o mutación de porinas estarían asociadas a resistencia a carbapenémicos (1,15).

La membrana externa de *A. baumannii* es menos permeable a los antimicrobianos que la membrana externa de *E. coli*. Según Vila (2002), al analizar la permeabilidad de la membrana externa de *A. baumannii*, detectó que el coeficiente de permeabilidad a las cefalosporinas es de 2 a 7 veces menor que el que presenta *P. aeruginosa* para los mismos beta lactámicos. Por todo ello, se sugiere que una causa de la resistencia intrínseca que presenta *A. baumannii* a los antimicrobianos puede ser atribuida a la presencia de un escaso número de porinas que además poseen un pequeño tamaño de poro. Sin embargo, no se descarta que la expresión constitutiva a niveles bajos de uno o varios sistemas de expulsión activa, contribuya a la resistencia intrínseca basal que presenta *A. baumannii* a diversos agentes antimicrobianos (1, 16, 17).

Los mecanismos de resistencia a beta lactámicos involucran la producción de beta lactamasas cromosomales o plasmidiales, alteraciones de las PBP's y disminución de la permeabilidad a beta lactámicos de la membrana externa. Las beta lactamasas se dividen en tres grupos: clase A de Ambler (penicilinasas), clase B de Ambler (metaloenzimas), clase C de Ambler (cefalosporinasas) y clase D de Ambler (oxacilinasas) (18). Estas enzimas hidrolizan, al menos parcialmente, carbapenémicos y otros beta lactámicos. Las beta lactamasas de clase A se han reportado raramente en *Acinetobacter* sp y *Pseudomonas* sp (1). Se han descrito entre las *Enterobacteriaceas* (p ej: *E. coli*, *Klebsiella* sp) beta lactamasas de espectro extendido (BLEE), que inusualmente se asocian a *P. aeruginosa* o *Acinetobacter* sp. Los microorganismos poseedores de BLEE son distintivamente inhibidos por el ácido clavulánico y son resistentes a los oximino beta lactámicos (por ejemplo cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima o ceftazidima). La mayoría de las BLEE encontradas en *Enterobacteriaceas*

se relacionan con beta lactamasas tipo TEM y SHV (1). En Turquía, Corea y Francia, se ha identificado recientemente en *A. baumannii* una nueva BLEE (PER-1) no relacionada con las BLEE encontradas en *E. coli* y *Klebsiella* sp. Carbonne y cols. (2005) reportaron el primer brote nosocomial con VEB-1, otra nueva BLEE sólo reportada anteriormente en *Enterobacteriaceas* y *P. aeruginosa* en el sudeste asiático (1).

Las beta lactamasas clase B son enzimas dependientes de zinc cuya actividad es inhibida por EDTA, pero no por carbapenémicos o inhibidores de beta lactamasas como el ácido clavulánico, tazonom y sulbactam. Estas metaloenzimas constituyen un mecanismo de resistencia adquirida de localización cromosomal o plasmidial (18, 19). Las oxacilinasas, beta lactamasas de clase D, también se encuentran en especies de *Acinetobacter*, existen múltiples subtipos que tienen diversos patrones de hidrólisis pero, en general, las oxacilinasas hidrolizan débilmente a carbapenémicos (imipenem y meropenem) y no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam. Su acción hidrolítica es inhibida por ácido clavulánico (20). Ocasionalmente los aminoglucósidos son empleados combinados con beta lactámicos para mejorar su actividad bactericida. La resistencia a aminoglucósidos está mediada por tres mecanismos: alteración del sitio de acción ribosomal, reducción de la captura y modificación enzimática del antimicrobiano (1).

Las fluoroquinolonas tienen una buena actividad sobre *Acinetobacter* sp, pero la resistencia está aumentando (1). Los mecanismos de resistencia se relacionan con mutaciones de la ADN-girasa y la topo-isomerasa IV, blancos específicos de tales antibacterianos.

F. Metaloenzimas

Las metaloenzimas (MBLs), requieren cationes divalentes, usualmente zinc, como un cofactor metálico para la actividad enzimática (4, 21).

Las MBLs, como todas las beta lactamasas, se pueden dividir en aquellas que son normalmente mediadas por cromosomas y aquellas que están codificadas en genes de transferencia (4).

En los pasados 3 a 4 años se encontró nuevos tipos de MBLs transferibles las cuales se han diseminado rápidamente. En algunos países, *P. aeruginosa* poseedoras de MBLs, constituyen cerca del 20% de todos los aislamientos nosocomiales, en otros países el número es aun relativamente pequeño. En años recientes, los genes de MBL se han

trasladado de *P. aeruginosa* a *Enterobacteriaceae* y el escenario clínico que se está desarrollando muestra un posible brote global de betalactamasas de espectro extendido. Sin embargo, dado que las MBLs pueden hidrolizar virtualmente casi todas las clases de beta lactámicos, su continua diseminación puede producir una catástrofe clínica (4, 22, 23).

1. Clasificación de las metaloenzimas

En 1980, las MBLs fueron categorizadas formalmente de las beta lactamasas tipo serina en un esquema de clasificación propuesta por Ambler (4). En ese tiempo pocas MBLs se habían estudiado suficientemente como para darle mérito, la excepción más notable fue L1 (de *S. maltophilia*) y BCII (de *B.cereus*). En 1989, Bush clasificó las MBLs en un grupo separado (grupo 3) de acuerdo a su función. Este esquema se basó primeramente en su estructura (en particular la hidrólisis de imipenem), su sensibilidad a EDTA y su carencia de inhibición por inhibidores de beta lactamasas tipo serina. Este esquema fue adoptado hasta 1995 y modificado en 1997 para acomodar el creciente número de enzimas en la clasificación (4). En ese tiempo, solo dos tipos de MBLs transferibles habían sido estudiadas, CcrA de *Bacteroides fragilis* e IMP-1 de *P. aeruginosa* (4, 24).

Todas las MBLs hidrolizan al imipenem, pero esta habilidad varía considerablemente y la tasa de hidrólisis puede o no relacionarse con el nivel de resistencia a carbapenemes de la bacteria. De acuerdo a esto, esta clasificación divide a las enzimas en subgrupos primariamente en base a la hidrólisis de imipenem y otros beta lactámicos. Esencialmente, el grupo de las enzimas 3a posee un amplio espectro de actividad, el grupo de enzimas 3b posee una actividad preferencial por los carbapenemes y el grupo de enzimas 3c hidrolizan pobremente a los carbapenemes comparado con otros sustratos beta lactámicos. Sin embargo, estas enzimas poseen la característica principal de ser universalmente inhibidas por EDTA al igual que por otros agentes quelantes de cationes divalentes, esta característica se correlaciona con su mecanismo de acción (4, 24).

A nivel molecular, las MBLs son un grupo de proteínas virtualmente imposible de clasificar y estandarizar en cuanto a su estructura. Se han hecho esfuerzos para subdividir estas enzimas de la clase B basado en su secuencia o en sus características estructurales. El árbol filogenético indica la relación de una enzima con otra en base a sus secuencias nucleotídicas. En la clase B1 se encuentran las enzimas que poseen un

zinc coordinado con tres residuos de histidina y uno de cisterna este aloja a las metaloenzimas IMP, VIM, GIM y SPM-1 (4). La clase B2 incluye aquellas que poseen una asparagina en lugar de histidina en la primera posición de la unión principal del zinc, a este grupo pertenece las metaloenzimas NXHxD y los derivados de *Aeromonas* spp. y la enzima SFH-1 de *Serratia fonticola*. La metaloenzima L1 es la única ocupante de la clase B3, es la única de todas las beta lactamasas que esta representada funcionalmente como un tetrámero (24).

La estandarización de las MBLs ha sido propuesta en base a un esquema numérico usado para estandarizar la clase A de las beta lactamasas, sin embargo la clase B presenta problemas debido a su naturaleza dispar, principalmente su variabilidad en el número de amino ácidos (25). Este esquema de numeración esta basado principalmente en la alineación de los residuos coordinados al zinc pero desafortunadamente esto no acomoda las nuevas secuencias cuando hay insertos en el medio de la proteína, como se descubrió recientemente en la enzima SPM-1 de *P. aeruginosa* (26).

2. Codificación cromosómica

Algunas bacterias, usualmente del ambiente, poseen MBLs de forma ubicua, sin embargo existe mucho debate respecto a la causa de esto. Un argumento es que después de un periodo considerable de tiempo que la bacteria ha sido expuesta a beta lactámicos o compuestos tipo beta lactámicos esta ha adquirido y mantenido estos genes y sus productos. Otro argumento es que estas enzimas realizan una función celular normal que aun no ha sido elucidada. A pesar de este punto de vista, un número de genes de MBL son inducibles y la mayoría de bacterias que los transportan son o pueden ser altamente resistentes a beta lactámicos (4). Afortunadamente, estos organismos son patógenos oportunistas y con la excepción de *S. maltophilia* y *B. anthracis*, raramente causan serias infecciones. Los MBL codificados cromosomicamente incluyen a *B. cereus* (BC II), *Bacillus anthracis*, *S. maltophilia* (L1) (4), *Aeromonas hydrophilia* (CphA) (27), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB o GOB-1) (28), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1) (29), *Legionella gormanii* (FEZ-1) (4), *Caulobacter crescentus* (Mb11B) (30), *Myroides* spp (TUS-1, MUS-1) (31) y *Janthinobacterium lividum* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) y *S. fonticola* (SFH-1) (4).

3. Aparato genético de metaloenzimas transferibles

Se cree que la diseminación de los genes de MBL se debe al consumo de cefalosporinas de espectro extendido o carbapenemes (22, 32). La mayoría de los genes que codifican a las metaloenzimas IMP, VIM y GIM-1 se encuentran en cassette genéticos en integrones clase 1, los genes de IMP están encontrados también en integrones clase 3 (33, 34). Los integrones son capaces de proveer a los cassettes una vía específica de recombinación entre dos sitios de ADN, uno en el integrón y otro en el cassette del gen (35, 36, 37).

Forman parte de la estructura básica del integrón y se encuentra el gen *intl* (gen que codifica la integrasa clase 1) que codifica una proteína con actividad de recombinasa específica de sitio (IntI), la integrasa, que forma parte de una familia de enzimas cuyo prototipo es la integrasa del bacteriófago λ , actualmente denominadas tirosina-recombinasas. Adyacente a *intl* se encuentra el sitio de recombinación específica de sitio, *attI* (sitio de recombinación del integrón), en el que se integra el *cassette* genético de resistencia. Entre *intl* y *attI* se encuentran dos promotores divergentes, P_I (promotor que transcribe la integrasa) para la expresión de *intl* y P_C (promotor que dirige la transcripción), para la expresión de los *cassettes* genéticos insertos río abajo, puesto que la mayoría de éstos no tiene promotor (Figura 1, Anexo 3). La enzima IntI permite la interacción entre *attI* y el sitio *attC* o elemento de 59 pb de los cassettes genéticos, uniendo ambos sitios y facilitando la integración o escisión del cassette de resistencia en la zona variable del integrón (4, 38).

Si bien los cassettes con genes de resistencia a aminoglucósidos y beta lactámicos pueden moverse de un integrón a otro, no pueden moverse por ellos mismos de un organismo a otro y requieren de otros elementos genéticos como plásmidos y transposones. La mayoría de los genes de MBL se encuentran en plásmidos usualmente con 120 a 180 kb; sin embargo algunos, como *bla_{VIM-7}* de los Estados Unidos, poseen un plásmido de conjugación de 24 kb (39). Hasta el presente se encuentra poca información acerca de los otros genes en estos plásmidos o las funciones que codifican en el hospedero bacteriano (4).

El contexto genético de las MBLs no solo representa una medida de su plasticidad sino también una especulación razonable de cómo se transfieren los genes de las MBLs en brotes a nivel internacional. En el 2003, se realizó la primera descripción genética de una MBL, estableciéndose el gen y su integrón. Se reportó que éste estaba embebido en un

transposon tipo Tn5051 obtenido de un aislamiento de *P. aeruginosa* en Italia (4). El elemento de inserción contenía bla IMP-13 y bla VIM-2 de *P.aeruginosa* proveniente de Polonia en un sitio idéntico. El gen *tnpR* de el transposon de ambos lados era idéntico, lo que sugiere que el éste es el responsable de la diseminación del integron clase 1. Estos datos se corroboran con el hecho de que los aislamientos de *P.aeruginosa* poseen diferentes patrones en la electroforesis en gel de capa fina y que no había evidencia de plasmidos. Se cree que algunos de los integrones Japoneses mediadores de blaVIM-2 están embebidos en transposones (4).

No todos los genes de MBL están asociados con integrones o transposones (26). El contexto genético de blaSPM-1 mostró ser único, siendo adyacente a genes relacionados cercanamente a *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* y no asociada con integrones o trasposones. Interesantemente, bla SPM-1 y los genes que lo rodean son parte de un genoma móvil y encontrados en plásmidos de aproximadamente 180 Kb (4).

4. Bioquímica

Las MBLs y la beta lactamasa tipo serina confieren resistencia a beta lactámicos por medio del rompimiento de enlaces amida el anillo beta lactámico, sin embargo, el camino en el cual estos dos grupos de enzimas consiguen esto difiere considerablemente. Las MBLs poseen un distinto set de aminoácidos que definen la arquitectura del sitio activo que coordina los iones zinc. Los iones Zinc usualmente coordinan dos moléculas de agua necesarios para la hidrólisis. El principal enlace al motivo zinc es histidina-X-histidina-X-ácido aspártico (HXHXD), el cual es común en la mayoría de las MBLs aparte de las enzimas de la clase B2. Sin excepción, el metal preferido es zinc y mientras la mayoría de MBLs acomodan dos iones zinc en su sitio activo, las enzimas de clase B2 poseen un único ion zinc. El mecanismo propuesto de hidrólisis sugiere que el sitio activo orienta y polariza el enlace beta lactámico para facilitar el ataque nucleofílico por el zinc unido al hidróxido (4, 24).

El mecanismo de hidrólisis de las MBLs es complejo y varía de una MBL a otra (4). A diferencia de las beta lactamasa tipo serina, las MBLs poseen un sitio activo con una ranura y de acuerdo a este puede acomodarse la mayoría de sustratos beta lactámicos, facilitando su amplio espectro de actividad. Estos son también importantes para el impedimento de efectos en los inhibidores de serina como el ácido clavulánico y sulbactam que muchas veces son tratados como sustratos pobres. Interesantemente,

ninguno de las MBLs hidroliza bien aztreonam, se ha especulado que este puede ser considerado un inhibidor terapéutico de MBL. Sin embargo, en estudios en animales con neumonía causado por *P.aeruginosa* productora de VIM-2, la infección no pudo ser erradicada con aztreonam incluso cuando a los animales se le administraron altas dosis (4).

Aunque estas enzimas comparten características comunes en configuración y en la arquitectura de su sitio activo, su habilidad para unirse e hidrolizar betalactámicos varía considerablemente. Por ejemplo, VIM-1 y VIM-2 poseen estructuras muy similares. VIM-2 tiende a unirse más a beta lactámicos con más fuerza que VIM-1 y posee significativamente menores valores de K_m para benzilpenicilina, ampicilina, piperacilina, mezocilina, ticarcilina, cefalotina, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, ceftirome, moxalactam y meropenem. La excepción más notable es imipenem, donde VIM-1 y VIM-2 poseen valores de K_m de 1.5 μM y 10 μM respectivamente. Sin embargo, VIM-1 es capaz de hidrolizar más beta lactámicos (piperacilina, azlocilina, ticarcilina, cefaloridina, cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, cepirome, y meropenem) más eficientemente que VIM-2. Además VIM-1 y VIM-2 poseen valores de K_{cat} de 0.2/s y 34/s respectivamente (4). Docquier et al. (2003) especula que estas diferencias cinéticas sustanciales se deben a las sustituciones aminoacídicas cerca del sitio activo, histidina/tirosina en la posición 224 y serina/arginina en la posición 288 (17, 40).

Los valores cinéticos provocan muchas preguntas sobre el porque las MBLs varían tanto en unión e hidrólisis cuando estas son tan similares Sin embargo, muchos estudios se han centrado en las MBLs BCII y CcrA más que en otras con mayor relevancia clínica (4).

5. Metaloenzimas transferibles

a. Metaloenzimas tipo IMP

El primer indicador de esta MBL móvil fue con el descubrimiento de una cepa de *P. aeruginosa* GN17203 en Japón en 1988. El aislamiento poseía un MIC a imipenem de 50 $\mu g/ml$ además de una resistencia a cefalosporinas de espectro extendido. Los alelos de resistencia se encontraron en plásmidos de conjugación transferibles que pudieron mobilizarse a otras cepas de *Pseudomonas*. Tres años después un gen idéntico se encontró en una cepa de *Serratia marcescens* Tn9106 aislada de una infección de tracto

urinario del hospital Aichi en Okazaki, Japón. Dos años más tarde, el mismo gen fue caracterizado de *S. marcescens* (AK9373) de un hospital en la ciudad de Anjyo, situado cerca de la ciudad de Okazaki. Este alelo de IMP-1, blaIMP-1 fue encontrado en integrones de clase 3 y fue albergado en un plásmido de 120 kb (4).

Un posterior estudio en siete hospitales generales en Japón en 1993 identificó cuatro cepas de *S. marcescens* que acarreaban el gen bla IMP-1. Una siguiente investigación japonesa que examinó 3700 aislamientos de *P.aeruginosa* colectadas entre 1992 y 1994 de 17 hospitales generales con genes bla IMP-1 encontró quince cepas en 5 hospitales de diferentes áreas geográficas que dieron positivo para bla IMP-1. Interesantemente, cuando los MICs de imipenem de los aislamientos de MBL positivos fueron examinados, ellos variaban de 2 mg/L a 128 mg/L, lo cual sugiere que la adquisición de una sola MBL no ubiqua, confiere resistencia. Sigüentes reportes japoneses denotan la aumentada dispersión de genes de MBL principalmente acarreadas en integrones clase 3 en 16 especies diferentes de bacterias gram negativo (41, 42, 43).

Durante un estudio de peritaje de aislamientos clínicos de *Shigella flexneri*, *S. marcescens*, *P.aeruginosa* y *Alcaligenes* spp. para detectar la presencia de MBLs, se identificaron tres variantes de IMP-1 en Japón, IMP-3, IMP-6 e IMP-10 (42). IMP-3 tiene dos cambios aminoacídicos en relación a IMP-1 y fue identificado en aislamientos de *S. flexneri*. Estudios genéticos y cinéticos determinaron la substitución de una glicina por una serina en la posición 196 causando una reducción de la actividad contra las penicilinas. Este cambio aminoacídico es observado en IMP-6, el cual muestra no solo una reducida actividad contra penicilina G y piperacilina sino también un mayor nivel de hidrólisis de meropenem comparado con imipenem; lo opuesto a IMP-1 (4, 44).

IMP-10 fue descubierto como resultado de un estudio de aislamientos de *P. aeruginosa* y *Alcaligenes* spp. productores de IMP colectados de 1995 al 2001 (45). La posición de un cambio aminoacídico encontrado tanto en IMP-3 e IMP-6 corresponde al mismo aminoácido (glicina) en otra metaloenzima innata como BCII, dejando la hipótesis que IMP-3 podría ser el progenitor de IMP-1 y no solo una variante de IMP-1. Se encontró que el gen blaIMP-10 estaba mediado por plásmidos en un aislamiento de *P. aeruginosa* y mediado cromosómicamente en un aislamiento de *P.aeruginosa* y uno de *Achromobacter xylosoxidans*. El gen bla IMP-10 difiere del blaIMP-1 por un simple cambio de bases responsable del cambio de fenilalanina por valina en la posición 49. Este cambio aminoacídico causa una reducción marcada de hidrólisis de penicilinas pero a

diferencia de los cambios en IMP-3 e IMP-6, no altera el perfil de hidrólisis a carbapenem (4).

Se han descrito dos variantes de IMP en Italia. IMP-12 fue producida por *P. putida* proveniente de un aislamiento clínico en Varesse en 2000. IMP-12 es altamente divergente de IMP-1, posee 36 diferencias aminoacídicas y tiene poca actividad contra penicilina (48). El gen bla IMP-13 fue clonado de un espécimen clínico de *P.aeruginosa* aislado en Roma y tenía 19 aminoácidos diferentes a IMP-1 y estaba codificado cromosomicamente. El alelo bla IMP-13 fue encontrado más tarde en un plásmido (M.A Toleran, resultados no publicados) y ha sido asociado con una epidemia de poca importancia en un hospital en el sur de Italia (4).

Las diferencias entre los IMPs de Europa y los del Sureste de Asia no pueden ser asociados con la diseminación global de los alelos de IMP provenientes de Japón. Parece ser que estos alelos representan una emergencia local. Sin embargo, IMP-1 ha sido encontrado recientemente en Inglaterra en aislamientos de *A. junii* y *A. baumannii*. El aislamiento de *A. junii* con blaIMP-1 presentó una secuencia aminoacídica idéntica, sin embargo la secuencia nucleotídica mostró múltiples cambios silentes. La cepa de *A. baumannii* fue aislada de una mujer que recientemente estuvo en España y hospitalizada allí por 4 semanas siendo transferida a Gran Bretaña, el origen de este aislamiento resistente y sus detalles genéticos no ha sido totalmente descrito aún (4).

Estudios retrospectivos acerca de aislamientos que presentaban resistencia colectados en 1994 en Hong Kong y en 1995 en Canadá determinaron que la resistencia a carbapenem se debía a IMP-7 (*P.aeruginosa*) en Canadá e IMP-4 (*Acinetobacter* spp.) en Hong Kong (4, 49). El gen bla IMP-4 se encontró en 66% de las cepas resistentes a Imipenem colectadas entre 1994 y 1998 en el Hospital Prince of Wales en Hong Kong. IMP-4 presentó 10 aminoácidos diferentes a IMP-1 y 37 aminoácidos diferentes a IMP-2. blaIMP-4 estaba albergado en un plásmido y codificado en un integron con otros genes de resistencia. En 1997 y 1998 se encontraron cepas de *Acinetobacter* spp. con IMP-4 con una prevalencia del 14% de todos los aislamientos de *Acinetobacter* spp. blaIMP-4 se encontró más tarde (1998 y 2000) en *Citrobacter youngae* y *P. aeruginosa* en Guangzhou, China. Guangzhou es una región cercana a Hong Kong, esto sugiere una diseminación local del alelo IMP. IMP-4 se ha encontrado además en Australia en *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *P.aeruginosa*, posiblemente importada del sureste de Asia (4).

La metaloenzima IMP-7 fue responsable de un brote de *P.aeruginosa* en Canadá en dos hospitales (4). Se encontró más adelante un gen de IMP-7 idéntico en 1999 en un aislamiento de *P.aeruginosa* resistente en Malasia (50).

Otras investigaciones sobre aislamientos positivos para metaloenzimas en Japón revelaron que hay poca evidencia de propagación de estos alelos de resistencia desde Japón. En Taiwan, IMP-8 se encontró en solo una institución el Hospital Cheung Kung. Aquí, el cassette genético bla IMP-8 se encontró en un integrón clase 1 en un espécimen de *K. pneumoniae* aislada en 1998 (51). IMP-8 es más similar a IMP-2 (dos aminoácidos diferentes) que a IMP-1, lo que sugiere que no hay un lazo con los aislamientos japoneses productores de IMP-1. Además, en estudios de hibridación empleando una sonda de bla IMP-8 se encontró genes tipo bla IMP-8 en 28.5% de cepas las resistentes a ceftazidima de *K. pneumoniae* aisladas de 1999 al 2000, aunque solo el 12.5% de éstas fueron resistentes a carbapenem. El gen blaIMP-8 se uso también para examinar 9,082 aislamientos entéricos, 36 de 1261 aislamientos de *Enterobacter cloacae* fueron positivos. Recientemente IMP-1 y otras MBLs fueron reportadas de Singapur y Corea. *K. pneumoniae* productora de IMP-1 fue reportada en Hospital en Singapur en 2001 (4).

La única información en la literatura de metaloenzimas tipo IMP en América ha venido principalmente de Brasil, donde es un serio problema con aislamientos de *Acinetobacter spp.* multirresistente a antibióticos. La secuenciación de productos amplificados por PCR con primers específicos para IMP ha dado una identidad del 100% con bla IMP-6. Sin embargo, los productos de PCR representan solo una secuencia parcial del gen. Estudios recientes de aislamientos colectados a través del programa de vigilancia antimicrobiano a nivel mundial SENTRY han identificado 5 aislamientos en Brasil conteniendo IMP-1 y un nuevo alelo divergente de IMP, bla IMP-16. La más reciente metaloenzima tipo IMP (IMP-18) ha sido encontrada en *P. aeruginosa* proveniente de Las Cruces, Nuevo Mexico (4).

b. Metaloenzimas tipo VIM

El segundo grupo predominante de las MBLs adquiridas es las enzimas tipo VIM. VIM-1 fue descrita primero en Verona, Italia de un aislamiento de *P. aeruginosa*. Este aislamiento clínico, fue obtenido en 1997, presentando un resistencia a varios beta lactámicos, incluyendo piperacilina, ceftazidima, imipenem y aztreonam. En particular, el MIC de imipenem fue >128 ug/ml. El análisis bioquímico realizado de un extracto crudo

de un cultivo de esta cepa reveló una actividad hidrolizadora de carbapenem que fue inhibida por EDTA y la utilización de Zn^{2+} . Estas observaciones sugirieron la producción de una metaloenzima. Los genes de la beta lactamasa fueron clonados, y la secuencia aminoacídica revelaron una pre proteína de 266 aminoácidos con un pI de 5.3. La VIM-1 (imipenemasa Veronesa) esta relacionada de manera distante a las otras metaloenzimas. Esta relacionada mas cercanamente a BCII de *B.cereus*, compartiendo solo 39% de aminoácidos. El perfil de hidrólisis de la VIM-1 analizada de una cepa de *E. coli* recombinante es típico de las enzimas clase B, hidrolizando a la mayoría de beta lactámicos excepto a Aztreonam. La resistencia al monobactam aztreonam, en el aislamiento original de *P. aeruginosa*, se cree que se debía a sus mecanismos de resistencia como bombas de expulsión o hiperproduccion de cefalosporinasas. Al igual que en los genes blaIMP, los genes blaVIM-1 estan integrados en un cassette genético dentro de integrones clase 1. Este integrón se encuentra un cassette genético aacA4 que codifica resistencia a aminoglucósidos (52).

Mas tarde, blaVIM-1 fue encontrado en *Achromobacter xylosoxidans* en el mismo hospital en Verona. Este aislamiento exhibió resistencia a todos los beta lactamicos, incluyendo carbapenemes y contenía un plásmido de 30 kb no conjugado dentro de un integron clase 1. Este integron, In70, contenía cuatro cassette genéticos y tres diferentes genes resistentes a aminoglucósidos (*aacA4*, *aphA15*, and *aadA1*) localizado corriene abajo del cassette genetico del blaVIM-1 (4).

Adicionalmente, VIM-1 fue detectado e tres aislamientos clonados de *P. putida* en Italia como fuente de infecciones nosocomiales. Estos aislamientos fueron recopilados en el mismo hospital en Varese, Italia. Los MICs de imipenem y meropenem fueron >32 ug/ml, mientras que para aztreonam fueron de 32 ug/ml. Estos aislamientos contenian un plásmido de 52 kb que codificaba a VIM-1 (53).

VIM-1 fue detectada también en *E. coli* y en muchos aislamientos de *K. pneumoniae* en Grecia. También se encontró recientemente un cepa de *K. pneumoniae* positiva para VIM-1 en Francia que fue asociado con la betalactamasa de espectro extendido SHV-5. En un estudio realizado por Scoulica et al, los MICs de imipenem y meropenem para los aislamientos clínicos de *E.coli* estuvieron bajo los puntos de corte propuestos por la definición de resistencia (4).

El gen blaVIM-2 fue identificado primero en el sur de Francia de un aislamiento proveniente de *P. aeruginosa* en un hemocultivo de un paciente neutropénico en 1996.

Este aislamiento mostró resistencia para la mayoría de beta lactámicos, incluyendo cefazidima, cefepime e imipenem y susceptible a aztreonam. VIM-2 está relacionado estrechamente a VIM-1 (90% de identidad aminoacídica) y se encuentra codificado por un cassette genético, en un integrón clase 1. El gen blaVIM-2 fue localizado en un plásmido no conjugativo de 45 kb. VIM-1 y VIM-2 tienen idénticos residuos aminoácidos que pueden estar cerca o en el sitio activo de estas enzimas. La heterogeneidad de las secuencias está observada mayormente en las regiones amino y carboxilo terminal de VIM-1 y VIM-2 (4).

En un estudio epidemiológico de tipo retrospectivo realizado en un hospital en Marsella, Francia, se encontró la primera *P. aeruginosa* productora de VIM-2, el estudio reveló que de 1995 a 1999, se aislaron 10 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para VIM-2. Estos aislamientos fueron identificados en pacientes hospitalizados en diferentes unidades. Estos presentaron patrones genotípicos indistinguibles, pero el integrón clase 1 que contenía el gen blaVIM-2 variaba en tamaño y estructura (4).

Similarmente, se encontraron aislamientos de *P. aeruginosa* productora de VIM-2 como fuente de brotes epidemiológicos en dos hospitales universitarios en Italia y Grecia durante el mismo periodo. Se reportaron también cepas de *P. aeruginosa* productora de VIM-2 en otros países como Japón, Corea del Sur, Portugal, España, Polonia, Croacia, Chile, Venezuela, Argentina, Bélgica y más recientemente en Estados Unidos. El brote en Estados Unidos envolvió a cuatro pacientes en una unidad de cuidados intensivos, la cepa encontrada de *P. aeruginosa* productora de VIM-2 fue sensible únicamente a aztreonam. Estos aislamientos fueron responsables de serias infecciones, tales como septicemia y neumonía en diferentes pacientes, además exhibían un alto nivel de resistencia a imipenem. Adicionalmente, VIM-2 ha sido detectado en *Citrobacter freundii* en Taiwan, en *S. marcescens* en Corea del Sur y en *Enterobacter cloacae* en Corea del Sur. En algunas cepas, los MICs de imipenem y meropenem fueron de 4 µg/ml (4).

Recientemente, VIM-2 y una nueva variante de la serie VIM, VIM-3, ha sido identificada en aislamientos de *P. aeruginosa* en Taiwan. La secuencia aminoacídica de VIM-3 difiere de VIM-2 por dos sustituciones de aminoácidos. El ambiente genético preciso de blaVIM-3 aún se desconoce, aún no se sabe incluso si su localización es cromosómica (54).

VIM-4 fue reportada en aislamientos de *P. aeruginosa* en Larissa, Grecia. Esta cepa fue recuperada en el 2001 de un paciente que recibía imipenem. Esta cepa presentó

resistencia a todos los beta lactámicos pero aztreonam mostró actividad antibacteriana (MIC de 16 ug/ml). VIM-4 difiere de VIM-1 por un simple cambio de un aminoácido (Ser175Arg) que también difiere entre VIM-2 y VIM-3. Interesantemente, se identificó en Suecia un aislamiento de *P. aeruginosa* productora de VIM-4 resistente a carbapenem de un paciente que fue transferido de Grecia. Recientemente Luzzaro et al. identificó el mismo gen en *K. pneumoniae* y *E. cloacae* de un paciente hospitalizado en mayo del 2002 en Varese, Italia. Este paciente había recibido una terapia con carbapenem la cual contribuyó a la selección de productores de VIM. Los MICs de imipenem y meropenem en *K. pneumoniae* fueron de 2 y 0.5 ug/ml respectivamente, mientras que para *E. cloacae* fueron de 0.25 y 0.12 ug/ml respectivamente. Se demostró que bla VIM-4 estaba localizado en el mismo plásmido en ambos aislamientos, haciendo interesante ver que los niveles MIC varían significativamente entre dos aislamientos de enterobacterias aun cuando presentan el mismo mecanismo de resistencia (4).

VIM-5 difiere de VIM-1 en 5 aminoácidos. Este fue identificado en *K. pneumoniae* y en *P. aeruginosa* en Ankara, Turquía. El aislamiento de *P. aeruginosa* en el cual se identificó blaVIM-5 presentó resistencia a todos los beta lactámicos, incluyendo aztreonam. La beta lactamasa VIM-6 fue identificada en dos aislamientos de *P. putida* en Singapur. Estos fueron altamente resistentes a beta lactámicos, con MICs >32 ug/ml para imipenem y meropenem, >256 ug/ml para ceftazidima y 128 ug/ml para aztreonam. VIM-6 difiere de VIM-2 en dos aminoácidos (glutamina/arginina en la posición 59 y asparagina/serina en la posición 165) y de VIM-3 por solo un aminoácido (4).

El último tipo de beta lactamasas tipo VIM que fue totalmente caracterizado es VIM-7, la cual se obtuvo de un aislamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenem proveniente de Houston, Texas. Este comparte solo un 77% de identidad con VIM-1 y 74% con VIM-2, además constituye un tercer subgrupo entre las beta lactamasas tipo VIM. El gen blaVIM-7 fue localizado en un plásmido de 24 kb. Fue identificado de un aislamiento clínico que fue resistente a todos los beta lactámicos, incluyendo aztreonam y a todos los antibióticos disponibles excepto polimixina B (4).

Mientras muchos reportes indican que las beta lactamasas tipo VIM pueden identificarse en distintas áreas geográficas, muchos estudios han evaluado la proliferación de estas enzimas en cierta área. Aunque VIM-1 y VIM-2 han sido identificadas en muchas especies de enterobacterias, *P. aeruginosa* permanece como el reservorio más importante de estas enzimas. Lagotolla et al. (2002) evaluó la presencia de MBL

localizadas en genes en *P.aeruginosa* en el Hospital de la Universidad de Trieste en Italia y encontró que 20% de los aislamientos de *P.aeruginosa* y 70% de los aislamientos de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenem producían las enzimas VIM-1 y VIM-2. Ellos demostraron una diversidad entre los aislamientos positivos para VIM y mostraron heterogeneidad en la transmisión de resistencia (4).

De manera similar, se realizó un estudio retrospectivo en un hospital en Corea desde 1995. La resistencia a imipenem alcanzó un 16% de todos los aislamientos de *P.aeruginosa*, y 9% de los aislamientos resistentes produjeron beta lactamasas tipo VIM-2. Estos aislamientos estaban mayormente relacionados y su resistencia a carbapenem se transmitía por conjugación. Los autores notaron que el rango de MIC de beta lactámicos para estos aislamientos productores de VIM-2 fue amplio. Por ejemplo, los MICs para aztreonam, imipenem y meropenem todos variaban de 8 a 128 ug/ml y aquellos para ceftazidima eran de 32 a 128 ug/ml. Por lo tanto la identificación de VIM solo en la base de la susceptibilidad a beta lactámicos permanece incierta (4).

En otro estudio realizado en Grecia en el cual los aislamientos recuperados de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenem de pacientes durante un año en el Hospital de la Universidad de Thessaly, Larissa, se estudió la producción de MBL. Los genes blaVIM fueron detectados en 47 de 53 (88.7%) de los aislamientos resistentes a carbapenem de *P. aeruginosa* que correspondían a siete genotipos. Cuatro genotipos poseían blaVIM-2 y tres poseían blaVIM-4. Ellos estaban dentro de cassette genéticos simples o junto con un gen de resistencia a aminoglucosidos (*aacA29a*) en integrones clase 1. En Francia, se han reportado recientemente cepas productoras de VIM en *P. aeruginosa*. Se realizó un estudio en Norte América en el periodo de 1999 al 2002, se utilizaron 1,111 cepas de *P.aeruginosa* y 236 de *A. baumannii* de 23 centros médicos y se encontró únicamente un aislamiento positivo para VIM. Este fue VIM-7, sin embargo su secuencia es muy diferente al de los otros VIMs y probablemente este proviene de un diferente origen ancestral (4).

Se han encontrado varias secuencias de nuevos genes blaVIM que han sido ingresados en la base de datos del EMBL pero no han sido formalmente publicados. El primero de estos es blaVIM-8 el cual fue aislado de *P. aeruginosa* en Colombia, adicionándose al creciente número de genes bla VIM descubiertos en Sur América. Otros dos, blaVIM-9 y bla VIM-10 provenientes del Reino Unido, que difieren en dos

aminoácidos. Hasta el presente, se encontraron blaVIM-11 aislados de *P. aeruginosa* en Argentina e Italia. Este es la segunda metaloenzima encontrada en Argentina (4).

c. Metaloenzima tipo SPM-1

Esta metaloenzima fue encontrada en 1997 en Sao Paulo, Brasil en un aislamiento proveniente de *P. aeruginosa*. La cepa, 48-1997A, provenía de un aislamiento de una niña de 4 años que padecía de leucemia que eventualmente sucumbió a la septicemia. Este aislamiento mostró el nuevo gen bla SPM-1 (Sao Paulo MBL) con una alta resistencia a antibióticos estándares para gram negativo excepto para colistina (55).

Cuando se comparó la secuencia de SPM-1 con las otras MBLs, se encontró mayor relación con IMP-1 (35.5%), que con ImiS (32.2%), CphA(32.1%), BCII (30.0%) y CcrA (27%). La secuencia de SPM-1 difiere significativamente de IMP y VIM, esto se debe a la presencia de una inserción de 24 aminoácidos después del sitio activo HFHLD. Esta inserción probablemente aumenta la hidrólisis de beta lactámicos. Los sustratos preferidos de SPM-1 son penicilinas (penicilina, ampicilina, piperacilina, carbencilina, azlocilina y cefalotina). Al igual que IMP-1 y VIM-1, SPM-1 no hidroliza el ácido clavulánico o aztreonam (4).

d. Metaloenzima tipo GIM-1

En 2002, fueron recuperados cinco aislamientos de *P. aeruginosa* de diferentes pacientes del hospital Dusseldorf en Alemania, los cuales poseían una nueva betalactamasa de la clase B, esta fue designada como GIM-1 (German imipenemasa). Al igual que la mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* que poseen metaloenzimas, los cinco aislamientos fueron susceptibles solo a Polimixina B (56).

La secuencia aminoacídica de GIM-1 mostró mayor similitud con IMP, especialmente con las variantes IMP-6, IMP-1 e IMP-4 (43.5%, 43.1% y 43.1% respectivamente), y con las variantes de VIM, VIM-7 31.2%, con VIM-1, VIM-4 y VIM-5 28.8%, y con SPM-1 28.0%. GIM-1 posee un perfil hidrolítico similar al de IMP-1 pero es una enzima más débil, lo cual se observa en su valor menor de K_{cat} y mayor de K_m (56).

Al igual que la mayoría de los genes de otras MBL, blaGIM-1 se encuentra en integrones clase 1 que son transportados en plásmidos relativamente pequeños de 45 kb. Este integron también contiene otros tres genes de resistencia, los genes de resistencia a aminoglucósidos, *aacA4* y *aadA1*, y un gen de beta lactamasa *bla_{OXA-2}* (24).

e. Inhibidores experimentales de metaloenzimas

La introducción de amoxicilina clavulonato en 1980 fue una herramienta potente ya que combina un beta lactámico (ampicilina) y un inhibidor de beta lactamasas (ácido clavulánico). Las metaloenzimas presentan ciertos obstáculos que no permiten su inhibición. Primero las metaloenzimas poseen sutiles pero significantes variaciones en la arquitectura de su sitio activo, por lo tanto el diseño de un inhibidor eficaz contra incluso las MBLs transferibles es problemático. Segundo, a diferencia del ácido clavulánico, que interactúa directamente con las enzimas de clase A y forma un intermediario covalente estable, las MBLs no forman intermediarios de reacción. Además, dado su amplio espectro de actividad, intentar inhibir a las MBLs con derivados de beta lactámicos no presentará mucho éxito (4).

Se han examinado una variedad de compuestos de diferentes estructuras como inhibidores de MBL, incluyendo derivados de tioester, alcohol trifluorometil y cetonas, tioles, sulfonil hidrazonas, productos naturales triciclitos, derivados del ácido succínico, bifenil tetrazoles, péptidos cisteinil, mercaptocarboxilatos, cefotetan - β -metilcarbapenem, tioxocefalosporinas y derivados de penicilinas (4, 57).

Terapéuticamente, los beta lactámicos disponibles clínicamente (aztreonam) han sido sugeridos como inhibidores potenciales de MBLs debido a su inhibición competitiva. Sin embargo, este fenómeno parece estar restringido a pocos compuestos, además muchos de estos compuestos han sido usados unicamente en estudios con animales y su eficacia aún no se ha verificado substancialmente (4).

f. Detección de metaloenzimas

No existen métodos fenotípicos estandarizados disponibles para detectar metaloenzimas (MBL). La identificación de algunas beta lactamasas ha sido realizado por medio de identificación de su punto isoeléctrico (pI). Esta técnica se basa en la carga de la superficie de estas enzimas, la cual se neutralizará a un cierto pH. Sin embargo las MBLs, incluso las transferibles, difieren considerablemente una de otra, por lo tanto el punto isoeléctrico no es recomendado como una herramienta para identificarlas, aunque puede brindar información útil el uso de EDTA en combinación con el pI (4).

Dado el hecho de que todas las MBLs son afectadas al remover el zinc del sitio activo, muchos estudios se han basado en este principio y han usado una variedad de combinaciones de inhibidores de beta lactamicos para detectar cepas que posean estas

enzimas. Sin embargo el nivel de inhibición de las MBLs varía según ciertos compuestos y también varía en su habilidad de conferir resistencia a ceftazidima o imipenem, dos sustratos comúnmente usados para detectar MBLs. *Enterobacteriaceae* poseedoras de MBLs generalmente poseen susceptibilidad o susceptibilidad intermedia y pueden pasarse por alto cuando se usa imipenem o meropenem en el método de detección (4).

Para laboratorios clínicos se sugiere lo siguiente: primero, observar aislamientos basados en sus MIC para ceftazidima y carbapenem. Por ejemplo, aislamientos de *P. aeruginosa* con MIC de imipenem de ≥ 16 ug/ml deben ser considerados como candidatos. Para *Acinetobacter spp* con MIC de imipenem de ≥ 8 ug/ml pueden ser apropiados. El método de doble disco sinérgico con EDTA e imipenem y el etest para MBL es recomendado. En el etest a una mitad de la cinta se le impregna con un gradiente de imipenem de siete diluciones y a la otra mitad con otro gradiente de imipenem al cual se le agrega concentraciones constantes de EDTA (58).

Sin embargo, la cinta no podrá detectar todas la MBL positivas para *Enterobacteriaceae* debido a su bajo nivel de resistencia y se necesitara además realizar un test con discos para algunos aislamientos de *Enterobacteriaceae*. Además, para incrementar la sensibilidad de esta técnica, se deben usar varios sustratos (imipenem, ceftazidima y meropenem) y preferiblemente más de un inhibidor (EDTA y ácido mercaptopropionico) (59). Este programa en algunas cepas de *P. aeruginosa* da falsos positivo debido a sus nivel alterados de OprD y no a la presencia de MBL (4).

Las técnicas genéticas usadas para detectar MBLs son similares a las usadas para caracterizar molecularmente otras beta lactamasas. PCR y sondas de ADN, estan basadas en que los aislamientos clínicos producen genes de MBL. Sin embargo, estos métodos son altamente especializados y están más allá de los laboratorios clínicos (4).

IV. JUSTIFICACION

En los últimos años se ha observado un importante incremento de las infecciones nosocomiales por *Acinetobacter* spp., siendo éstas responsables de infecciones graves como sepsis, meningitis, del tracto respiratorio y urinario, entre otras. Las unidades más afectadas son las de cuidados intensivos y quemados, donde el uso masivo de antibióticos puede seleccionar la aparición de cepas multirresistentes. Desde el descubrimiento del mecanismo de resistencia por metaloenzimas en los años noventa, se ha incrementado gradualmente el apareamiento de nuevas cepas multirresistentes a carbapenemes con metaloenzimas en infecciones nosocomiales a nivel mundial. Se debe dar a conocer en qué salas del hospital y en qué tipo de muestras se encuentran mayormente aislamientos de *Acinetobacter* spp. con este tipo de resistencia y de esta manera informar a las autoridades de salud pública para que tomen medidas contra posibles epidemias.

Debido a esto, el estudio y control de este microorganismo es necesario, ya que los carbapenemes son utilizados como último recurso en el tratamiento de infecciones serias (18).

Es importante enfatizar que en Guatemala no se ha realizado ningún estudio concerniente a este tipo de resistencia, ni se realizan estudios de caracterización de los genes que confieren tal mecanismo, además se desconoce la importancia que esto representa. Una identificación rápida puede reducir significativamente costos asociados con tratamiento, contención y descontaminación. Por esta razón se realizará el primer estudio de determinación y tipificación de metaloenzimas en *Acinetobacter* spp. en el Hospital General San Juan de Dios.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar la presencia de metaloenzimas en aislamientos de *Acinetobacter* spp. en el Hospital General San Juan de Dios.

2. Objetivos Específicos

- a. Determinar la producción de metaloenzimas en aislamientos de *Acinetobacter* spp. por medio del método de doble disco sinérgico Imipenem-EDTA.
- b. Determinar el tipo de muestra que presenta mayor porcentaje de aislamientos de *Acinetobacter* spp. productores de metaloenzimas.
- c. Determinar el porcentaje de metaloenzimas en aislamientos de *Acinetobacter* spp. en los distintos servicios del Hospital General San Juan de Dios.
- d. Identificar a que antibióticos presentan resistencia los aislamientos de *Acinetobacter* spp. productores de metaloenzimas.

VI. HIPÓTESIS

Este estudio no presenta hipótesis por ser de tipo descriptivo.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo del trabajo

Aislamientos de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenemes en pacientes del Hospital General San Juan de Dios.

1. Muestra

Se recolectaron 106 aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenemes, obtenidos de pacientes del Hospital General San Juan de Dios durante febrero a mayo del año 2008.

B. Recursos

1. Humanos

Br. Claudia Marisol Marroquín López (tesista).

Lic. Jorge Matheu (asesor).

Lic. Carlos Pérez (asesor).

2. Institucionales

Hospital General San Juan de Dios, Laboratorio de Microbiología.

Laboratorio Nacional de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

3. Materiales

a. Equipo

- Refrigeradora
- Autoclave
- Mechero
- Incubadora
- Campana de flujo laminar

- Fotómetro
- Gradillas
- Pinzas de metal
- Agitador vortex
- Pipetas ajustables P1000 , P200, P20

b. Materiales

- 5 asas bacteriológicas
- 200 cajas de petri
- 100 tubos con tapón de rosca con capacidad de 10 ml
- 200 hisopos estériles
- Puntas de pipetas amarillas y azules estériles
- Tubos de 1.5 ml estériles
- Servilletas de papel
- Guantes
- Parafilm
- Tubos eppendorf estériles 1.5 ml

c. Reactivos

- Caldo tripticasa-soya
- Solución salina 0.85%
- Glicerol
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Sangre
- Estándar 0.5 de McFarland
- 200 discos de Imipenem
- 200 discos en blanco
- Solución de EDTA 0.5 M
- Solución de Hidroxido de Sodio 1 M
- Cultivos de *Acinetobacter* spp.
- Agua destilada estéril

d. Métodos:**d.1 Aislamientos bacterianos**

Se recolectaron 106 aislamientos clínicos resistentes a carbapenem de *Acinetobacter* spp. Su identificación y susceptibilidad se realizó por medio del sistema automatizado Microscan[®]. Se conservaron en caldo tripticasa soya con 15% de glicerol a -4°C. Los aislamientos fueron subcultivados dos veces en agar sangre de carnero para asegurar su viabilidad y pureza.

d.2 Preparación de discos con EDTA 0.5 M

Se realizó una solución de EDTA 0.5 M disolviendo 1.86 g de EDTA.2H₂O disódico en 100 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 8.0 usando NaOH. La mezcla se esterilizó por autoclave. Se impregnaron discos en blanco con 10 µl de la solución de EDTA 0.5 M, estos se dejaron secar inmediatamente a temperatura ambiente, luego se almacenaron a -4°C en viales sin disecante.

d.3 Determinación de metaloenzimas en aislamientos resistentes a imipenem por el método de doble disco sinérgico.

1. Se realizó una suspensión en solución salina al 0.5 del estándar de MacFarland de los aislamientos de *Acinetobacter* spp.
2. Dentro de los 15 minutos después de realizar la suspensión se tomó un hisopo estéril y se introdujo dentro de ésta, se rotó el hisopo contra las paredes del tubo. Se sembró con él, en tres direcciones diferentes en placas de Mueller-Hinton.
3. Se dejó absorber por 3 a 5 minutos.
4. Se colocaron un disco de Imipenem y un disco en blanco impregnado con EDTA 0.5 M sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia de 20 mm (centro a centro) Anexo 4.
5. Se incubaron las placas invertidas a 35⁰C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron colocados.
6. Después de 18 horas de incubación se examinó cada placa y se observó cualquier deformación del halo entre ambos discos (Imipenem y EDTA) debido a la inhibición de la metaloenzima por el EDTA y la consiguiente acción del carbapemen (sinergia).

e. Diseño de la investigación:

1. Tipo de estudio: Observacional descriptivo de tipo transversal.
2. Tamaño de muestra: Se analizaron 106 aislamientos de *Acinetobacter* spp. recolectados durante febrero a mayo del 2008, el tamaño de la muestra fue determinado por conveniencia, debido a la cantidad de recursos disponibles.
3. Variables de interés: Halos de inhibición del antibiótico Imipenem de cada aislamiento que se analizó y sinergia de imipenem con EDTA.
4. Análisis de resultados: Se llevó a cabo un análisis de frecuencia para la descripción de los aislamientos; a través del programa computarizado WHONet 5.4 (programa estadístico para estudiar la resistencia bacteriana) se presentó el análisis de susceptibilidad antibiótica.

VIII. RESULTADOS

De los 106 aislamientos de *Acinetobacter* spp, el 26% (28 aislamientos) presentaron MBL, y, de ellos, la única especie identificada fue *A. baumannii* (Tabla 1).

Tabla 1. Aislamientos clínicos con MBL en *Acinetobacter*, (N=106, n=28).

Total (resistentes a carbapenemes)	Aislamientos	
	Sin MBL	Con MBL
106 (100%)	78 (74%)	28 (26%)

Fuente: Datos Experimentales

Con respecto a la procedencia de las muestras, del total de los 28 aislamientos de *Acinetobacter baumannii* que presentaron MBL, 17 correspondieron a muestras de secreciones varias (60.7 %), 6 a muestras obtenidas de catéter (21.4 %) y 3 a orina (10.7%). El resto fueron aislados de otro tipo de muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Aislamientos de *Acinetobacter baumannii* productores de MBL por tipo de muestra, (N=106, n=28).

Muestra	Aislamientos sin MBL	Aislamientos con MBL	
		No.	%
Secreciones varias	67	17	60.7
Catéter	15	6	21.4
Orina	13	3	10.7
Hemocultivos	4	1	3.6
Líquido cefalorraquídeo	2	1	3.6
Otros	7	0	0
Total	106	28	100

Fuente: Datos Experimentales

Referente a la sala hospitalaria de donde provenían las muestras, se observó que de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con MBL, 11 provenían de la Unidad de Cuidados Intensivos (39.3%), 3 a la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología (10.7%) y 3 a la Unidad de Terapia Intermedia de Pediatría (10.7%). El resto provenían de otro tipo de sala (Tabla 3).

Tabla 3. Aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con MBL por sala, (N=106, n=28).

Sala	Aislamientos sin MBL		Aislamientos con MBL	
	No.	%	No.	%
Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos	27	39.3	11	39.3
Otras salas ¹	25	17.9	5	17.9
Unidad de Cuidados Coronarios	14	7.1	2	7.1
Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología	15	10.7	3	10.7
Unidad de Terapia Intermedia de Pediatría	9	10.7	3	10.7
Emergencia Pediatría	8	7.1	2	7.1
Cirugía de Hombres III	5	7.1	2	7.1
Cirugía de Mujeres IV	3	0	0	0
Cirugía Pediatría I	2	0	0	0
Total	106	100	28	100

Fuente: Datos Experimentales

¹Incluye las salas: Emergencia cirugía de pediatría, Neurocirugía de Adultos, Neurocirugía de pediatría, Medicina de Mujeres XIII, Unidad de Cardiología y Unidad de Cuidados post-anestesia.

Además se indica que los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con MBL presentaron un patrón de resistencia a un alto número de antibióticos, mostrando un 100% de resistencia a Cefoxitina, Ticarcilina/ácido clavulánico, Meropenem y a Amoxicilina/ácido clavulánico. 96.4% a Trimetroprim/sulfametoxazol y 92.9% a Cefuroxima sódica. Además se observó un 34.3% de resistencia a Aztreonam (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de Resistencia de *Acinetobacter baumannii* productores de MBL a los distintos antibióticos analizados, (N=106, n=28).

Antibiótico	Resistencia (%)
<i>Aminoglucósidos</i>	
Amicacina	53.6
Tobramicina	50
Gentamicina	42.9
<i>Cefalosporinas</i>	
Ceftazidima	25
Cefepima	39.3
<i>Otros betalactámicos</i>	
Ticarcilina/Ácido clavulánico	100
Piperacilina/Tazobactam	46.6
Meropenem	100
Amoxicilina/Ácido clavulánico	100
Ampicilina/Sulbactam	21.4
Aztreonam	34.3
<i>Quinolonas</i>	
Ciprofloxacina	50
Levofloxacina	46.4
<i>Sulfonamidas</i>	
Trimetoprim/Sulfametoxazol	96.4

Fuente: Datos experimentales

Los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con MBL procedentes de muestras de secreciones presentaron 76.5% de susceptibilidad a Ceftazidima, 70.6% a Gentamicina y 64.7% a Levofloxacina. Las muestras obtenidas de catéter mostraron 33.3% de susceptibilidad a Cefepima, Gentamicina y Piperacilina/Tazobactam. En orina se encontró un 66.7% de susceptibilidad a Ceftazidima, Ciprofloxacina, Gentamicina, Levofloxacina y Tobramicina (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de Sensibilidad de *Acinetobacter baumannii* productores de MBL por muestras provenientes de secreciones, catéter y orina, (N=106, n=28).

Antibiótico	Tipo de muestra		
	Secreciones (% S)	Catéter (% S)	Orina (% S)
Amicacina	52.9	16.7	33.3
Amoxicilina/ Ácido clavulánico	0	0	0
Ampicilina/Sulbactam	58.8	16.7	0
Aztreonam	5.9	0	0
Cefepima	47.1	33.3	0
Cefotaxima	29.4	16.7	33.3
Cefoxitina	0	0	0
Ceftzidima	76.5	16.7	66.7
Cefuroxima sódica	0	0	0
Ciprofloxacina	58.8	16.7	66.7
Gentamicina	70.6	33.3	66.7
Levofloxacina	64.7	16.7	66.7
Meropenem	0	0	0
Piperacilina/Tazobactam	58.8	33.3	33.3
Ticarcilina/Ácido clavulánico	0	0	0
Tobramicina	64.7	16.7	66.7
Trimetoprim/Sulfametoxazol	5.9	0	0

% S = Porcentaje de Sensibilidad

Fuente: Datos experimentales.

IX. DISCUSIÓN

Las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* forman parte del ecosistema hospitalario, lo cual, unido a su gran capacidad de supervivencia y multirresistencia, justifica la necesidad de estudios encaminados al conocimiento de su epidemiología para su control. En años recientes, el número de infecciones nosocomiales causadas por *Acinetobacter* spp. se ha incrementado significativamente (6). Estas bacterias son patógenos oportunistas importantes, y de éstas, *Acinetobacter baumannii* es la especie predominante en los especímenes clínicos (49).

El hecho que *A. baumannii* fuera la única especie de *Acinetobacter* identificada, con resistencia a carbapenemes y presencia de MBL, concuerda con otros estudios realizados, en donde se demostró que ésta es la especie del género que mayor resistencia presenta a nivel mundial, convirtiéndose en un patógeno intrahospitalario importante, ya que además de otros mecanismos, las MBL le confieren resistencia contra los antibióticos utilizados como última opción terapéutica (6, 49). Aún no se han encontrado MBL presentes en *A. Iwoffii* (1). Es importante notar que el alto número de aislamientos de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenemes sin presencia de MBL detectados en este estudio, sugiere la alta diseminación de aislamientos con otros mecanismos de resistencia hacia los carbapenemes.

El porcentaje de aislamientos con MBL encontrados en este estudio (26%), concuerda con otros estudios realizados, entre ellos, lo reportado en Polonia en 2005 donde se encontró un 3.1% de aislamientos con MBL (35). En este estudio, se mencionó que anteriormente en Polonia (1996), no se demostró la presencia de MBL, solamente resistencia a carbapenemes (11.6% a Imipenem). Ambos estudios fueron realizados en los mismos hospitales, lo que sugiere que la resistencia a carbapenemes en poblaciones nosocomiales de *Acinetobacter* spp. se ha incrementado en Polonia en los años recientes.

En un estudio realizado en 2006 en Corea, se encontró un 26.5% de aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. con presencia de MBL, reportando un nuevo gen causante de MBL (SIM-1). Aparte de VIM-2, es el tipo más prevalente en Corea que ha sido también detectado en la familia *Enterobacteriaceae* incluyendo *K. pneumoniae* (36). Estos dos estudios nos señala no solo aumento en prevalencia sino también en diversidad de MBL (35, 36).

El que se haya encontrado un alto número de aislamientos con MBL en secreciones varias, se debe a que en este tipo de muestra se agrupan todo tipo de secreciones obtenidas de distintas partes del cuerpo, lo cual, lamentablemente no permite diferenciar una muestra en especial. Sin embargo, evidencia lo sostenido en otros estudios, donde se ha encontrado que *Acinetobacter* spp. es un patógeno oportunista cuya infección puede involucrar virtualmente cualquier parte del cuerpo, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, aunque se ha asociado principalmente en secreciones por quemaduras y pacientes con ventilación mecánica (49).

En muestras provenientes de catéteres, la causa de la presencia de aislamientos productores de MBL, puede deberse al alto porcentaje de humedad que existe en los lugares donde son introducidos, a las malas prácticas de higiene del personal al colocar o monitorear el dispositivo, además de la inmunosupresión del paciente. La presencia de estos microorganismos en muestras de catéteres fue mayor en la Unidad de Cuidados Intensivos, lo cual se relaciona con otros estudios como el realizado en Corea en el año 2004, donde el 82% de aislamientos productores de MBL fueron obtenidos de esputo y orina (36). En otra investigación realizada en Corea en el año 2005 la mayor cantidad de microorganismos con MBL fueron también de esputo y orina de pacientes con infecciones del tracto urinario y neumonía. Esto también es similar a otro estudio realizado en Brasil en un hospital pediátrico y otro realizado en Polonia en varios hospitales de ese país (23, 35, 46).

El conocer el origen de la muestra que posee mayor cantidad de microorganismos con presencia de MBL en el Hospital San Juan de Dios, permite saber que las infecciones provenientes de secreciones, catéter y del tracto urinario deben ser tratadas cuidadosamente para evitar la inducción de este mecanismo llevando un monitoreo constante del tratamiento de estos pacientes y evitar así posible brotes.

El hecho que la mayoría de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con MBL se hayan encontrado tanto en las unidades de Cuidados Intensivos de Adultos, Neonatología y en la de Terapia Intermedia de Pediatría puede deberse a que los pacientes atendidos en estas salas se encuentran inmunocomprometidos, cateterizados, con ventilación mecánica, con pérdida de la conciencia y sometidos a tratamientos con una variedad de antibióticos. Todos estos factores colocan a estos pacientes en un alto riesgo de contraer infecciones con *Acinetobacter baumannii* que poseen este tipo de mecanismo de resistencia.

Otros factores que favorecen la propagación de este microorganismo en estas unidades, es que *Acinetobacter baumannii* se encuentra frecuentemente en los sistemas de agua y sobre superficies húmedas dentro del ambiente hospitalario. Además estos pacientes son manipulados constantemente por el personal de salud y si estos no siguen buenas prácticas de higiene, pueden facilitar la diseminación de este microorganismo de un paciente a otro.

El encontrar la mayoría de los aislamientos con presencia de MBL en la Unidad de Cuidados Intensivos tanto de Adultos como de Pediatría concuerda con otros estudios (6, 36). Sin embargo, también se han reportado aislamientos con este mecanismo de resistencia en unidades de Emergencia, Medicina y Consulta Externa. Es importante observar que los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con MBL provenían de pacientes internos, lo que indica que aparentemente la adquisición de este tipo de microorganismos fue de origen nosocomial y no comunitario.

Al observar los perfiles de resistencia que presentan los aislamientos con MBL se aprecia multiresistencia, ya que más del 90% de ellas fue resistente a las penicilinas, Ticarcilina con ácido clavulánico y Amoxicilina con ácido clavulánico, a Meropenem (otro miembro de los carbapenemes), a Trimetoprim sulfametoxazole y en menor porcentaje a las cefalosporinas (cefazidima y cefepima). Esto concuerda con lo esperado, ya que en otras investigaciones se ha descrito que las metaloenzimas tienen un amplio espectro de actividad, incluyendo la hidrólisis de penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes y su acción no puede ser contrarrestada por inhibidores de beta lactamasas tipo serina (27, 34-37, 45-49, 52, 62).

El comportamiento observado en la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas (42 a 53%) concuerda con lo encontrado en otros estudios en donde se señala que las MBL pueden conferir resistencia también a aminoglucósidos y fluroquinolonas en especies de *Acinetobacter* (35, 49).

El grado de resistencia parece depender del tipo de MBL (identificada por métodos moleculares), puesto que en una investigación realizada en Corea (en el año 2005) se encontró que la presencia de la MBL SIM-1 confirió resistencia a ciprofloxacina, pero menor resistencia o resistencia intermedia a otros antimicrobianos como cefalosporinas de tercera y cuarta generación, ampicilina/sulbactam y aminoglucósidos, a diferencia de las MBL tipo IMP y VIM que presentan mayor espectro de resistencia (23, 46).

El hecho que aztreonam haya presentado un porcentaje del 34.3% contrasta con la mayoría de otros estudios realizados, ya que en estos señala que aún las MBL no pueden hidrolizar este monobactam (23,27,36,37,42,49). Esto puede deberse a que *Acinetobacter* spp. presenta otro tipo de mecanismos que pueden causar la resistencia a aztreonam, entre los más importantes están la betalactamasas de espectro extendido y las de tipo AmpC (61).

Es importante tomar en cuenta que las muestras provenientes de catéter con presencia de metaloenzimas son las que presentan menor porcentaje de sensibilidad, esto nos indica que el tratamiento para este tipo de infecciones esta limitado y por lo tanto se debe vigilar cautelosamente. Las muestras de orina con MBL son las que más porcentaje de sensibilidad presentan de los tres tipos de muestras en donde se encontró con mayor frecuencia este mecanismo de resistencia. Esto puede deberse a que generalmente la infecciones del tracto urinario son provocadas por un solo tipo de microorganismo, raramente son de origen polimicrobiano, lo cual limita la transferencia de mecanismos de resistencia de un microorganismo a otro provocando multiresistencia (49).

El método de doble disco sinérgico utilizado en este estudio, ha sido reportado como un método fenotípico simple de realizar, barato y altamente sensible, además de poseer una buena especificidad para especies de *Acinetobacter* (14,60). Existen métodos que emplean otros agentes inhibidores como compuestos a base de tiol, 2-ácido mercaptopropionico y ácido mercaptoacético, pero estos compuestos son muy volátiles mientras que la soluciones de EDTA son más estables. Se ha demostrado en varios estudios, que los discos impregnados con EDTA pueden almacenarse a -20°C sin desecante hasta por 16 semanas sin perder su actividad (14, 42, 60, 61).

Por esto es recomendable utilizar esta metodología para la determinación fenotípica de MBL, ya que puede implementarse fácilmente en laboratorios clínicos e introducirse en la rutina de los mismos.

Además de determinar la presencia de MBL, el presente trabajo tuvo como propósito servir de precedente para futuras investigaciones, y por ello, se señala que la detección de metaloenzimas producidas no solo por *Acinetobacter* spp. sino también en otros bacilos Gram negativo, es crucial para el tratamiento óptimo de los pacientes con este tipo de infecciones, así como para el control de la diseminación de esta clase de resistencia a antimicrobianos. Por lo tanto, los laboratorios clínicos deben ponerse en

alerta y detectar estos microorganismos, ya que su pronta detección es crítica para prevenir la diseminación de este mecanismo de resistencia tan preocupante. Además se debe racionalizar el uso de carbapenemes para minimizar la selección de este tipo de beta lactamasa.

Debido a que no existen preparaciones comerciales disponibles para la metodología de doble disco sinérgico, ni tampoco hay una guía aún por parte del Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI), se necesita realizar más estudios encaminados a estandarizar los procedimientos e interpretación de éstos ensayos lo cual es crucial para garantizar la reproducibilidad tanto intra como inter laboratorios.

X. CONCLUSIONES

1. Se encontró un 26% de aislamientos con mecanismo de resistencia debido a MBL en *Acinetobacter baumannii* en el Hospital General San Juan de Dios.
2. Las muestras que más presentaron MBL fueron las provenientes de secreciones varias con 60.7%, de catéter con 21.4% y orina con 10.7%.
3. Se encontró 39.3% de aislamientos con MBL en la Unidad de Cuidados Intensivos de adultos, 10.7% en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología y 10.7% en la Unidad de Terapia Intermedia de Pediatría.
4. Los aislamientos con MBL presentan resistencia a los antibióticos ticarcilina/ácido clavulánico, meropenem, amoxicilina/ácido clavulánico, tobramicina, ampicacina, ciprofloxacina y trimetoprim/sulfametoxazol.

XI. RECOMENDACIONES

1. Implementar la detección de MBL en el laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios, para utilizarla como una herramienta para controlar la multirresistencia a antibióticos debido a este mecanismo de resistencia, ya que esta metodología es barata y fácil de llevar a cabo.
2. Realizar más estudios para determinar la producción de MBL en aislamientos de *Acinetobacter* spp. en otros hospitales del país y compararlo con la Capital, a manera de prevenir posibles brotes.
3. Implementar un programa por medio del cual se difunda y se instruya al personal de salud acerca de la importancia que tiene la resistencia causada por metaloenzimas y poder prevenir la propagación de éstas.
4. Realizar investigaciones que determinen el tratamiento recibido por los pacientes y el tiempo de hospitalización previo al aislamiento de MBL, para evaluar si la adquisición de MBL producidas en *Acinetobacter* spp. se debía estrictamente al uso de carpámenes o solo estaba relacionado, así como para determinar si el mecanismo es de origen nosocomial o comunitario.
5. Hacer estudios de PCR para poder caracterizar el tipo de metaloenzima (VIM, IMP, SIM, GIM) y así poder determinar su procedencia.

XII. REFERENCIAS

1. Alexis P. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente: Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. Rev Chil Infect 2005; 22:298-320
2. Yan E. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla_{IMP-8} in a University Medical Center in Taiwan. J Clin Microbiol 2001; 14:205-209.
3. Livermore M. Microbiology b-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8:557-584.
4. Walsh A. Metallo- β -lactamases; the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18:306-325 .
5. Bergogne E., Towner J. Fast track communication: Emergence of carbapenem hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Clin Microbiol 1999; 15:2109-2110
6. Sena H., Caneho M., Martinez S. Estudio epidemiológico y efecto sobre la utilización de antimicrobianos en el género *Acinetobacter* en un Hospital Universitario. Rev Esp Quim 2004; 17:177-183.
7. Laboratorio Nacional de la Salud, Sección de Bacteriología. Manual y tablas NCCLS 2002. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2002. 65p.
8. Pinto M. Resistencia antimicrobiana en Chile hoy. Rev Chil Infectol 2002; 19:213-218.
9. Mandigan M., Martinko M., Parker J. Brock: Biología de los microorganismos. 10. ed. Madrid:Pearson Educación, 2004. 1721 p. (p.301-375).
10. Martínez M., Hernández P. Mecanismos de resistencia a las carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Chil Infect 2000; 12:1379-1382.
11. Lombardi G. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. J Clin Microbiol 2001; 15:300-303.
12. Walsh T. Evaluation of a new E test for detecting metallo-lactamases in routine clinical testing. J clin Microbiol 2002; 11:274-276.

13. Tenover F., Hindler I. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Estados Unidos: OPS, 2002. 115p. (p.16-20).
14. Yong D. *et al.* Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002; 40:3798-3801.
15. Bou G., Cervero G., Domínguez A. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. J Clin Microbiol 2000; 38:3299-3305.
16. Vila J., Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. Enf Inf Microbiol Clin 2002; 20:304-312.
17. Carbonnea A., Naasb T., Blanckaertc K. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum b-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. J Hosp Infect 2005; 60:14-8.
18. Nordmann P., Poirel L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002; 8:321-331.
19. Oh J., Lee S., Park J. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University Hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. J Microbiol Meth 2003; 54:1-8.
20. Afzal M., Woodford N., Livermore M. Characterization of OXA- 25, OXA- 26, and OXA- 27, molecular class D b-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Ant Ag Chem 2001; 45: 583-588.
21. Bush G., Jacoby A., Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. An Ag Chem 1995; 39:1211-1233.
22. Lee K. *et al.* VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. Emerg Infect Dis 2003; 9:868-871.
23. Murphy T., Simm A., Toleman M. Biochemical characterization of acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. Ant Ag Chem 2003; 47:582-587.

24. Rasmussen A., Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Ant Ag Chem* 1997; 41:223-232.
25. Galleni M., Lamotte J., Rossolini G. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Ant Ag Chem* 2001; 45:660-663.
26. Toleman M., Simm M., Murphy A. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Ant Chem* 2002; 50:673-679.
27. Felici A., Perilla M., Segatore B. Interaction of biapem with active-site serine and Metallo-beta-lactamases. *Ant Ag Chem* 1995; 39:1300-1305.
28. Bellais S., Poirel L., Leotard S. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Ant Ag Chem* 2000; 44:3028-3034.
29. Boschi L., Mercuri S., Riccio L. The *Legionella (Fluoribacter) gormanii* metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. *Ant Ag Chem* 2000; 44:1538-1543
30. Mammeri H., Bellais S., Nordmann P. Chromosome-encoded β -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (Formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Ant Ag Chem* 2002; 46:3561-3567
31. Rossolini G., Condemi M., Pantanella F. Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Ant Ag Chem* 2001; 45:837-844.
32. Poirel L., Lambert T., Turkoglu S. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Ant Ag Chem* 2001; 45:546-552
33. Poirel L., Naas T., Nicolas D. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Ant Ag Chem* 2000; 44:891-897.
34. Yan J., Hsueh R., Wu J. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Ant Ag Chem* 2001; 45:2224-2228.

35. Fiett J., Baraniak A., Mrowka A. Molecular epidemiology of acquired metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Ant Ag Chem* 2006; 50:880-886.
36. Yong D., Seon Y., Kyoung H. Increasing prevalence and diversity of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp, and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Ant Ag Chem* 2006; 50:1884-1886.
37. Iyobe S., Kusadokoro H., Ozay J. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase. *Ant Ag Chem* 2000; 44:2023-2027.
38. González R. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Med Chile* 2004; 132:619-626
39. Toleman A., *et al.* *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo-β-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Ant Ag Chem* 2004; 48:329-332.
40. Docquier D., *et al.* On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-β-lactamases. *J Ant Chem* 2003; 51:257-266
41. Shibata N., *et al.* PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin Microbiol* 2003; 41:5407-5413.
42. Lee K., *et al.* Evaluation of the Hodge test and the Imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating Metallo-beta-lactamases producing isolates for *Pseudomonas* spp y *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4623-4629.
43. Yomoda S., *et al.* Presence of *Pseudomonas putida* strains harboring plasmids bearing the metallo-β-lactamase gene *bla*_{IMP} in a hospital in Japan. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4246-4251.
44. Yano H., *et al.* Plasmid-encoded metallo-β-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Ant Ag Chem* 2001; 45:1343-1348
45. Iyobe S., *et al.* Detection of a variant metallo-β-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylooxidans* strain. *Ant Ag Chem* 2002; 46:2014-2016.
46. Lee K., Hwa J., Young D. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Ant Ag Chem* 2005; 49:4485-4491.
47. Riccio L., *et al.* Characterization of the metallo-β-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants

- carried by gene cassettes of different phylogeny. *Ant Ag Chem* 2002; 44:1229-1235.
48. Docquier D., *et al.* IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Ant Ag Chem* 2003; 47:1522-1528
 49. Chu W., *et al.* IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Ant Ag Chem* 2001; 45:710-714.
 50. Ho E., Subramaniam G., Palasubramaniam H. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia producing IMP-7 β -lactamase. *Ant Ag Chem* 2002; 46:3286-3287.
 51. Yan J., *et al.* Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{IMP-8} in a university medical center in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4433-4439.
 52. Lauretti L., *et al.* Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Ant Ag Chem* 1999; 43:1584-1590.
 53. Lombardi G., *et al.* Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4051-4055.
 54. Yan J., *et al.* Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Ant Ag Chem* 2001; 45:2224-2228.
 55. Gales C., *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J. Ant Chem* 2003; 52:699-702
 56. Castanheira M., *et al.* Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Ant Ag Chem* 2004; 48:4654-4661
 57. Arakawa Y., *et al.* Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38:40-43.
 58. Walsh R., *et al.* Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2755-2759.

59. Bou G., Oliver A., Martinez B. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Ant Ag Chem* 2000; 44:1556-1561.
60. Andrade S., Picao R., Campana E. Influence of disk preparation on detection of metallo-beta-lactamase producing isolates by the combined disk assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2058-2060.
61. Franklin C., Lidios L., Peleg A. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase producing gram negative bacilli in the clinical laboratory. *Ant Ag Chem* 2006; 44:3139-3144.
62. Gianpiero G., Di Guilmi A., Hall B. Structure based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Ant Ag Chem* 2005; 49:2778-2784.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Antibióticos y su mecanismo de acción

Mecanismo de acción	Clases de antibiótico	Subclases de antibiótico	Nombre genérico	
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	Penicilinas	Penicilinas	Penicilina	
		Aminopenicilinas	Amoxicilina Ampicilina	
		Ureidopenicilinas	Azlocilina Mezlocilina Piperacilina	
		Carboxipenicilinas	Carbenicilina Ticarcilina	
		Penicilinas estables frente a penicilinasas	Cloxacilina Dicloxacilina Meticilina Nafcilina Oxacilina Mecilinam	
		Amidinopenicilinas	Mecilinam	
		Cefalosporinas (parenteral)	Cefalosporinas de primera generación	Cefazolina Cefalotina Cefapirina Cefradina
			Cefalosporinas de segunda generación	Cefamandol Cefonicida Cefuroxime (sodico)
			Cefalosporinas de tercera generación	Cefoperazona Cefotaxime Ceftazidima Ceftizoxime Ceftriaxona
			Cefalosporinas de cuarta generación	Cefepime
	Cefamicinas		Cefmetazol Cefotetan Cefoxitin	
	Cefalosporinas (oral)	Oxacefalosporinas	Moxalactam	
			Cefaclor	
		Cefalosporinas	Cefadroxil Cefdinir Cefditoren Cefetamet Cefixime Cefpodoxime Cefprozil Ceftibuten Cefuroxime (axetilico)	
			Cefalexina Cefradina	
			Carbacefalosporinas	Loracarbef

Fuente: Manual y tablas NCCLS 2002. Laboratorio Nacional de la Salud. Unidad de Diagnóstico, Sección de Bacteriología. MSPAS, OMS. Guatemala, Agosto 2002

Mecanismo de acción	Clases de antibiótico	Subclases de antibiótico	Nombre genérico
	Carbapenemes		Ertapenem Imipenem Meropenem
	Monobactames		Aztreonam
Alteración de la membrana celular	Polimixinas		Polimixina B
Inhibición de la síntesis proteica	Nitroaromáticos	Fenicoles	Cloranfenicol
	Aminoglicósidos		Amikacina Gentamicina Kanamicina Netilmicina Estreptomina Tobramicina
	Tetraciclinas		Tetraciclina Minociclina Doxiciclina Clortetraciclina
	Macrólidos		Eritromicina Azitromicina Claritromicina Diritromicina
	Lincomicinas		Lincomicina Clindamicina
Alteración de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas	Quinolonas	Cinoxacina Garenoxacina Ácido nalidíxico
		Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Clinafloxacina Enoxacina Fleroxacina Gatifloxacina Gemifloxacina Grepafloxacina Levofloxacina Lomefloxacina Moxifloxacina Norfloxacina Ofloxacina Esparfloxacina Trovafoxacina
	Rifamicinas		Rifampicina
	Sulfonamidas		Sulfonamida

Fuente: Manual y tablas NCCLS 2002. Laboratorio Nacional de la Salud. Unidad de Diagnóstico, Sección de Bacteriología. MSPAS, OMS. Guatemala, Agosto 2002.

Anexo 2. Mecanismos relevantes de resistencia a antimicrobianos en *Acinetobacter* spp.

Mecanismos de resistencia	Clase molecular	Descripción Enzima	Sustratos preferentes	Comentarios
Beta lactamasas	Clase A de Ambler	<i>De espectro ampliado</i> : TEM-1, TEM-2. De espectro extendido (BLEE): PER-1, VEB-1.	Penicilinas Penicilinas, cefalosporinas 1 ^a -4 ^a generación, aztreonam	
	Case B de Ambler	Metalo beta lactamasas: IMP-1, IMP-2, IMP-3, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-10, IMP-12 VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-5, VIM-6 .	Penicilinas, cefalosporinas 1 ^a -4 ^a generación, carbapenemicos, no aztreonam.	Codificadas por plásmidos.
	Clase C de Ambler	Cefalosporinasas: AmpC, CARB-5.	Penicilinas, cefalosporinas.	El 98% de las cepas produce AmpC, es inducida o desreprimida por exposición a antibacterianos.
	Clase D de Ambler	Oxacilinasas: OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-49, OXA-51, OXA-58.	Penicilinas, cefalosporinas variable, carbapenemicos, no aztreonam.	
Alteración de PBP y porinas de membrana (PME)		Enzima ligadora de penicilina no identificada. PME 29 KDa PME 33-36 Kda	Carbapenémicos	Generalmente se asocia la mutación de porinas con sobreproducción de AmpC.
Inactivación enzimática del antimicrobiano	N-acetiltransferasas	Enzimas acetiladoras: AAC I-V	Aminoglucósidos	
	O-nucleotiltransferasas	Enzimas fosforiladoras: ANT, ADD.		
	O-fosfotransferasas	Enzimas fosforiladoras: APH I-V		
Mutación ADN polimerasas	AND girasa	gyr-A	Fluoroquinolonas	
	Topoisomerasa IV	par-C		

Fuente: Livermore, David M. Microbiology b-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clinical Microbiology Reviews 1995;8: 557–584

Anexo 3. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón.

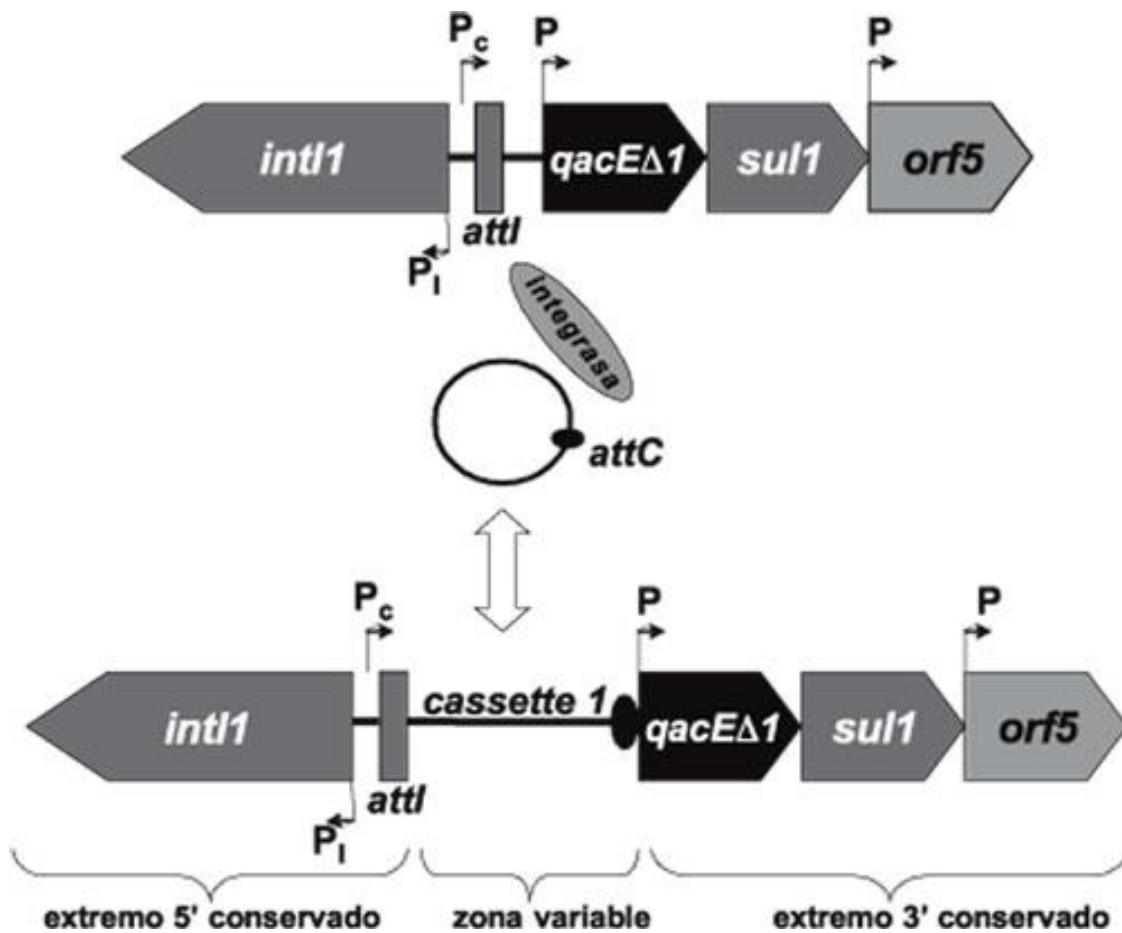
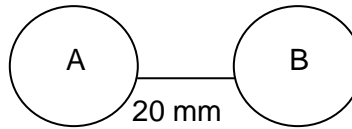


Figura No.1. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de *cassettes* genéticos de resistencia. *int1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; P_i : promotor que transcribe la integrasa; P_c : promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *attC*: sitio de recombinación del *cassette* genético (esquema no dibujado a escala) (38).

Anexo 4. Test de doble disco sinérgico

A= Taxo de Imipenem

B= Taxo impregnado con EDTA 0.5 M

Interpretación= Observar sinergia entre ambos discos para determinar presencia de metaloenzimas.