

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE METALOENZIMAS EN AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS

Elisa María Felipe Galindo

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Julio de 2010

JUNTA DIRECTIVA**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

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

INDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	4
A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
B. Mecanismos de acción de los antimicrobianos	5
1. inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	5
2. Alteración de la membrana celular	6
3. Inhibición de la síntesis proteica	6
4. Alteración de la síntesis de ácidos nucleicos	7
C. Resistencia Bacteriana	7
D. Mecanismos de resistencia bacteriana	8
1. Bombas de expulsión activa	8
2. Disminución de la permeabilidad de la membrana	8
3. Cambios estructurales de PBP´s	9
4. Producción de β -lactamasas	9
a. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	10
b. Mecanismo tipo AmpC	11
c. Metaloenzimas	11
i. Funciones de la proteína en una metaloenzima	13
ii. Funciones de un metal en una metaloenzima	13
iii. Clasificación de las metaloenzimas	13
iv. Código cromosomal en las metaloenzimas	14
v. Aparato genético de metaloenzimas transferibles	16
vi. Metaloenzimas transferibles.	17
1. Metaloenzimas tipo IMP	17
2. Metaloenzimas tipo VIM	22
3. Metaloenzimas tipo SPM-1	27
4. Metaloenzimas tipo GIM-1	28
D. Determinación de metaloenzimas	28

IV. Justificación	30
V. Objetivos	31
VI. Materiales y Métodos	32
VII. Resultados	37
VIII. Discusión	42
IX. Conclusiones	49
X. Recomendaciones	50
XI. Referencias	51
XII. Anexos	59

I. RESUMEN

La resistencia a múltiples antimicrobianos es habitual en *Pseudomonas aeruginosa*. Este hecho lleva consigo dificultades para realizar un tratamiento adecuado, lo cual contribuye a aumentar la gravedad de las infecciones. 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 inadecuado de antibióticos.

Las metaloenzimas son una clase de β -lactamasas cuya característica química es poseer metales en su estructura, proveyéndole a la bacteria una vía eficiente y efectiva de resistencia a agentes antibacterianos β -lactámicos. Más específicamente le confieren resistencia a carbapenemes.

Debido a que actualmente se han incrementado los mecanismos de resistencia bacteriana a nivel hospitalario, se realizó este estudio observacional descriptivo con el propósito de determinar la presencia de metaloenzimas en 78 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de distintas salas del Hospital General San Juan de Dios, obtenidas en un periodo de cuatro meses y referidas de la unidad de Bacteriología del laboratorio de dicha institución.

Para evidenciar la presencia de este mecanismo de resistencia se observó el sinergismo entre el disco de Imipenem y el de EDTA.

Los resultados se analizaron con el programa Whonet versión 5.0, el cual es un software para el manejo de resultados de rutina del laboratorio, enfocado en el análisis de datos, particularmente en los resultados de susceptibilidad antimicrobiana. No se encontró metaloenzimas en los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* estudiados. De los 78 aislamientos resistentes a Imipenem, 21 corresponden a muestras de secreción orotraqueal. Con respecto al tipo de sala, 10 corresponden a las muestras obtenidas de la unidad de cuidados progresivos intensivos (UCPI). Algunos de los aislamientos resistentes a

Imipenem presentan susceptibilidad a Meropenem, que es otro carbapenem, por lo cual puede inferirse que la resistencia a Imipenem no implica necesariamente la resistencia a Meropenem, por las diferencias de estabilidad frente a los mecanismos de resistencia.

Con la realización de este estudio, se observó que todos los aislamientos incluidos en esta investigación fueron resistentes a por lo menos un antibiótico, esto debido a que *Pseudomonas aeruginosa* posee patrones idénticos de susceptibilidad antibiótica que se han constituido en cepas nosocomiales como producto de la forma de utilización de los antibióticos disponibles.

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. INTRODUCCIÓN

El incremento de las infecciones nosocomiales causadas por *Pseudomonas aeruginosa* es responsable de infecciones graves como sepsis, neumonía, meningitis, entre otras. De esta manera las unidades más afectadas son las de cuidados intensivos y quemados, en donde el uso masivo de antibióticos ha provocado la aparición de cepas multirresistentes (1,2).

La resistencia a múltiples antibióticos es habitual en este microorganismo, provocando dificultades para realizar un tratamiento adecuado, lo cual contribuye a aumentar la gravedad de la infección.

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 antibióticos. 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 (3).

Las metaloenzimas son una clase de β -lactamasa cuya característica química es poseer metales en su estructura, proveyéndole a la bacteria una vía eficiente y efectiva de resistencia a agentes antibacterianos β -lactámicos. Más específicamente le confieren resistencia a carbapenemes. Si aumenta la prevalencia de las metaloenzimas se compromete la eficacia de este grupo de antibióticos (carbapenemes) y acorta su uso en el tratamiento de infecciones nosocomiales (3). Es importante el estudio y control de cepas multirresistentes, ya que los carbapenemes son utilizados como último recurso en el tratamiento de infecciones graves, por lo tanto es de suma importancia determinar la presencia de este mecanismo de resistencia en los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del Hospital General San Juan de Dios y de esta manera informar a las autoridades hospitalarias para que tomen medidas contra posibles brotes (3).

III. ANTECEDENTES

A. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo, móvil por flagelo polar único, aerobio, no esporulador, oxidasa positivo, catalasa positivo, que produce pigmentos fluorescentes verde- amarillentos, indol negativo y rojo de metilo negativo (4).

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, es relativamente ubicua y comúnmente se le encuentra en polvo, agua, plantas, verduras, animales y ambientes marinos.

Puede crecer bien en diferentes medios y soporta gran variedad de condiciones físicas, sin embargo prefiere los ambientes húmedos (5).

Pseudomonas aeruginosa está asociada a infecciones de los tractos respiratorio y urinario; infecciones en quemados u otros traumatismos severos que afecten a amplias zonas de la piel o bien en pacientes con fibrosis quística; sin embargo, no es un parásito estricto, sino un oportunista típico, especialmente en medios hospitalarios, iniciando una infección cuando el individuo se encuentra inmunocomprometido; también puede causar infecciones sistémicas, infecciones nosocomiales derivadas de cateterismos, traqueotomías, punciones lumbares y transfusiones; infecciones en pacientes con tratamientos inmunosupresores, corticosteroides, antibióticos o radiaciones; puede contaminar heridas quirúrgicas, abscesos, quemaduras e infecciones de oído (1,2).

Se propaga debido a su presencia en verduras frescas, crema para manos, uñas artificiales y acrílicas del personal hospitalario, nebulizadores, analizadores de oxígeno, monitoreo urodinámico, máquinas de diálisis, endoscopios entre otros (5).

Los factores que contribuyen a la patogénesis y virulencia incluyen la capacidad de adherencia, producción de toxinas y producción de glicocálix. La adherencia al epitelio celular es favorecida en procesos tales como la intubación, cateterización urinaria y trauma. Las toxinas pueden causar necrosis; y la producción de glicocálix puede favorecer la formación de un biofilm mucoso alrededor de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa*, formando una barrera contra las defensas del huésped, los antibióticos y los desinfectantes (5, 6).

B. Mecanismos de acción de los Antimicrobianos

Los antibióticos destruyen o inhiben 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. 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, todos los antibióticos aunque poseen un modo de acción primario, actúan de manera secundaria en otras partes de la anatomía o fisiología del microorganismo (7).

Los principales mecanismos de acción de los antibióticos 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

1. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana

La resistencia de la pared celular está dada por 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 (anexo 1) , 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 esta 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 (7).

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 (anexo 2). 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 (7).

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 detención de

su crecimiento, este resultado es el que se busca con el empleo de los antibióticos (anexo 3) en las infecciones bacterianas (7).

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 (anexo 4) 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 (7).

C. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es susceptible habitualmente. La mayor parte de la resistencia a antibióticos es debida a genes de resistencia que se transfieren por intercambio genético (8, 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 antibióticos.

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, deleción o transposición, siendo estos la causa de la dispersión de las cepas resistentes (3).

D. Mecanismos de resistencia bacteriana

Los mecanismos generales de resistencia bacteriana son los siguientes:

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

1. Bombas de expulsión activa

Las bombas de expulsión activa son proteínas capaces de eliminar antibióticos, 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 antibióticos a través de la membrana externa de las bacterias ocurre por medio de porinas, que son proteínas transportadoras específicas para compuestos con características fisicoquímicas determinadas. Por lo que la permeabilidad de la membrana bacteriana a los antibióticos 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 antibióticos o cambia su estructura (9,10).

3. Cambios estructurales de PBP's (Proteínas fijadoras de Penicilina)

Este mecanismo de resistencia consiste en que los microorganismos cambian la estructura de las PBP's presentes en su membrana de tal manera que no permite la unión del antibiótico a éstas. Es efectivo para antibióticos que tienen como objetivo inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana y cuyo sitio blanco son las PBP's (9,10).

4. Producción de β beta-lactamasas

Las β beta-lactamasas son proteínas enzimáticas que catalizan la hidrólisis del anillo β beta-lactámico, separando el enlace amida, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular (3, 9,11).

Las β beta-lactamasas en las bacterias gram negativo se encuentran en el espacio periplásmico entre la pared celular y la membrana externa. Aunque todas las β 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 β beta-lactamasa es variable, pudiendo localizarse en el cromosoma o estar codificada por plásmidos. Las β beta-lactamasas 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 (1, 12).

Las β beta-lactamasas se clasifican de diversas maneras según la secuencia de aminoácidos y por sus características funcionales definidas en sus perfiles de sustrato y de inhibidores (13).

Basados en estudios moleculares, se han descrito 2 tipos de enzimas hidrolizadoras de carbapenemes (β beta-lactamasas): enzimas serina, que poseen

una serina en el sitio activo; y metaloenzimas (clase B), que requieren de cationes divalentes como cofactores para la actividad enzimática. En contraste con las enzimas serina, las metaloenzimas pueden experimentar inhibición con agentes metálicos quelantes como EDTA y compuestos con base tiol (14).

a. β - lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Los organismos productores de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) han aparecido en clínicas y hospitales en los últimos años constituyendo un problema de salud pública grave. Las BLEE se derivan de enzimas TEM (subdivisión de las BLEE) 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 Estados Unidos de Norteamérica. En Latinoamérica no se habían reportado BLEE hasta 1985 (3).

Estas enzimas son producidas mas comúnmente por *Klebsiella* y *Escherichia coli* pero se presentan también en otras bacterias gram negativo como *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia marcescens* *Pseudomonas aeruginosa*, etc (3).

Los organismos que producen BLEE tienen importantes implicaciones por su resistencia a antibióticos que incluyen cefalosporinas de 3ra generación, penicilinas de espectro extendido y monobactámicos. Las tasas de susceptibilidad son variables para fluoroquinonas, aminoglucósidos y cefalosporinas de cuarta generación. Los carbapenemes y los beta-lactámicos con inhibidores de las beta-lactamasas como la piperacilina-tazobactam son los únicos antibióticos en la actualidad activos contra las BLEE. Desafortunadamente la utilización de los carbapenemes ha aumentado en un 67% la aparición de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Imipenem (3, 14).

b. Resistencia por medio del gen *AmpC*

Es un mecanismo de resistencia que se activa a partir de la hipersaturación intracelular de monómeros de la pared celular.

Los antibióticos sujetos a este mecanismo de resistencia se dividen en tres grupos:

Grupo 1: El antibiótico es un buen inductor, activa la producción de β -lactamasas pero es sensible a ésta. En este grupo están las aminopenicilinas, cefalosporinas de 1ra y 2da generación e inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina ácido clavulánico, ampicilina).

Grupo 2: El antibiótico es un buen inductor y es resistente a la enzima. La bacteria produce β -lactamasas pero no destruye al antibiótico. En este grupo están los carbapenemes.

Grupo 3: El antibiótico es mal inductor y es sensible a la enzima. El antibiótico no activa la producción de β -lactamasa pero es destruido por ésta. Para que este evento ocurra es necesaria la presencia de un antibiótico que sea buen inductor de β -lactamasa ó que la cepa sea derreprimida.

Una cepa mutante derreprimida es aquella que mantiene siempre activa la producción de β -lactamasa debido a la ausencia de un regulador enzimático denominado AmpR.

c. Metaloenzimas

Las metaloenzimas son una clase de β -lactamasas cuya característica química es poseer metales en su estructura. Actualmente se relacionan con la resistencia a los carbapenemes (4). Las metaloenzimas proveen a la bacteria de una vía eficiente y efectiva de resistencia a agentes

antibacterianos β -lactámicos. Más específicamente le confieren resistencia a carbapenemes. Si aumenta la prevalencia de las metaloenzimas se compromete la eficacia de este grupo de antibióticos y acorta su uso en el tratamiento de infecciones nosocomiales.

Las metaloenzimas han sido identificadas en un amplio espectro de patógenos importantes clínicamente, tales como: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii*. Estas enzimas también tienen la capacidad de diseminarse a través de otras poblaciones bacterianas, lo cual es demostrado por el surgimiento de la metaloenzima IMP-1 en Japón. El surgimiento de esta enzima ha sido facilitado por estar codificado en un integrón, recientemente se han encontrado aislamientos clínicos en Europa (15).

Una forma de combatir este problema clínico potencial es el uso de inhibidores específicos de metaloenzimas en combinación con un antibiótico β -lactámico. Para esto se han identificado diferentes moléculas no β -lactámicas como inhibidores específicos de estas enzimas. Una serie de compuestos tio éster del ácido mercaptoacético fueron identificados como inhibidores de metaloenzimas. También fueron descritos otros inhibidores como la acetona, alcohol trifluorometilo y compuestos tetrazoildifenilo, sin embargo éstos se han identificado como inhibidores específicos de metaloenzimas tipo CfiA de *Bacteroides fragilis*. Ninguno de éstos últimos muestran sinergia con antibióticos β -lactámicos, pero se ha encontrado cierta actividad con meropenem. Es necesario identificar la actividad antibacteriana de espectro extendido combinados con carbapenemes. La pérdida de interacciones potenciales con IMP-1 es probablemente la causa del bajo potencial inhibitorio que éstos presentan. El bajo potencial de inhibición que éstos presentan en *Pseudomonas aeruginosa* se debe a la poca penetración de éstos compuestos a través de la membrana pseudomonal (15).

i. Funciones de la proteína en una metaloenzima

Las proteínas proveen un entorno de coordinación relativamente estable para el metal o bien se unen a coenzimas, que a su vez contienen metales. Estas favorecen la ionización de los sustratos, lo que mejora la catálisis y estabilizan temporalmente los sustratos en la posición adecuada. La proteína proporciona la selectividad por los sustratos colocando barreras contra sustratos inadecuados y favoreciendo la entrada de los adecuados. En ocasiones, la apoproteína es capaz de concentrar y/o activar localmente los sustratos. Provee un entorno dieléctrico adecuado al ión metálico y a los sustratos (16).

ii. Funciones de un metal en una metaloenzima

Actúan como punto de recolección de reactivos (antibiótico) modificando la acidez del ligando coordinado al metal. Además desarrollan funciones estructurales (16). Las actividades de las metaloenzimas dependen principalmente del zinc y son inhibidas por agentes quelantes tales como el EDTA (concentración inhibitoria 50%, 50 mg), ácido mercaptopropiónico y ácido mercaptoacético (17).

iii. Clasificación de las metaloenzimas

Todas las metaloenzimas hidrolizan imipemen, pero esta habilidad varía considerablemente, ya que puede o no ser relacionada con el nivel de resistencia a los carbapenemes. (18) Por consiguiente esta clasificación es llamada del grupo 3 y se realiza de acuerdo a como actúan con el imipenem o con otro β -lactámico (19).

Esencialmente las enzimas del grupo 3a poseen un amplio espectro o actividad. Las metaloenzimas del grupo 3b poseen una afección preferencial por los carbapenemes; y las metaloenzimas del grupo 3c hidrolizan pobremente a los carbapenemes comparado con otros sustratos β -lactámicos. No obstante estas enzimas poseen la característica de ser inhibidas universalmente por el

EDTA por ser este un agente quelante de cationes divalentes, debido a esto inhibe el mecanismo de acción de las metaloenzimas (19).

A nivel molecular, las metaloenzimas son un grupo desigual de proteínas, que hace la clasificación y estandarización de sus estructuras virtualmente imposible. Se ha hecho una subdivisión llamada metaloenzimas clase "B" basada en secuencias que las identifican y otros aspectos estructurales (19). El árbol filogenético indica que la relación entre una metaloenzima y otra está dada por sus secuencias nucleotídicas. Las metaloenzimas de la clase B1 poseen una llave de zinc coordinada por residuos de tres histidinas y una cistina, entre ellas se encuentran: IMP, VIM, GIM y SPM-1. Las metaloenzimas de la clase B2 incluyen las que poseen una asparagina en lugar de histidina, la cual ha sido derivada de *Aeromonas spp.* Y de *Serratia fonticola*. Las metaloenzimas SFH- 1 y L1 ocupan la clase B3, que es la única entre todas las β -lactamasas en ser funcionalmente representada como un tetrámero (20).

La estandarización de metaloenzimas ha sido propuesta, según los proyectos usados para estandarizar las β -lactamasas de la clase A. Sin embargo las metaloenzimas de la clase B están más lejos de la problemática, debido a su naturaleza desigual y a su variabilidad en el número de aminoácidos (21).

iv. Código cromosomal en las metaloenzimas

Algunas bacterias de hábitats ubicuos, poseen metaloenzimas, por lo que en la actualidad, existe un debate del por qué de esta situación. Un argumento es que durante muchos períodos de tiempo, las bacterias han sido expuestas a β -lactámicos, por lo que estas han ido adquiriendo genes de resistencia. Otro argumento es que estas enzimas realizan una función celular normal. A pesar de estos puntos de vista, la mayor parte de los genes que codifican para metaloenzimas son inducibles, y la mayoría de bacterias las poseen, por lo que estas pueden llegar a ser altamente resistentes a los β -lactámicos. Afortunadamente estos microorganismos son patógenos oportunistas, y

raramente *S. maltophilia* y *Bacillus anthracis*, pueden causar una infección seria. El código cromosomal de las metaloenzimas incluye, *Bacillus cereus* (BC II) (22) *Bacillus anthracis* (23) *S. maltophilia* (L1) (24), *Aeromonas hydrophilia* (CphA) (18), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB or GOB-1) (25), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1) (26), *Legionella gormannii* (FEZ-1) (27), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B) (28), *Myroides* spp. (TUS-1, MUS-1) (29) *Janthinobacterium lividium* (THIN-B) (30), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) (31) y *S. fonticola* (SFH-1) (32).

Generalmente, el código cromosomal de las metaloenzimas, varía poco de una especie a otra. La excepción más notable puede observarse en la metaloenzima de *Chryseobacterium meningosepticum*, en donde las enzimas BlaB y GOB- varían considerablemente (11% de similitud) por lo que han sido divididas en dos subclases. Estas enzimas han sido co-reguladas con β lactamasas serina. *A. hydrophila* y *Aeromonas veronii* producen tres β lactamasas; una penicilinasa, una cefalosporinasa y una metaloenzima, las cuales son expresadas en un nivel alto. Los mutantes de resistencia a los β lactámicos están seleccionados. Un fenómeno similar puede observarse en *S. maltophilia*, en donde el alto nivel de resistencia a los β lactámicos, es debido a la expresión de las metaloenzimas tipo L1 y L2. Esta derrepresión usualmente ocurre con una frecuencia de 1 en 10^5 o 10^7 y puede ocurrir en vivo en pacientes que tengan terapia β lactámica (33).

El grupo de genes de metaloenzimas de *Bacteroides* spp. es a menudo descrito como fácilmente transferible, comparado con otras bacterias anaeróbicas. *Bacteroides fragilis* es relativamente resistente a β lactámicos, debido a la producción potencial de la metaloenzima CfiA o también llamada algunas veces CcrA. El gen de esta metaloenzima fue caracterizado por primera vez en 1990 y es uno de los más intensamente estudiados con respecto a estos mecanismos de catálisis. CfiA requiere de una secuencia alquilada, que le provea un promotor adecuado, por esa razón requiere de una expresión potencial de un gen estructural.

v. Aparato genético de metaloenzimas transferibles

La diseminación de genes de metaloenzimas es debida al consumo inadecuado de antimicrobianos, tales como β -lactámicos de espectro extendido, cefalosporinas y carbapenemes (35). La mayoría de genes codifican metaloenzimas tipo *IMP* y *VIM*, los cuales se encuentran en la clase 3 de integrones así como *GIM-1* los cuales están localizados en la clase 1(36) de integrones. Los integrones son capaces de producir genes, en un sitio específico de recombinación entre dos sitios de ADN, uno en el integrón y el otro en el cassette del gen. Los integrones poseen 3 regiones. Región 5', región 3' y una región variable. La región 5' contiene el gen integrasa (*intI*), el cual está adyacente al sitio de recombinación (*attI*) y a un promotor, lo cual facilita la expresión de los genes en la región variable. La región 3 a menudo consiste en una supresión parcial del gen *qac* (*qacE Δ 1*) el cual se funde con el gen *sul*, provocando resistencia hacia los antisépticos y a las sulfonamidas (37).

Los cassettes son pequeñas piezas de ADN circular, de aproximadamente 1Kb, que comprimen al gen junto con el sitio de recombinación (38) en un elemento de la base 59. Los genes *bla_{VIM}* provenientes de algunos países Europeos han sido truncados con el elemento de la base 59 y los cassette han sido fundidos. Esto ha provocado que los genes de las metaloenzimas, y los genes *aacA4* hagan resistente a la bacteria hacia kanamicina, neomicina, amikacina y estreptomina, por lo tanto, ambos aminoglucósidos y β -lactámicos protegen a la bacteria de la fusión del cassette (39).

Los cassettes que poseen genes de resistencia hacia los aminoglucósidos y β -lactámicos, pueden moverse libremente de un integrón a otro, sin embargo estos no pueden moverse por sí mismos de un organismo a otro, por lo que requieren la asistencia de otros elementos genéticos, tales como plásmidos y transposones (genes móviles). La mayoría de genes de metaloenzimas son encontrados en plásmidos (37).

El contexto genético de las metaloenzimas no solo representa una medición de la plasticidad de estas, sino permite razonar la transferencia de éstas a nivel internacional. En el 2003 fue reportado el gen *bla_{VIM-13}* y su integrón fue encontrado en el transposón tipo Tn5051, proveniente de un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en Italia (Verona). La inserción de los elementos conteniendo los genes *bla_{VIM-13}* y *bla_{VIM-2}* de *Pseudomonas aeruginosa* en Polonia se encuentran en un sitio idéntico, en el cual los genes también son idénticos, por lo cual puede decirse que el transposon es el responsable de la diseminación de la clase 1 de integrones (40).

No todos los genes de metaloenzimas están asociados con integrones y transposones. El contexto genético de *bla_{SPM-i}* es único por ser adyacente a los genes de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y no asociado con integrones o transposones (41).

vi. Metaloenzimas transferibles.

1. Metaloenzimas tipo IMP (Imipenemasa)

El origen de los genes *bla_{IMP}* se ha dado en diferentes áreas geográficas del mundo, así como en diferentes tipos bacterianos, (anexo 5). La primera indicación de metaloenzimas móviles fue con el descubrimiento de la cepa GN17203 de *Pseudomonas aeruginosa*, en 1988 en Japón, (42). El aislamiento poseía una CMI de 50 ug/ml, así como resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido; a ceftazidina CMI > 400ug/ml. El alelo de resistencia fue encontrado en un plásmido de conjugación transferible, el cual podía ser movilizado entre diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Tres años después un gen idéntico fue encontrado en la cepa Tn9106 de *Serratia marcescens*, aislada de una infección del tracto urinario en el hospital Aichi en Okazaki, Japón (43). Dos años después el mismo gen fue caracterizado por *Serratia marcescens*, de un hospital en la ciudad de Anjyo, situada cerca de la ciudad de Okazaki. Esta IMP-1 alelo *bla_{IMP-1}* fue encontrado dentro de la clase

tres de integrones adyacentes a *aac(6')Ib* cuyo gen fue hospedado en un plásmido largo (37).

Un estudio posterior de siete hospitales generales de Japón en 1993 identificó cuatro cepas de *Serratia marcescens* que contenían el gen *bla_{IMP-1}*; (28). Una siguiente investigación en 17 hospitales generales de Japón examinó 3700 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* colectadas entre 1992 y 1994 con genes *bla_{IMP-1}*, (44). Además se encontraron 15 cepas en 5 hospitales de diferentes áreas geográficas que dieron positivo para *bla_{IMP-1}*, cuando las CMI de Imipenem de los aislamientos con metaloenzimas fueron examinados, ellos variaban de 2 mg/l, a 128 mg/l, lo cual sugiere que la adquisición de una metaloenzima no ubicua confiere resistencia. En otro estudio de 54 aislamientos con una resistencia a ceftazidima (CMI > 128mg/l) de 18 hospitales en Japón, 22 aislamientos fueron positivos para el gen *bla_{IMP-1}* detectados por PCR. Estos aislamientos positivos incluían 9 aislamientos de *Serratia marcescens*, 2 de *Achromobacter xylosoxidans*, 1 de *Pseudomonas putida* y 1 de *klebsiella pneumoniae*. El PCR detectó el gen *intl3* en 33 de 42 cepas positivas para *bla_{IMP-1}* (18). Reportes japoneses denotan el aumento en la dispersión de genes de metaloenzimas principalmente acarreadas en integrones clase 3 en 16 especies diferentes de bacterias gram negativo (45). Algunos estudios han mostrado que cepas de *Pseudomonas putida* con metaloenzimas y genotipos idénticos han permanecido en ambientes hospitalarios por largos periodos de tiempo (9,46).

Durante un estudio de peritaje de aislamientos clínicos de *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes spp.* para detectar la presencia de metaloenzimas, se identificaron tres variantes de IMP-1 en Japón, IMP-3, IMP-6 e IMP-10 (16). IMP-3 tiene dos cambios aminoacídicos en relación a IMP-1 el cual fue identificado en *shigella flexneri*. Estudios genéticos y cinéticos determinaron la sustitución de una glicina por una serina, en la posición 196 causando una reducción de la actividad con las penicilinas. Este cambio aminoacídico es observado en IMP-6, el cual muestra no solo una actividad reducida contra penicilina G y piperacilina sino también un mayor

nivel de hidrólisis de meropenem comparado con imipenem; lo opuesto a IMP-1 (37-47).

IMP-10 fue descubierto como resultado de un estudio de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes spp.* productores de IMP colectados desde 1995 al 2001 (48). 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 *bla_{IMP-10}* está mediado por plásmidos en *Pseudomonas aeruginosa* y mediado cromosómicamente en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* y uno de *Achromobacter xylosoxidans*. El gen *bla_{IMP-10}* difiere del *bla_{IMP-1}* por un simple cambio de bases, lo cual es 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 (37).

La creencia de que los genes móviles de metaloenzimas eran un problema distante de Japón, fue denegada con el apareamiento de *bla_{IMP-2}* en 1997 y *bla_{IMP-5}* en 1998 en Italia y Portugal respectivamente (18). Reportes posteriores describieron en detalle los genes *bla_{IMP}*, su localización cromosómica y detalles de su ambiente genético. IMP-2 tiene 36 cambios aminoacídicos en relación a IMP-1, e IMP-5 tiene 17 cambios aminoacídicos en relación a IMP-1, ambos con diferentes contextos genéticos, *bla_{IMP-2}* fue encontrado junto a dos alelos aminoglicosídicos que confieren resistencia (*bla_{laaacA4}* seguido por *aadA*) y el gen *bla_{IMP-5}* perteneciendo a un único cassette genético (49,50).

IMP-12 fue producida por *Pseudomonas putida* proveniente de un aislamiento clínico en Verona en el año 2000 y su alelo *bla_{IMP-12}* fue localizado en un plásmido no transferible de 50KB. IMP-12 es altamente divergente de IMP-1, posee 36 diferencias aminoacídicas y tiene poca actividad contra penicilina (51). El gen *bla_{IMP-13}* fue clonado de un espécimen clínico de *Pseudomonas*

aeruginosa aislado en Roma, el cual tenía 19 aminoácidos diferentes a IMP-1 y estaba codificado cromosómicamente. El alelo *bla*_{IMP-13} fue encontrado más tarde en un plásmido y ha sido asociado con una epidemia de poca importancia en un hospital en el sur de Italia (37).

La diferencia 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 *Acinetobacter junii* y *Acinetobacter baumannii*. El aislamiento de *Acinetobacter junii* con *bla*_{IMP-1} presentó una secuencia aminoacídica idéntica, sin embargo la secuencia nucleotídica mostró múltiples cambios silentes. La cepa de *Acinetobacter baumannii* fue aislada de una mujer que recientemente había estado hospitalizada por 4 semanas en España, siendo trasladada a Gran Bretaña, el origen de este aislamiento resistente y sus detalles genéticos aún no han sido descritos totalmente (37).

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 IMP7 (*Pseudomonas aeruginosa*) en Canadá e IMP-4 (*Acinetobacter spp*) en Hong Kong (37,52). 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. *bla*_{IMP-4} estaba albergado en un plásmido y codificado en un integrón con otros genes de resistencia (*qacG2*, *aacA5*, *catB3*). En 1997 y 1998 se encontraron cepas de *Acinetobacter* con IMP-4 con una prevalencia del 14% de todos los aislamientos. *bla*_{IMP-4} se encontró más tarde (1998-2000) en *Citrobacter youngae* y *Pseudomonas 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 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, posiblemente importada del sureste de Asia (37).

La metaloenzima IMP-7 fue responsable de un brote de *Pseudomonas aeruginosa* en dos hospitales de Canadá. El integrón fue clonado y se encontró *bla*_{IMP-7} en la tercera posición de un cassette genético con otros cassettes que codificaban resistencia a aminoglucósidos (*org1*, *aacC4*, y *aacC1*)(37). Se encontró en 1999 un gen de *bla*_{IMP-7} idéntico a un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* resistente en Malasia (53).

Otras investigaciones sobre aislamientos positivos para metaloenzimas en Japón, revelaron que hay poca evidencia de propagación de estos alelos. En Taiwán, se encontró IMP-8 en un integrón clase 1 junto a *aacA4* en un espécimen de *Klebsiella* aislada en 1998 (11). IMP-8 es más similar a IMP-2 (dos aminoácidos diferentes) que a IMP-1. Además, estudios de hibridación de una sonda con IMP-8 en un 28.5% de cepas resistentes a ceftazidima de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de 1999 al 2000, fueron resistentes a carbapemen. El gen *bla*_{IMP-8} se usó también para examinar 9082 aislamientos entéricos. 36 de 1261 aislamientos de *Enterobacter cloacae* fueron positivos. Recientemente IMP-1 y otras metaloenzimas fueron repostadas en Singapur en el 2001 (37).

La única información en la literatura de metaloenzimas tipo IMP en América ha venido principalmente de Brasil, en donde es un serio problema con los aislamientos de *Acinetobacter spp.* Por ser estos multidroga resistentes. 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 presentan solo una secuencia parcial del gen. Estudios recientes de aislamientos colectados a través del programa de vigilancia antimicrobiana 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 *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de las Cruces, Nuevo México (37).

2. Metaloenzimas tipo VIM (Verona Imipenemasa)

El segundo grupo predominante de las metaloenzimas adquiridas son las tipo VIM (anexo 6) VIM-1 fue descrita primero en Verona, Italia la cual procedía de un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Este aislamiento clínico, obtenido en 1997, presentó resistencia a varios β -lactámicos, incluyendo piperacilina, ceftazidima, Imipenem y aztreonam. En particular, la CMI de Imipenem fue $> 128\mu\text{g/ml}$. El análisis bioquímico realizado de un extracto crudo de un cultivo de esta cepa reveló una actividad hidrolizadora de carbapenem que fue exhibida por EDTA y la utilización de Zn^{+2} . Estas observaciones sugirieron la producción de una metaloenzima. Los genes de la β -lactamasa fueron clonados, y la secuencia aminoacídica reveló una proteína de 266 aminoácidos con un PI de 5.3. La VIM-1 (Imipenemasa Verona) esta relacionada de manera distante a las otras metaloenzimas. Esta relacionada más cercanamente a *BCII* de *Bacillus cereus*, compartiendo solo 39% de aminoácidos. El perfil de hidrólisis de VIM-1 analizada de una cepa de *Escherichia coli* recombinante es típico de las enzimas clase B, hidrolizando a la mayoría de β -lactámicos excepto aztreonam. La resistencia a monobactam aztreonam, en el aislamiento original de *Pseudomonas aeruginosa*, se cree que se debe a sus mecanismos de resistencia como bombas de expulsión o hiperproducción de cefalosporinasas, al igual que los genes *bla_{IMP-1}*, los genes *bla_{VIM-1}* están integrados en un cassette genético dentro de integrones clase 1. Este integrón contiene un gen integrasa típico de los integrones clase 1 y adicionalmente al cassette genético, se encuentra un cassette genético *aacA4* que codifica resistencia a aminoglucósidos. En este aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, el integrón que contenía a *bla_{VIM-1}* estaba probablemente localizado en un cromosoma (54).

Más tarde, *bla_{VIM-1}* fue encontrado en *Achromobacter xylosoxidans* en el mismo hospital en Verona. Este aislamiento exhibió resistencia a todos los β -lactámicos, incluyendo carbapenemasas y contenía un plásmido de 30Kb no conjugado dentro de un integrón clase 1.

Adicionalmente, VIM-1 fue detectado en tres aislamientos clonados de *Pseudomonas putida* en Italia, como fuente de infecciones nosocomiales. Estos aislamientos, fueron recopilados en el mismo hospital de Verona, Italia. La CMI de Imipenem y meropenem fueron $>32\mu\text{g/ml}$, mientras que para aztreonam fueron de $32\mu\text{g/ml}$. Estos aislamientos contenían un plásmido de 52 kb que codificaba a VIM (12).

VIM-1 fue detectada también en *Escherichia coli* y en muchos aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en Grecia. También se encontró recientemente una cepa de *Klebsiella pneumoniae* positiva para VIM-1 en Francia que fue asociado con la beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5.

En un estudio realizado por Scoulica *et al*, las CMI de Imipenem y meropenem para los aislamientos clínicos de *Escherichia coli* estuvieron bajo los puntos de corte propuestos por la definición de resistencia (37).

El gen *bla*_{VIM-2} fue identificado primero en el sur de Francia de un aislamiento proveniente de *Pseudomonas 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 *bla*_{VIM-2} fue localizado en un plásmido no conjugativo de 45kb. VIM-1 y VIM-2 tienen idénticos residuos aminoácidos que pueden estar cerca en el sitio activo de estas enzimas. La heterogenicidad de las secuencias esta observada mayormente en las regiones amino y carboxilo terminal de VIM-1 y VIM-2 (37).

En un estudio epidemiológico de tipo retrospectivo, realizado en un hospital en Marsella, Francia, se encontró la primera *Pseudomonas aeruginosa* productora de VIM-2, el estudio reveló que de 1995 a 1999, se aislaron 10 aislamientos de *Pseudomonas 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 *bla*_{VIM2} variaba en tamaño y estructura (37).

Similarmente, se encontraron aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productora de VIM-2 como fuente de brotes epidemiológicos en dos hospitales universitarios de Italia y Grecia durante el mismo período. Se reportaron también cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras 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 involucró a cuatro pacientes en una unidad de cuidados intensivos, la cepa encontrada de *Pseudomonas aeruginosa* productora de VIM-2 fue sensible a aztreonam. Estos aislamientos fueron responsables de serias infecciones, tales como septicemia y neumonía en diferentes pacientes, además presentaban un alto nivel de resistencia a Imipenem. Adicionalmente VIM-2 ha sido detectado en *Citrobacter freundii* en Taiwán, en *Serratia marcescens* en Corea del Sur y en *Enterobacter cloacae* en Corea del Sur. En algunas cepas, la CMI del Imipenem y Meropenem fueron de 4ug/ml (37).

VIM-3, ha sido identificada en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en Taiwán. La secuencia aminoacídica de ésta difiere de VIM-2 por dos sustituciones de aminoácidos. El ambiente genético preciso de *bla*_{VIM-3} aun se desconoce, no se sabe si su localización es cromosómica (55).

VIM-4 fue reportada en aislamientos de *Pseudomonas 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-lactamámicos pero aztreonam presentó actividad antibacteriana (CMI de 16ug/ml). VIM-4 difiere de VIM-1 por un simple cambio de un aminoácido (Serina por Arginina) que también difiere entre VIM2 y VIM-3. Asimismo se identificó en Suecia un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de VIM-4 el cual es resistente a carbapenem. Este aislamiento proviene de un paciente transferido de Grecia (37).

Recientemente se identificó el mismo gen en *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, de un paciente hospitalizado en mayo del 2002 en Verona, Italia. Este paciente había recibido una terapia con carbapenem la cual contribuyó a la selección de productores de VIM. Las CMI de Imipenem y meropenem en *Klebsiella pneumoniae* fueron de 2 y 0.5ug/ml respectivamente, mientras que para *Enterobacter cloacae* las CMI fueron de 0.25 y 0.12ug/ml respectivamente. Se demostró que *bla*_{VIM-4} estaba localizado en el mismo plásmido en ambos aislamientos, haciendo interesante ver que los niveles (CMI) varían significativamente entre dos enterobacterias, aun cuando presentan el mismo mecanismo de resistencia (37).

VIM-5 difiere de VIM-1 en 5 aminoácidos. Este fue identificado en *Klebsiella pneumoniae* y en *Pseudomonas aeruginosa* en Ankara, Turquía. El aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el cual se identificó *bla* VIM-5 presentó resistencia a todos los beta-lactamámicos, incluyendo aztreonam. La beta-lactamasa VIM-6 fue identificada en dos aislamientos de *Pseudomonas putida* en Singapur. Estos fueron altamente resistentes a beta-lactamámicos, con CMI >32ug/ml para Imipenem y Meropenem, >256ug/ml para ceftazidima y 128ug/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 un solo aminoácido (37).

El último tipo de beta-lactamasa de tipo VIM que fue totalmente caracterizado es VIM-7, la cual se obtuvo de un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenem procedente 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-lactamasa tipo VIM. El gen *bla*_{VIM-7} fue localizado en un plásmido de 24 Kb fue identificado de un aislamiento clínico que fue resistente a todos los beta-lactamámicos, incluyendo aztreonam y a todos los antibióticos disponibles, excepto polimixina B (37).

Muchos reportes indican que las beta-lactamasas tipo VIM, pueden identificarse en distintas áreas geográficas, y varios estudios han evaluado la

proliferación de esta enzima en ciertas áreas. Aunque VIM-1 y VIM-2 han sido identificadas en muchas enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* permanece como el reservorio más importante de estas enzimas (37).

Se evaluó la presencia de metaloenzimas localizadas en genes de *Pseudomonas aeruginosa* en el hospital de la universidad de Trieste, Italia y encontró que el 20% de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y el 70% de dichos aislamientos resistentes a carbapenem producían las enzimas VIM-1 y VIM-2. Ellos demostraron una diversidad entre los aislamientos positivos para VIM y mostraron heterogenicidad en la transmisión de la resistencia (37).

De manera similar, se realizó un estudio retrospectivo en un hospital de Corea desde 1995. La resistencia a Imipenem alcanzó un 16% de todos los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y un 9% de los aislamientos resistentes produjeron β -lactamasa tipo VIM-2. Estos aislamientos estaban mayormente relacionados y su resistencia a carbapenem se transmitía por conjugación (37).

En otro estudio realizado en Grecia en el cual los aislamientos recuperados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenem de pacientes durante un año en el hospital de Universidad de Thessaly, Larissa, se estudió la producción de metaloenzimas. Los genes *bla_{VIM}* fueron detectados en 47 de 53 (88%) de los aislamientos resistentes a carbapenem de *Pseudomonas aeruginosa* que correspondían a 7 genotipos. Cuatro genotipos poseían *bla_{VIM-2}* y 3 poseían *bla_{VIM-4}*. Ellos estaban dentro de cassette genéticos simples o junto con un gen de resistencia a aminoglucósidos *aacA29a* en integrones clase 1. En Francia, se han reportado recientemente cepas productoras de VIM en *Pseudomonas aeruginosa*. Se realizó un estudio en Norte América en el periodo de 1999 al 2002, utilizando 1,111 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y 236 de *Acinetobacter 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 (37).

Se han encontrado, varias secuencias de nuevos genes *bla_{VIM}* que han sido ingresados en la base de datos del EMBL pero no han sido formalmente publicados. El primero de estos *bla_{VIM-8}* el cual fue aislado de *Pseudomonas aeruginosa* en Colombia, adicionándose al creciente número de genes *bla_{VIM}* descubiertos en Sur América. Otros dos *bla_{VIM-9}* y *bla_{VIM-10}* provenientes del Reino Unido los cuales difieren en dos aminoácidos. Actualmente se encontró *bla_{VIM-11}* aislado de *Pseudomonas aeruginosa* en Argentina e Italia. Esta es la segunda metaloenzima encontrada hasta la fecha en Argentina (37).

3. Metaloenzimas tipo SPM-1

Un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de Sao Paulo, Brasil, fue analizado en el año de 1997, el cual mostró la presencia de un gen al cual se designó como *bla_{SPM-1}* (Sao Paulo, metaloenzima). La cepa, 48-1997A fue obtenida de un aislamiento proveniente de una muestra de sangre, de una niña de 4 años quien padecía leucemia. El aislamiento mostró ser altamente resistente a todo el estandar anti-gram-negativo, excepto colistina (37).

La secuencia de SPM-1 difiere significativamente de la de IMP y VIM, debido a la presencia de una inserción de 24 aminoácidos, después del sitio activo. Esta inserción ha mostrado ser muy flexible y actúa como un bucle, aumentando probablemente la hidrólisis de los beta-lactámicos. El contexto genético de *bla_{SPM-1}* es el único, en ser inmediatamente asociado con una región de elementos y no con trasposones o integrones. Estos elementos comunes difieren significativamente en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, colectadas en áreas diferentes de Brasil, aunque los genes *bla_{SPM}* son idénticos (37).

4. Metaloenzimas tipo GIM-1

En el 2002, cinco aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, fueron recolectados de diferentes pacientes en un sitio médico en Dusseldorf, Alemania los cuales mostraron que poseían la clase B de β -lactámicos, designada como GIM-1 (German imipenemase). Los cinco aislamientos fueron susceptibles únicamente a polimixina B, estas cepas fueron comparadas con seis aislamientos susceptibles a carbapenemes los cuales fueron recolectados al mismo tiempo en Alemania en el mismo sitio médico (37).

La secuencia de aminoácidos de GIM-1, mostró más identidad con IMP-6, IMP-1 e IMP-4 (43.5, 43.1 y 43.1% respectivamente). La identidad con VIM-7 fue de 31.2% con VIM-1, VIM-4 y VIM-5 fue de 28.8% y únicamente en un 28.0% a SPM-1. GIM-1 contiene dos iones Zn^{2+} en el sitio activo sin embargo su mecanismo de hidrolizar los antibacterianos es similar al de IMP-1, pero su valor de K_m es más alto (37).

Similarmente a la mayoría de metaloenzimas, los genes bla_{GIM-1} fueron encontrados en la clase 1 de integrones, los cuales se encuentran en pequeños plásmidos (45Kb). Este integrón también posee otros tres genes de resistencia, dos hacia los aminoglucósidos ($aacA4$ y $aadA1$) y un gen de resistencia hacia los β -lactámicos (bla_{OXA-2}) (37).

D. Determinación de metaloenzimas

Para la determinación de metaloenzimas en *Pseudomonas sp* pueden utilizarse muestras de orina, sangre, esputo, fluido espinal, fluido pleural y en los catéteres venosos. A pesar de que la NCCLS no ha publicado ningún documento en el que se defina un método para la determinación de metaloenzimas se utilizan los siguientes métodos, el de Hodge, el de ceftazidima más ácido 2-mercaptopropiónico, el doble disco sinérgico de imipenem con EDTA y el de ceftazidima sódico con ácido mercaptopropiónico (el uso de este

método es poco frecuente debido a que el químico es volátil y la MIC de imipenem tiende a ser mayor que 8 mg/ml), todos estos métodos utilizan un agente quelante que inhibe la acción de las metaloenzimas (56).

El método de EDTA es de tipo sinérgico, tiene la capacidad de diferenciar todas las metaloenzimas producidas por *Pseudomonas* sp, su sensibilidad y especificidad es de 95.7% y 91% respectivamente. Esta metodología se basa en el aumento o disminución de zonas de inhibición con los discos de EDTA. Las zonas de inhibición de imipenem con EDTA menor a 14mm son metaloenzimas negativo, mientras que las mayores a 17mm son metaloenzimas positivo (57, 58, 59). Se ha encontrado que el EDTA es el mejor inhibidor de metaloenzimas, especialmente para anaerobios; con respecto al agar Mueller-Hinton es el preferido particularmente cuando es comparado con agar isosensitest, el cual produce frecuentemente falsas CMI's bajas para imipenem. El test imipenem más EDTA con agar Mueller-Hinton tienen una sensibilidad de 94% y una especificidad de 95% (14).

Los alelos *bla*_{IMP1} y *bla*_{VIM2} son detectados por las reacciones en cadena de polimerasa (PCR). El PCR amplifica la región variable del integrón utilizando primers designados 5`y 3`conservando segmentos del integrón. Esta secuencias muestran la presencia del alelo *bla* _{VIM2} localizado en el gen insertado en el integrón. Sin embargo el uso de esta técnica es más difícil debido al incremento de los distintos tipos de las metaloenzimas (58).

En Guatemala no se han realizado estudios sobre la presencia de metaloenzimas en microorganismos causantes de infecciones nosocomiales.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las metaloenzimas han incrementado gradualmente el aparecimiento de nuevas cepas multirresistentes a carbapenemes, las cuales causan infecciones nosocomiales en todo el mundo. Por lo tanto, fue importante la realización de este estudio en *Pseudomonas aeruginosa* (60, 61, 62).

En Guatemala no se ha realizado ningún estudio relacionado con cepas resistentes a carbapenemes. Por esta razón se realizó este estudio de resistencia por metaloenzimas en aislamientos provenientes del Hospital General San Juan de Dios, para dar a conocer las salas y tipos de muestras en donde hay *Pseudomonas aeruginosa* y de esta manera tomar medidas de prevención y control.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General:

Establecer la presencia de metaloenzimas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras de pacientes del Hospital General San Juan de Dios.

B. Objetivos específicos:

1. Detectar la producción de metaloenzimas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* por medio del método de doble disco sinérgico Imipenem-EDTA.
2. Determinar la frecuencia de metaloenzimas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en los distintos tipos de muestra analizados en el Hospital General San Juan de Dios.
3. Determinar la frecuencia de metaloenzimas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en los distintos tipos de sala analizados en el Hospital General San Juan de Dios.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* reportados como resistentes a Imipenem, provenientes del Hospital General San Juan de Dios

B. Muestra

Durante 4 meses se recolectaron 78 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem, obtenidos de pacientes del Hospital General San Juan de Dios

C. Recursos

1. Humanos

Elisa María Felipe Galindo (tesista)

Lic. Jorge Matheu (asesor)

Lic. Carlos C. Pérez De León (co-asesor)

2. Institucionales

Laboratorio de Microbiología del Hospital General San Juan de Dios

Unidad de Bacteriología del Laboratorio Nacional de Salud

3. Físicos

a. Equipo para antibiograma

- Autoclave
- Incinerador
- Mechero Bunsen
- Incubadora a 35°C
- Campana de flujo laminar
- Mezclador Vórtex

- Fotómetro
- Potenciómetro
- Balanza analítica

b. Materiales

- Beaker de 25 ml
- Regla
- Asas bacteriológicas
- Espátulas de metal
- Balón aforado de 100 ml
- 200 cajas de petri plásticas estériles
- Tubos Ependorf estériles
- Tips para micropipeteador estériles
- Hisopos estériles
- Rejilla de alambre
- Marcador permanente
- Guantes
- Gradillas
- Mayordomo
- Alcohol al 70%
- Cloro
- Pinzas de metal
- Frascos estériles
- Pipetas estériles con algodón de 10 ml y bulbo para pipetas
- Parafilm
- calculadora
- Erlenmeyer de 250ml
- Probetas de 100ml,250ml, y 1000ml

c. Reactivos

- Agua destilada
- Caldo Tripticasa Soya
- Agar Chocolate

- Agar Sangre de Carnero
- Agar Mueller-Hinton
- Estándar 0.5 de McFarland
- discos de imipenem
- discos de papel filtro estériles
- Soluciones de EDTA 0.1M
- Hidróxido de Sodio (NaOH) al 32% p/v
- Solución salina estéril
- Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*
- Agua destilada estéril

d. Control de calidad

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

D. Metodología

Se llevó a cabo la recolección de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en un período de 4 meses de muestreo comprendido de Febrero a Mayo de 2008. Dichos aislamientos provenían de distintas salas del Hospital General San Juan de Dios y que fueron ingresados al laboratorio de microbiología, a los cuales se les realizó el análisis respectivo para detectar la presencia de metaloenzimas, por el método de doble disco sinérgico, utilizando para ello imipenem y EDTA. Los aislamientos incluidos en este estudio, anteriormente habían sido reportados como resistentes a Imipenem por el equipo automatizado Walk away (microscan) (64,65).

E. Procedimiento

1. Preparación de la solución de EDTA

- Solución de EDTA 0.1M

Disolver 0.372 g de EDTA disódico dihidratado en 10 ml de agua destilada estéril, ajustando el pH a 8 con hidróxido de sodio al 32% p/v.

2. Impregnado de discos con solución de EDTA

Agregar 5 μ l de la solución de EDTA 0.1M a cada disco de papel filtro. Agregar 5 μ l de la solución de EDTA 0.1M a discos de imipenem. Dejar secar y refrigerar a -4°C .

3. Revitalización de aislamientos

Tomar una asada del aislamiento almacenado en el tubo ependorf el cual se encuentra a -8°C e inocularla en cajas de agar sangre de carnero o agar chocolate. Incubar a 35°C por 24 horas. De ser posible realizar una resiembra más para captar a la bacteria en optimas condiciones.

4. Antibiograma

- Preparar estándar de McFarland 0.5 (anexo 7).
- Inocular con hisopo estéril y en forma de tapete las cajas con agar Mueller Hinton
- Colocar los taxos o discos de imipenem, EDTA 0.1M e Imipenem más EDTA en la forma establecida para detectar metaloenzimas (anexo 8).
- Incubar a 35°C por 24 horas

5. Interpretación de placas

La interpretación de las placas se hace en base a dos parámetros:

- Comparación de zonas de inhibición de imipenem e imipenem + EDTA
- Observación de presencia de sinergismo de imipenem y EDTA (0.1).

F. Diseño de la investigación

Estudio observacional descriptivo, de tipo transversal en una muestra no probabilística por conveniencia, de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* que se recolectaron en un período de 4 meses (febrero-mayo 2008) los cuales fueron reportados como resistentes a Imipenem.

G. Análisis estadístico

Se realizó con el programa Whonet versión 5.0 el cual lleva a cabo un análisis de frecuencia para descripción de la población, los resultados se graficaron con porcentajes para determinar la frecuencia de metaloenzimas en los aislamientos de cada microorganismo y sus patrones de resistencia. Además se utilizó tablas de 2 X 2 para obtener el OR y el RR y de esta manera asociar la exposición con el efecto esperado.

H. Recolección de datos

La información de los aislamientos se obtuvo de la base de datos proporcionada por el Hospital General San Juan de Dios

VII. RESULTADOS

De los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* analizados, ninguno presentó metaloenzimas.

Durante el tiempo de muestreo se obtuvieron 362 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de los cuales 78 fueron resistentes a Imipenem lo cual corresponde al 22% de todos los aislamientos que se recolectaron durante el tiempo de muestreo (Tabla 1).

Tabla 1. Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de febrero a mayo de 2008

Mes	Aislamientos/mes	Aislamientos resistentes a Imipenem	Porcentaje de aislamientos resistentes a Imipenem
Febrero	93	23	29
Marzo	74	18	24
Abril	107	25	32
Mayo	88	12	15
Total	362	78	100

Los 78 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem fueron obtenidos especialmente de los servicios de unidad de cuidados progresivos intensivos (UCPI), unidad de cuidados intensivos neonatos (UCIN) y unidad de cuidados coronarios (UCC) (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem en relación a los servicios del HGSJD.

Servicio	Aislamientos		Porcentaje
	Resistentes a Imipenem		
UCPI	10		12
UCIN	8		10
UCC	8		10
Otros	53		68
Total	78		100

* UCPI (unidad de cuidados progresivos intensivos) UCIN (Unidad de cuidados intensivos neonatos) UCC (unidad de cuidados coronarios), Otros (UCIP unidad de cuidados intensivos pediátricos; CP cirugía pediátrica; salas de cirugías de adultos)

Los dos servicios del Hospital General San Juan de Dios con mayor número de aislamientos resistentes a Imipenem, como anteriormente se menciona, fueron UCPI y UCIN (OR = 0.41;RR = 0.65) (Tabla 3).

Tabla 3. Asociación de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem con relación al Servicio del HGSJD.

	Imipenem		Total	OR	RR
	Resistente	Susceptible			
UCPI	10	15	25		
UCIN	8	5	13	0.41	0.65
Total	18	20	38		

UCPI (unidad cuidados progresivos intensivos) UCIN (Unidad de cuidados intensivos neonatos)

Se observó que del total de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* que presentaban resistencia a Imipenem, la mayoría corresponde a secreción orotraqueal, seguido de urocultivos y hemocultivos (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem, con relación al tipo de muestra.

Tipo de muestra	Aislamientos	Porcentaje
Secreción Orotraqueal	21	27
Urocultivos	15	19
Hemocultivos	12	15
Secreción de herida operatoria	10	13
Cultivo de catéter	05	7
Úlcera de pie diabético	07	9
Otros	08	10
total	78	100

Otros (LCR, líquido articular, aspirado bronquial)

Secreción orotraqueal y urocultivos fueron los dos tipos de muestra de donde se obtuvo mayor número de aislamientos resistentes a Imipenem, (OR = 1.90; RR = 1.52) (Tabla 5).

Tabla 5. Asociación del tipo de muestra con la resistencia que presentan los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas del HGSJD.

Tipo de muestra	Imipenem		Total	OR	RR
	Resistente	Susceptible			
SOT	21	33	54		
URO	15	45	60	1.90	1.52
Total	36	78	114		

SOT (secreción orotraqueal); URO (urocultivo).

De los 21 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem obtenidos de las secreciones orotraqueales 13 corresponden a pacientes que se encontraban en el intensivo del HGSJD (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem entre el tipo muestra de donde se obtuvieron y el servicio del HGSJD.

	Servicio		Total	OR	RR
	Intensivo	No Intensivo			
SOT	13	8	21		
URO	1	14	15	22.75	10.16
Total	14	22	36		

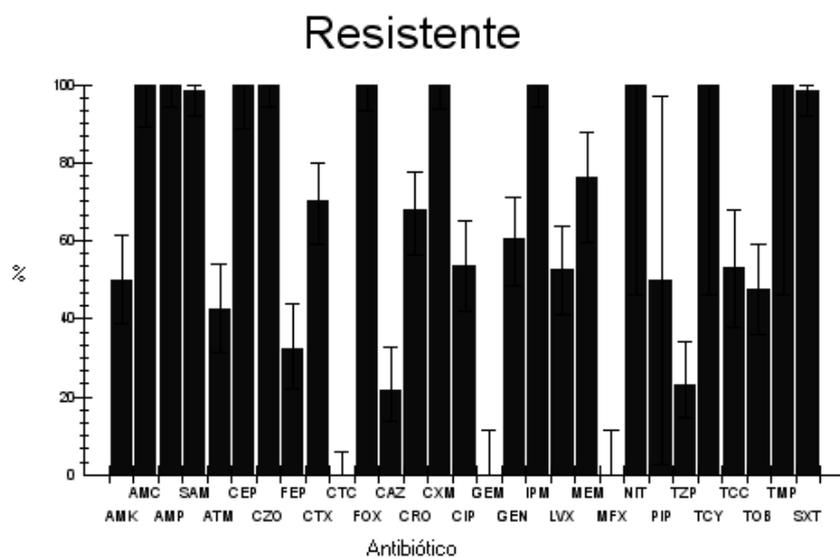
SOT (secreción orotraqueal); URO (urocultivo).

Todos los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* no productores de metaloenzimas fueron resistentes a amoxicilina/ácido cluvulánico y Nitrofurantoina (Tabla 7; Gráfica 1).

Tabla 7. Porcentaje de resistencia de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes ATB

Antibiótico	Aislamientos	Porcentaje de Resistencia
Gatifloxacina	0	0
Ceftazidima	16	21
Cefepime	25	32
Aztreonam	33	42
Tobramicina	37	48
Amikacina	39	50
Levofloxacina	40	52
Ciprofloxacina	41	53
Gentamicina	47	60
Ceftriaxona	53	68
Cefotaxima	55	70
Meropenem	59	76
Ampicilina/sulbactam	77	99
Amoxicilina/ácido clavulanico	78	100
Nitrofurantoina	78	100

Gráfica 1. Porcentaje de resistencia de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes ATB



Todos los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* no productores de metaloenzimas fueron susceptibles a Moxifloxacina, la cual es una fluoroquinolona utilizada para combatir infecciones nosocomiales (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de susceptibilidad de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiótico	% de susceptibilidad
Moxifloxacina	100
Piperaciliana/Tazobactam	77
Ceftazidima	67
Piperacilina	50
Tobramicina	51
Tiarcilina/ac.clavulanico	47
Cefepime	45
Amicacina	45
Levofloxacina	45
Ciprofloxacina	42
Aztreonam	31
Gentamicina	26

VIII. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado un incremento progresivo en la incidencia de cepas resistentes a diversos antibióticos de última generación, tales como Imipenem, así como de cepas que presentan una sensibilidad disminuida simultáneamente a diversos grupos de antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y aminoglicósidos. Esta situación ha agravado notablemente la dificultad terapéutica, como en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, cuyos patrones de resistencia han aumentado de forma alarmante en la actualidad (1,2). Reportes provenientes de estudios de América Latina evidencian esta situación (67, 68,69). En Guatemala, los resultados obtenidos con este estudio mostraron que esta situación también se está dando en el Hospital General San Juan de Dios, ya que se observó que de 362 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recolectados de febrero a mayo de 2008, 78 (22%) fueron resistentes a Imipenem (1).

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo que utiliza varios mecanismos de resistencia para poder adaptarse y sobrevivir (1). En este estudio la resistencia a Imipenem no se debió a metaloenzimas (ya que no se encontraron). Sin embargo, esto puede indicar que la resistencia a carbapenemes de dichos aislamientos, puede ser debida a expulsión activa, o bien la modificación de PBPs o por alteraciones de la permeabilidad. Estos mecanismos provocan una disminución de la porina oprD (66) la cual es utilizada por los carbapenemes para ingresar a la célula bacteriana (2).

El hecho que los servicios UCPI, UCIN y UCC del Hospital General San Juan de Dios fueran los más afectados por *Pseudomonas aeruginosa*, se debió a que los pacientes manejados en estos servicios, tuvieron mayor susceptibilidad de infección, considerando su necesidad de procedimientos invasivos (sonda gástrica, intubación orotraqueal, catéteres intravasculares, sonda vesical), uso de múltiples antibióticos, estancias prolongadas y enfermedades crónicas (72), factores facilitan la colonización de esta bacteria (70).

Por otro lado, hay otras situaciones específicas del paciente que comprometen los mecanismos de defensa específicos, tales como la neutropenia, la inmunosupresión y las patologías que cursan con deterioro del sistema inmunológico como el cáncer, la desnutrición y la diabetes, que también son factores de riesgo para la infección. Definitivamente, la estancia hospitalaria prolongada, especialmente en unidades de cuidado intensivo (UCPI, UCIN UCC) y la presión de selección de los antibióticos son los factores que favorecen la aparición de cepas multirresistentes. Este hecho convierte a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en un verdadero problema de salud pública, que afecta no sólo el curso de la evolución del paciente, sino que aumenta la estancia hospitalaria, el uso de antibióticos y por ende los costos de los servicios de salud (1,2).

Los pacientes que no se encontraron hospitalizados en los servicios UCPI y UCIN, tuvieron menor riesgo de adquirir una infección nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Imipenem, comparado con los pacientes que se encontraban en ellos (OR= 0.1; RR = 0.65). Esto probablemente se debió a que varios de los pacientes que al momento del estudio estaban ingresados en la UCPI provenían de la UCI. Esto no significa que el estado de salud del paciente fuera mejor, sino que el traslado se debió a que el número de camas de la UCI no es suficiente. Desafortunadamente, la sobrepoblación de pacientes en la UCPI conlleva un recargo de trabajo en el personal de salud, que favorecen la contaminación y que no se tengan las medidas higiénicas apropiadas.

Por otro parte, UCIN es el segundo servicio de donde se aisló mayor cantidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem. Esta una de las áreas más críticas dentro del Hospital, ya que alberga niños con muchos factores de riesgo tales como bajo peso al nacer, inmunosupresión y exposición a procedimientos invasivos, así como una larga estancia hospitalaria, lo que provoca la adquisición de infecciones nosocomiales. La frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* ha aumentado en estos últimos años, entre otras cosas como resultado de la supervivencia de niños con bajo peso al nacer (75).

Otras causas de contaminación puede ser el número de pacientes, que supera la capacidad de la unidad, la no disponibilidad de áreas separadas y aisladas, así como la falta de personal de apoyo específico para cada unidad (terapistas, enfermeras, auxiliares), lo que provoca que se ponga en aprietos la atención en estas unidades, ya que el mismo personal de enfermería tiene que migrar permanentemente por todas las áreas del hospital, diseminando y rescatando microorganismos entre paciente y paciente.

La asociación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem entre el tipo de muestra de donde fueron aisladas y el servicio de donde se obtuvieron dichos aislamientos, indicó que los pacientes que no están en la UCPI Y UCIN tienen menor riesgo de contraer *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Imipenem, que los pacientes que se encuentran en área de intensivo (OR= 22.75; RR = 10.16).

El tener conocimiento de las muestras que poseen la mayor cantidad de resistencia a Imipenem, permite saber que las infecciones a nivel sanguíneo y urinario deben ser tratadas cuidadosamente cuando se utilicen carbapenemes, para evitar la inducción de metaloenzimas, llevando un monitoreo constante en el tratamiento de estos pacientes y principalmente si la causa de la infección es *Pseudomonas aeruginosa* (74).

El hecho que los aislamientos resistentes a Imipenem obtenidos de secreción orotraqueal, urocultivos y hemocultivos tuvieron más riesgo de que se les detectara *Pseudomonas aeruginosa* (OR = 1.90; RR = 1.52), puede asociarse a que las secreciones orotraqueales provenían de pacientes entubados, lo cual implica un proceso invasivo que quizá aumente el riesgo de adquirir *Pseudomonas aeruginosa*. En el caso de los urocultivos quizá provengan de pacientes con catéteres o sondas, los cuales también favorecen el crecimiento de esta bacteria por ser muy húmedos y por el largo tiempo que los pacientes los usan, formándose dentro de estos una especie de biofilm que aprovecha la *Pseudomonas aeruginosa* para adaptarse y sobrevivir (7).

En síntesis, se puede decir que el factor que tuvo mayor asociación con la infección nosocomial por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem, fue el tubo orotraqueal, el cual se colocó a todos los pacientes al ingresar al área de cuidados intensivos. La falta de personal de enfermería en la sala para atender la demanda, acompañada del hacinamiento que se maneja diariamente, se convierten en factores de riesgo para cualquier tipo de infección que se presente en una sala de cuidado intensivo. El tubo orotraqueal, provee un hábitat en el cual se desarrolla *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente cuando se reutilizan las sondas, para aspirar las secreciones de los pacientes entubados, ya que muchas veces solo se desinfectan pero no se esterilizan. También puede deberse a que la sonda se pase de un paciente a otro, propagando de esta manera un brote en la sala de cuidados progresivos intensivos. Lastimosamente no se sabe con certeza cual es el principal elemento que contribuye directamente con la aparición de cepas multirresistentes (74).

Los perfiles de resistencia indicaron que *Pseudomonas aeruginosa* es resistente a 12 antimicrobianos administrados en el Hospital General San Juan de Dios, tal es el caso de las aminopenicilinas (amoxicilina, ampicilina) cuya resistencia es intrínseca en bacilos gram negativo, tales como *Klebsiella* spp, *Acinetobacter* spp, *Serratia* spp, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a esto ha disminuido su actividad clínica, por lo que deben asociarse a inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico o sulbactam). La cefoxitina (cefamicina) también presenta elevada resistencia. Dicho antimicrobiano no es muy recomendable en procesos graves y en cuadros de adquisición nosocomial. Con respecto a los carbapenemes, la resistencia a Imipenem en este estudio, no implica necesariamente la resistencia a Meropenem (72).

Algunos de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* evaluados fueron sensibles a varios antibióticos, tal es el caso de la ceftazidima que tiene una excelente actividad antipseudomónica, por su poca afinidad a las betalactamasas y su baja capacidad de inducción. Sin embargo su uso inadecuado está favoreciendo la proliferación de importantes mecanismos de resistencia (66).

Por otro lado, todos los aislamientos en estudio, fueron sensibles a Moxifloxacina (fluoroquinolona). Las fluoroquinolonas de 1ra, 2da y 3ra generación actúan uniéndose a enzimas involucradas en la replicación del ADN, incluyendo la girasa y la topoisomerasa. Sin embargo la moxifloxacina es una fluoroquinolona de cuarta generación que se une a sitios moleculares distintos a las enzimas anteriormente mencionadas, disminuyendo así la resistencia cruzada. Asimismo esta quinolona tiene una absorción rápida y completa en el tracto gastrointestinal, sin embargo la distribución es más alta en muchos tejidos que en el suero, particularmente en mucosa bronquial, parénquima pulmonar, mucosa sinusal, por lo que se asocia su eficacia en los pacientes entubados o con algún tipo de sonda (75).

Debido a la severidad de las infecciones provocadas por esta bacteria, resulta necesario instaurar un tratamiento con antimicrobianos que posean alto nivel de eficacia, dentro de los cuales aparece como alternativa la combinación de un betalactámico con un inhibidor de betalactamasas como es el caso de Piperacilina/Tazobactam. En el presente estudio, se ha encontrado un alto nivel de susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* (77%) frente a la droga ensayada en coincidencia con lo informado por otros autores. Por ejemplo, en un estudio realizado en España, se encontró un 7% de resistencia mientras que para antimicrobianos de uso frecuente se hallaron porcentajes de resistencia más elevados: ciprofloxacina (23%), gentamicina (31%) y ceftazidima (15%). La resistencia de *P. aeruginosa* frente a Piperacilina/tazobactam, puede surgir como consecuencia de la exposición previa a múltiples antimicrobianos. (76). En otros estudios se halló que se obtenían mejores resultados clínicos cuando se realizaban tratamientos con Piperacilina/tazobactam en combinación con un aminoglucósido como gentamicina o amikacina. (77)

El porcentaje de sensibilidad del Aztreonam fue de 35%. Este antibiótico es poco inductor de betalactamasas y tiene una actividad semejante o superior a la de los aminoglucósidos y cefalosporinas de 3ra y 4ta generación. El Aztreonam puede tener una actividad sinérgica con cefepime, mejorando la actividad de esta cefalosporina frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Aztreonam

es el tratamiento de elección cuando una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* es productora de metaloenzimas) (37). El aztreonam actúa inhibiendo a las cefalosporinas extracelulares, por lo que no se recomienda asociarlo con cefoxitina, ni carbapenémicos debido a la capacidad de estos para inducir betalactamasas cromosómicas en *Pseudomonas aeruginosa* (66).

Existen otros antibióticos a los cuales *Pseudomonas aeruginosa* es sensible, pero en un porcentaje menor, por lo que no se utilizan con mucha frecuencia, algunas veces porque en los servicios de salud se carece de ellos, pero que podrían ser una alternativa de tratamiento, tal es el caso de la tobramicina, que posee un espectro de actividad similar al de la gentamicina y son especialmente activas en enfermedades pulmonares.

A pesar de que estas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son resistentes a Imipenem, este antibiótico puede asociarse con un aminoglucósido y presentar diversos grados de sinergismo. En *Pseudomonas aeruginosa* se ha observado sinergismo entre Imipenem y Ciprofloxacina (66).

Como aporte de esta investigación se puede resaltar que el Hospital General San Juan de Dios es un lugar propicio para que se seleccionen cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que pueden ser consideradas como multirresistentes, ya que los aislamientos obtenidos corresponden a un período de 3 meses. Los antibióticos probados en el estudio incluyeron a aquellos como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, tanto como carbapenemes, encontrando un buen número de cepas que resultaron resistentes a dichos antibióticos que son considerados como de elección, para los procesos infecciosos de mayor riesgo. Por lo tanto se indica la necesidad de mejorar las políticas de uso de los antibióticos en los hospitales y así coadyuvar en las medidas de control aplicables a las infecciones intrahospitalarias.

Dentro de las limitaciones del estudio se pueden mencionar que no hay estudios anteriores de este tipo en el país, por lo que se recomienda continuar haciendo estudios de detección de metaloenzimas en el Hospital General San Juan de Dios para tener una vigilancia epidemiológica y así evitar que en un futuro este mecanismo predomine en las cepas que se aislen del hospital, y de esta manera no comprometer la eficacia de los carbapenemes y acortar su uso en el tratamiento de infecciones nosocomiales.

Finalmente, la prevalencia y la detección de metaloenzimas responsables de la resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* es diferente en cada región del mundo (37,45,72). El monitoreo de cepas productoras de metaloenzimas en el Hospital General San Juan de Dios, ayudará a la predicción de fenotipos de resistencia, relacionados con este mecanismo y contribuirá al conocimiento sobre la evolución de las metaloenzimas. Así, si en el futuro llegaran a aparecer metaloenzimas en Guatemala sería interesante identificar el gen y el mecanismo que las está haciendo resistentes a los carbapenemes.

IX. CONCLUSIONES

1. En los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem aislados en el Hospital General San Juan de Dios, no se encontraron metaloenzimas.
2. Los tipos de muestra con mayor número de aislamientos resistentes a Imipenem fueron secreción orotraqueal, seguida de urocultivos y hemocultivos.
3. La Unidad de cuidados progresivos intensivos (UCPI), fue el servicio del Hospital General San Juan de Dios de donde se obtuvo mayor número de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem.

X. RECOMENDACIONES

1. Determinar la presencia de metaloenzimas utilizando como agente quelante el ácido 2-mercaptopropiónico y comparar resultados con el método de EDTA.
2. Ajustar la distancia entre los discos en el método de doble disco sinérgico para optimizar los resultados y así mejorar su interpretación.
3. Recolectar las muestras en un período de tiempo más largo, para obtener mayor cantidad de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Imipenem y de esta manera aumentar la probabilidad de detectar cepas productoras de metaloenzimas.
4. Preparar la solución de EDTA a una concentración 0.5 M y comparar con la solución EDTA 0.1M, para poder observar la diferencia en la medida de los halos.

XI. REFERENCIAS

1. Malhotra S. *et al.* Proteome análisis of the effect of mucoid conversión on global protein expresión in *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 shows induction of the disulfide bond isomerase, DsbA. *J Bacteriol* 2000; 182:6999-7006.
2. Porrel L. *et al.* Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing Metallo- β -lactamase and Its plasmido-ahd integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Ag Chemoter* 2000; 44:891-897.
3. Forero J. Betalactamasas de espectro extendido en pediatría. Bucaramanga, Colombia. Unidad de Cuidado intensivo Pediátrico y neonatal. 1998; 24:133-138.
4. Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock Biología de los microorganismos. 10 ed. Madrid, España: Pearson Educación S.A., 2004 XXV+1011 (p. 301, 369, 370, 375, 721).
5. Sánchez A. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* *Revista Española de Quimioterapia* 2004;17:336-340.
6. Bagge N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrobiol Ag Chemother* 2004; 48:1175-1187.
7. Salso S. *et al.* Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Revista Española Quimioterapia* 2000; 40:328-333.
8. Manual y tablas NCCLS 2002. Laboratorio Nacional de la Salud, Unidad de Diagnóstico, Sección de Bacteriología, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Doc. Tec. 2002.
9. Sachie Y. Presence of *P. putida* strains harboring plasmids bearing the metallo β -lactamase gene *bla_{IMP}* in a Hospital in Japan. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1536-1538.
10. Martínez L., Pascual A. Mecanismos de resistencia a las carbapenemes en

Pseudomonas aeruginosa. 2ed. Sevilla, España: Pearson Educación S.A., 2002. XVI+1235 (p. 263, 296, 315, 357, 621).

11. 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; 45:1623-1627.
12. Lombardi G. *et al*. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Clin Microbiol* 2001; 40:4051-4055.
13. Giakkoupi P. *et al*. Spread of integron-associated VIM-type metallo-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in greek hospitals. *J Clin Microbiol* 2003; 36:4256-4260.
14. Walsh T. *et al*. Evaluation of a new E test for detecting metallo- β -lactamase in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1236-1238.
15. Chirinos J. Los mecanismos de la resistencia microbiana. *Rev Méd del C.I.E.M Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Santa María y de San Agustín, Arequipa, Perú*. 2002; 45:856-860.
16. Mella S. *et al*. Imipenem, aspectos básicos y aplicaciones clínicas. Concepción, Chile: Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. *Doc.Tec* 2000; 45-47
17. Combard G. Nosocomial infections caused by multiding resistans isolates of *P. putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Clin Microbiol* 2002; 45:1421-1425
18. Massidda, O., G. Rossolini, G. Satta. The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *J Bacteriol* 1991; 173:4611-4617.
19. Rasmussen, B. A., and K. Bush. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Ag Chemother* 1997; 41:223-232.
20. Quiroga, M. *et al*. Interaction of cefotetan and the metallo- β -lactamases produced in *Aeromonas* spp. and in vitro activity. *Chemotherapy* 2000; 46:177-183.
21. Galleni, M. *et al*. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob Ag Chemother* 2001; 45:660-663.

22. Lim, H. *et al.* Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 β -lactamase II structural gene. *J Bacteriol* 1988;170:2873-2878.
23. Chen, Y. *et al.* β -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J Bacteriol* 2003; 185:823-830.
24. Walsh, T. *et al.* Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys* 1994;1218:199-201.
25. Rossolini, G. *et al.* Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*bla*_{A_{CME}}) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob Ag Chemother* 1999;128:564-569.
26. Bellais, S. *et al.* Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Antimicrob Ag Chemother* 2000; 44:3028-3034.
27. Boschi, L. *et al.* The *Legionella (Fluoribacter) gormanii* metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. *Antimicrob Ag Chemother* 2000; 44:1538-1543.
28. Simm, A. *et al.* A novel metallo- β -lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett* 2001; 509:350-354.
29. Mammeri, H. *et al.* 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. *Antimicrob Ag Chemother* 2002; 46:3561-3567.
30. Rossolini, G. *et al.* Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob Ag Chemother* 2001; 45:837-844.
31. Naas, T. *et al.* Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing β -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:267-273.

32. Saavedra, M. *et al.* Sfh-1, a subclass B2 metallo- β -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob Ag Chemother* 2003; 47:2330-2333.
33. Walsh T. *et al.* Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Ag Chemother* 1997; 41:1460-1464.
34. Podglajen I. *et al.* Genotypic identification of two groups within the species *Bacteroides fragilis* by ribotyping and by analysis of PCR-generated fragment patterns and insertion sequence content. *J Bacteriol* 1995; 128:895-898.
35. 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.
36. Castanheira M. *et al.* Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla_{GM-1}*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Ag Chemother* 2004; 48:4654-4661.
37. Timothy R. *et al.* Metallo- β -Lactamases: the quiet before the Storm? *Clin Microbol Rev* 2005;18:306-325.
38. Bennett P. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:1-4.
39. Walsh T. *et al.* Evolution of an integron carrying *bla_{VIM-2}* in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:116-119.
40. Toleman M. *et al.* Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla_{IMP-13}*, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:583-590.
41. Toleman M. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:673-679.
42. Watanabe M. *et al.* Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas*

- aeruginosa*. Antimicrob Ag Chemother 1991; 35:147-151
43. Osano E. *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Ag Chemother 1994; 38: 71-78.
 44. Ito H. *et al.* Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Ag Chemother 1995; 39:824-829.
 45. 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 41: 5407-5413.
 46. Hirakata Y. *et al.* Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram negative rodscarrying the metallo - β -lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Ag Chemother 1998; 42:2006-2011.
 47. Yano H. *et al.* Plasmid encoded metallo - β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. Antimicrob Ag Chemother 2001; 45:1343-1348.
 48. Iyobe S. Detection of a variant metallo - β -lactamase IMP-10 from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes xylosoxidans* strain. Antimicrob Ag Chemother 2000; 46:2014-2016.
 49. Da Silva, G. *et al.* Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 2109-2110.
 50. Riccio M. *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. Antimicrob Ag Chemother 2000; 44:1229-1235.
 51. Docquier J. *et al.* IMP-12 ,a new plasmid-encoded metallo - β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. Antimicrob Ag Chemother 2003; 47:1522-1528.
 52. Chu y. *et al.* IMP-4 a novel encoded metallo - β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter spp.* Collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob Ag Chemother 2001; 45:710-714.

53. Ho S. *et al.* Carbapenem -resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia producing IMP-7 - β -lactamase . *Antimicrob Ag Chemother* 2002; 46:3286-3287.
54. Lauretti L. *et al.* cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo - β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Ag Chemother* 1999; 43:1584-1590.
55. Yan J. *et al.* Metallo - β -lactamase in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Ag Chemother* 2001; 45:2224-2228.
56. Lee K. *et al.* VIM-and IMP type betalactamasas producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp in Korean Hospitals. *J Microbiol* 2003; 9:235-239.
57. K. *et al.* Evaluation of the Hodge test and the imipenem EDTA double disk synergy test for differentiating Metallo b-lactamas producing isolates of *Pseudomonas sp.* and *Acinetobacter sp.* *J Clin Microbiol* 2003; 45:568-571.
58. Young D. *et al.* Imipenem-EDTA disk method for differentiation of Metallo b-lactamas producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol* 2002: 26:54-58.
59. Dayne D. *et al.* Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitor of Metallo- β -lactamases. *Antimicrobial Ag Chemother* 2002; 46:880-1886.
60. Kaim W. Schwerderski, B. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Live* 1995;17:89-95.
61. Lagatolla C. *et al.* Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired Metallo b-lactamasas determinants in European hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 56:89-98.
62. Arakawa Y. *et al.* Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 1999; 12:256-275.
63. Sánchez A. *et al.* Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimioter* 2004; 17:336-340.

64. Garcia P. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in Vitro Rev Chil Infect 2002; 19:96-100
65. Jordá. L. *et al.* Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad Microbiana. Bioquím Clin 2005; 39:19-25.
66. Solórzano A. Betalactamasa de espectro extendido en nuestro medio: Aportaciones científicas. D L-Gr 2007:3-26
67. Andrade S. *et al.* Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance J. Antimicrob Chemother. 2003; 52: 40-141.
68. Bantar C. *et al.* Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. The Antimicrobial Committee; and the National Surveillance Program (SIR) Participants Group Int J Infect Dis 2000; 4: 85-90.
69. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Informe Anual Regional de los Países Participantes en la Red de Monitoreo / Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. SantaCruz de la Sierra, Bolivia. 2002; 17-19.
- 70 Carmeli Y. *et al.* Emergence of Antibiotic- Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risk Associated with Different Antipseudomonal Agent. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1379-1382.
71. Andrade. V. Emergencia de la Resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* productora de Metalo b-lactamasa. Bioquímica 2005; 30:53-58.
72. Yomayusa N. *et al.* Characterization o fan outbreak infection caused by *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in Bogotá, Colombia. Asoc Col Infec 2008; 12: 11-20.
73. González M. *et al.* Determinación de Factores de Riesgo Intrahospitalario en un Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en la sala de CIREN, Hospital Universitario del Valle, Cali Colombia Médica 2000; 31:3-14
74. Wenzel R. *et al.* Identification of procedure-related nosocomial infections in

- highrisk patients. *Rev Infect Dis* 1981; 3:1019-1038
75. Prado V. *et al.* Actividad comparativa in Vitro de moxifloxacina y otros antibióticos frente a patógenos respiratorios. *Rev Med Chile* 2000;128:481-489.
76. Harris A. *et al.* Risk factors for Piperacilin-Tazobactam resistant *Pseudomona aeruginosa* among hospitalizes patients. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 2002, 46: 854-858
77. Klepser M- *et al.* Comparison of the bactericidal activities of Piperacilin-Tazobactam, Ticarcilin-Clavulanate, Ampicilin-Sulbactam against Clinical isolates of *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomona aeruginosa*. *Antimicrob Agents chemother* 1997, 41: 435-439

IX. ANEXOS

Anexo 1. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana (7,18).

Clases de antibiótico	Subclases de antibiótico	Nombre genérico		
Penicilinas	Penicilinas	Penicilina		
	Aminopenicilinas	Amoxicilina Ampicilina		
	Ureidopenicilinas	Azlocilina Mezlocilina Piperacilina		
	Carboxipenicilinas	Carbencilina Ticarcilina		
	Penicilinas estables frente a penicilinasas	Cloxacilina Dicloxacilina Meticilina Nafcilina Oxacilina		
	Amidinopenicilinas	Mecilinam		
	Cefalosporinas (Parenteral)	Cefalosporinas de 1ra. Generación	Cefazolina Cefalotina Cefapirina Cefradina	
		Cefalosporinas de 2da. Generación	Cefamandol Cefonicida Cefuroxime (sódico)	
		Cefalosporinas de 3ra. Generación	Cefoperazona Cefotaxime Ceftazidima Ceftizoxime Ceftriaxona	
		Cefalosporinas de 4ta. Generación	Cefepime	
Cefamicinas		Cefmetazol Cefotetan Cefoxitin		
Oxacefalosporinas		Moxalactam		
Cefalosporinas (Oral)		Cefalosporinas	Cefaclor Cefadroxil Cefdinir Cefditoren Cefetamet Cefixime Cefpodoxime Cefprozil Ceftibuten Cefuroxime (axetilico) Cefalexina Cefradina	
		Carbacefalosporinas	Loracarbef	
		Carbapenemes		Ertapenem Imipenem Meropenem
			Monobactames	Aztreonam

Anexo 2. Antimicrobianos que alteran la membrana celular (7,18).

Clases de antibiótico	Subclases de antibiótico	Nombre genérico
Polimixinas		Polimixina B

Anexo 3. Antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica (7,18).

Clases de antibiótico	Subclases de antibiótico	Nombre genérico
Nitroaromáticos	Fenicoles	Cloranfenicol
Aminoglucósidos		Amikacina Gentamicina Kanamicina Netilmicina Estreptomicina Tobramicina
Tetraciclinas		Tetraciclina Minociclina Doxiciclina Clortetraciclina
Macrólidos		Eritromicina Azitromicina Claritromicina Diritrominicina
Lincomicinas		Lincomicina Clindamicina

Anexo 4. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos (7,18).

Clases de antibiótico	Subclases de antibiótico	Nombre genérico
Quinolonas	Quinolonas	Cinoxacina
		Garenoxacina
		Acido nalidixico
	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina
		Clinafloxacina
		Enoxacina
		Fleroxacina
		Gatifloxacina
		Gemifloxacina
		Grepafloxacina
		Levofloxacina
		Lomefloxacina
		Moxifloxacina
		Norfloxacina
		Ofloxacina
		Esparfloxacina
		Trovafloxacina
		Rifamicinas
Sulfonamidas	Sulfanilamida	

Anexo 5. Origen de los genes *bla_{IMP}* (37).

Tipo de metaloenzima	Bacteria	Origen	Integrón
IMP-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japón	Clase 1
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japón	Clase 3
	<i>Serratia marcescens</i>	Japón	Clase 3
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Corea	?
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singapur	?
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Japón	Clase 1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japón	Clase 3
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Japón	Clase 3
	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	Japón	Clase 1
	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	Japón	Clase 1
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Japón	?
	<i>Citrobacter freundii</i>	Japón	Clase 1
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Japón	Clase 1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Japón	?
	<i>Escherichia coli</i>	Japón	Clase 1
	<i>Proteus vulgaris</i>	Japón	Clase 1
	<i>Providencia rettgeri</i>	Japón	Clase 1
	<i>Acinetobacter spp.</i>	Japón	?
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Inglaterra	Clase 1
	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	Japón	Clase 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japón	Clase 1	
<i>Shigella flexneri</i>	Japón	Clase 1	
IMP-3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japón	Clase 1
IMP-4	<i>Citrobacter freundii</i>	Hong Kong	Clase 1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	China	Clase 1
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Brasil	?
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japón	Clase 1
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Malasia	Clase 1
IMP-8	<i>Enterobacter cloacae</i>	Taiwán	Clase 1
IMP-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japón	Clase 1
IMP-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japón	Clase 1
IMP-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japón	?
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Italia	Clase 1
IMP-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	?
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	U.S.A	Clase 1
IMP-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		?

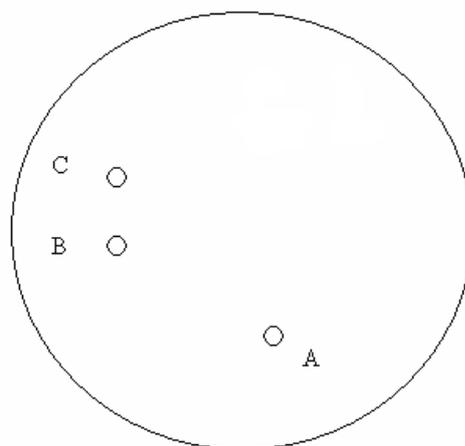
Anexo 6. Origen de los genes *bla_{VIM}* (37).

Tipo de metaloenzima	Bacteria	Origen	Presencia de Integrón
VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italia	+
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Italia	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	Italia	+
	<i>Escherichia coli</i>	Grecia	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grecia	+
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Francia	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Corea	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Corea	+
	<i>Serratia marcescens</i>	Corea	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	Corea	?
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Chile	+
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Taiwán	?
	<i>Acinetobacter</i> genomosp. 3	Corea	+
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Japón	+
<i>Citrobacter freundii</i>	Taiwán	?	
VIM-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Taiwán	?
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Polonia	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Italia	?
VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Italia	?
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turquía	+
VIM-6	<i>Pseudomonas putida</i>	Turquía	+
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	USA	+
VIM-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colombia	?
VIM-10	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	Reino Unido	?
VIM-11a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reino Unido	?
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Argentina	?

Anexo 7. Preparación de estándar de McFarland 0.5

- Seleccionar 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo. Preparar una suspensión en 5 ml de caldo Trypticasa soya tocando la parte superior de cada colonia.
- Se incuba a 35°C hasta que éste alcance la turbidez del estándar (2-6 horas).
- Ajustar la turbidez del inóculo con caldo hasta el tubo 0.5 de la escala de McFarland, por comparación visual con el estándar. Para ello, ver los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Para confirmar la turbidez del inóculo debe medirse fotométricamente.

Anexo 8. Forma establecida para colocación de taxos en Mueller- Hinton



A = Imipenem + EDTA 0.1M

B = EDTA 0.1M

C = Imipenem