

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

Determinación de Metaloenzimas Como Mecanismos de Resistencia en Aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* Multirresistentes Referidas al Laboratorio Nacional de Salud



Informe de Tesis

Presentado por

Patricia Espinoza Ramírez

Para optar al Título de

Química - Bióloga

Guatemala, Noviembre del 2010

I. RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas en la terapéutica actual por lo que el conocer los mecanismos de resistencia que se encuentran en las bacterias que prevalecen en el medio guatemalteco como lo son *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.*, es importante para encontrar las medidas adecuadas en el control y prevención de este problema.

En este estudio se determinó la presencia de metaloenzimas como mecanismo de resistencia en aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.*, provenientes del banco de cepas multirresistentes del Laboratorio Nacional de Salud, recolectadas en el Hospital Roosevelt de Guatemala, referidas de enero a julio del 2007.

La presencia de metaloenzima se determinó utilizando la técnica de difusión en disco, en donde se buscó alguna deformación del halo de inhibición en las zonas donde el disco de EDTA 0.5M y carbapenemes mostraba sinergia. Para el análisis se revisaron el tipo y los servicios de donde provenían las muestras. Además, se relacionó la presencia de metaloenzimas con la resistencia a otras familias de antibióticos, utilizando el programa WHONET.

5.4

Se analizaron un total de 95 aislamientos, de estos 29 fueron de *Pseudomonas sp.* y 66 de *Acinetobacter sp.*. El estudio reveló que 65.5% (n=19) cepas de *Pseudomonas sp.* evidenciaron la presencia de metaloenzima mientras que 33.3% (n=22) cepas de *Acinetobacter sp.* también lo mostraron. Los principales tipos de muestras donde se encontró la metaloenzimas fueron aspirado traqueal y secreciones. Los servicios en donde se aislaron con más frecuencia los microorganismos con metaloenzima fueron las unidades de cuidados intensivos tanto pediátricos como de adulto.

La resistencia a otras familias de antibióticos en las cepas de *Pseudomonas sp.* con presencia de metaloenzima (n=19) mostró a cefepime con menor resistencia (31.2%) que ceftazidima (56.2%), no así en las cepas de *Acinetobacter sp.* . La presencia de metaloenzima fue más frecuente en cepas con resistencia a ambos carbapenemes con 84% para *Pseudomonas sp.* y 63.3% para *Acinetobacter sp.*

Este estudio muestra la presencia de metaloenzima como mecanismo de resistencia tanto en *Pseudomonas sp.* como *Acinetobacter sp.*, lo que resalta la importancia de su búsqueda y tamizaje en el laboratorio, ya que el presentar metaloenzima implica que el laboratorio no recomiende al médico el utilizar los carbapenemes como tratamiento, ya que el hacerlo implicaría un problema terapéutico y epidemiológico, incrementando la estancia del paciente hospitalizado y tasa de mortalidad asociada (3,4).

II. INTRODUCCION

La resistencia de las bacterias a los antibióticos representa uno de los principales problemas de la población en lo referente a salud pública y a la práctica clínica. Esto es debido al incesante incremento en el uso de antibióticos durante los últimos años, además de que las bacterias resistentes a los antibióticos se han propagado de forma abrumadora (1). Los microorganismos Gram negativo ocupan el primer lugar en el mundo como responsables de las infecciones intrahospitalarias. Dentro del grupo de bacilos Gram negativo no fermentadores (BNF) más frecuentemente aislados, de muestras clínicas de infecciones intrahospitalarias, se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter sp.* (1-4).

El principal mecanismo de resistencia es la producción de betalactamasas codificadas cromosómicamente o por plásmidos, dichos mecanismos pueden transmitirse entre ellas o a otras bacterias Gram negativo. Debido al gran incremento en la resistencia, cada vez se utilizan más antibióticos de amplio espectro como los carbapenemes principalmente para este tipo de cepas (2,5,8).

Por el momento las carbapenemasas no se encuentran muy extendidas, pero constituyen un mecanismo de resistencia importante debido a que están localizadas en elementos móviles, los integrones de clase I y tienen una transmisión horizontal. Siendo las metaloenzimas un tipo de carbapenemasa de gran importancia por la elevada capacidad de resistencia a los carbapenemes en este tipo de cepa; sin embargo la detección de este tipo de mecanismos de resistencia no se realiza rutinariamente debido al desconocimiento de la presencia de dicho mecanismo, así como la falta de capacitación para detectarlo en el laboratorio (2,4,6,7) .

La existencia de metaloenzimas como mecanismos de resistencia implica que las bacterias deben reportarse resistentes a todos los carbapenemes, aunque presenten aparente susceptibilidad a alguno de estos antibióticos *in vitro* ya que al no realizarse la identificación de los mismos podría dar como

resultado fallo en el tratamiento de la diversidad de padecimientos clínicos en que estas bacterias pueden estar involucradas (2,6,7).

Por lo anterior esta investigación tuvo como principal objetivo identificar las metaloenzimas presentes en 95 aislamientos de *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter sp* referidos al Laboratorio Nacional de Salud en el año 2007. Al demostrar la presencia de metaloenzimas en cepas multirresistentes del país, se podrá establecer la necesidad de implementar su determinación de rutina en aislamientos de infecciones intrahospitalarias nacionales y así evitar que la aparente susceptibilidad *in vitro*, cause una falla terapéutica *in vivo*. (3,4).

III. ANTECEDENTES

A. Bacilos Gram negativo no fermentadores

1. Características generales

Dentro del grupo bacilos Gram negativo no fermentadores (BNF), se encuentran muchos géneros y especies, pero los más frecuentemente aislados de muestra clínicas, son *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter sp.* El reservorio de estos microorganismos se encuentra en el medio ambiente y en múltiples fuentes (suelo, agua, plantas, animales) y raramente forman parte de la flora humana normal (9,13,14).

Se conoce como grupo de BNF porque su actividad enzimática es manifestada pobremente, bioquímicamente oxidan los azúcares, pero no los fermentan, y son oxidasa positivo (9,13,14).

a. Morfología

Los bacilos Gram negativo no fermentadores (BNF) se definen como aerobios, con extremidades redondeadas; pueden ser móviles por flagelos polares o inmóviles (9,13,14).

b. Patogenicidad

Los bacilos Gram negativo no fermentadores (BNF) son saprófitos en la naturaleza y sólo afectan a inmunosuprimidos. Es más manifiesta su actividad sobre las proteínas, por lo que se encuentran complicando las heridas (9,13,14).

2. *Pseudomonas sp*

a. Generalidades

Pseudomonas sp es un patógeno preferentemente de infecciones intrahospitalarias causante de importantes infecciones particularmente en unidades de terapia intensiva, donde constituye la causa más común de neumonía asociada a ventilación mecánica, y también asociadas a pacientes oncológicos(3,12).

La *Pseudomonas sp* es un microorganismo versátil, ampliamente distribuido en el suelo, agua, plantas e intestino de animales. Puede causar enfermedad en el hombre, ciertos animales, plantas e insectos. El agua contaminada puede ser una fuente de infección para el hombre. (6,12).

b. *Pseudomonas aeruginosa*

La *P. aeruginosa* es susceptible a la desecación, pero sus habilidades metabólicas le permiten sobrevivir y multiplicarse en líquidos y ambientes húmedos de los hospitales. Los requerimientos nutricionales de esta bacteria son variados y se ha aislado en ambientes hospitalarios principalmente, incluso de soluciones desinfectantes en el hospital (6,12).

La mayoría de las infecciones humanas están restringidas a los pacientes hospitalizados que adquieren el microorganismo de fuentes ambientales (infección exógena) por contacto con vectores humanos o inanimados. *P. aeruginosa* se desarrolla bien en medios simples, utilizándose para su aislamiento los medios de cultivo de uso corriente en el laboratorio clínico (3,6).

La mayoría de *P. aeruginosa* se identifican por la producción de un pigmento, pyocyanina, soluble en agua, azul, no fluorescente. Produce además otro pigmento, pyoverdina, soluble en agua, verde amarillento, fluorescente. Otros pigmentos, menos frecuentes pueden ser producidos por la misma. La morfología colonial y el olor frutado de aminoacetofenona son elementos de una identificación sencilla, existiendo caracteres de identificación confirmatorios que son poco utilizados (6,12,14).

P. aeruginosa son bacilos Gram negativo, oxidasa y catalasa positivas, aerobias estrictas, no fermentan glucosa, utilizan diversos azúcares oxidativamente con producción de ácido. Uno de los caracteres más constantes es su capacidad de desarrollarse a 42°C (3,6,14).

c. Patogenia

Las defensas inespecíficas del huésped son en general suficientes para prevenir la infección por *P. aeruginosa*, pero brechas en esta barrera le permiten a invadir y causar infecciones de diversa gravedad.

Esta bacteria posee los mismos tipos de factores de virulencia que otras bacterias capaces de causar enfermedad en el hombre inmunocompetente. Es probable que *P. aeruginosa* sea ineficiente en su habilidad para llevar a cabo los primeros pasos de la infección; puede colonizar pero no invadir piel y mucosas sanas y tampoco dar infecciones persistentes con producción concomitante de factores tóxicos que dañen los tejidos del huésped (6,12,14).

P. aeruginosa es capaz de unirse a la mucina y lo hace por medio de las adhesinas no pili. Además del gen que codifica para la proteína estructural del pili otros genes codifican proteínas ensambladoras y reguladoras (3).

Dentro de los factores de virulencia se encuentran la producción de exoenzima y exotoxinas:

Exoenzima S: Tiene actividad de ADPribosilación como otras toxinas, pero aplicada en forma exógena no daña las células del huésped. Al igual que la toxina colérica intervienen proteínas de las células del huésped en la activación de la toxina para lograr su máxima actividad. Se sostiene que actuaría dificultando la acción de los fagocitos lo que facilitaría la supervivencia de *P. aeruginosa* en el torrente sanguíneo y órganos. En el pulmón actuaría inhibiendo la muerte intrafagocítica de las bacterias y promoviendo la infiltración fagocítica en el área.

Exotoxina A: Esta exotoxina tiene el mismo mecanismo que la toxina diftérica. Es una toxina A-B con tres unidades funcionales: dominio R (región de unión al receptor celular), dominio T (región que media la translocación de la porción enzimática al interior de la célula), dominio C (región catalítica). Los dominios R y T se localizan en la cadena B y el dominio C en la cadena A (3,12,14).

d. Epidemiología

Las *P. aeruginosa* son de distribución mundial, se aísla de suelos, agua, plantas, animales incluyendo al hombre, algunas veces es patógeno para animales y vegetales, La epidemiología de *P. aeruginosa* refleja su predilección por un medio ambiente húmedo, esto es evidente ya que su ambiente natural está relacionado con agua y suelo (6).

La colonización humana ocurre en sitios húmedos como el perineo, axilas y oídos, la humedad es un factor crítico en los hospitales, reservorios: equipos de ventilación mecánica, soluciones de limpieza, medicamentos, desinfectantes, etc. Enfermedad humana extrahospitalaria también se asocia a ambientes húmedos: piscinas, soluciones para lentes de contacto etc. Pacientes con quemaduras serias: piel; pacientes ventilados; tubo digestivo:

antibióticos; quimioterapias. Es fundamentalmente un patógeno nosocomial, ocupa el 4º lugar en frecuencia (12).

e. Manifestaciones Clínicas

Produce infección en heridas y quemaduras, pus de color azul verdoso. Infección del aparato respiratorio como neumonía necrotizante, en diabetes: otitis externa invasora (maligna). Infección al ojo: destrucción rápida del órgano, procedimientos o lesiones quirúrgicas. Lactantes o personas debilitadas: torrente sanguíneo, septicemia, Septicemia: necrosis hemorrágica de la piel “ectima gangrenoso”, rodeado por eritema y con frecuencia no contiene pus (12,14).

3. *Acinetobacter sp*

a. Generalidades

Acinetobacter sp puede provocar infecciones purulentas en casi cualquier órgano del cuerpo. y si bien estas bacterias se consideran oportunistas en el ámbito hospitalario, hay cada vez más casos de infecciones adquiridas en la comunidad. En la década de 1970 estas infecciones se trataban con ampicilina y cefalosporinas de segunda generación, pero estas opciones terapéuticas dejaron de ser válidas hace ya varios años (2,3,5).

La selección de un tratamiento antibiótico empírico debe basarse en el conocimiento de los agentes etiológicos más frecuentes y en sus patrones de susceptibilidad antimicrobiana. En los últimos años, se han descrito casos de multiresistencia a todos los antibióticos disponibles, por lo que ha motivado la realización de estudios con el objeto de obtener datos sobre su susceptibilidad, aunque los patrones, pueden presentar variaciones geográficas, e incluso pueden variar entre hospitales de una misma región en función de las características de la población y del uso de los antibióticos (5,10).

Acinetobacter sp son saprofitos ubicuos, BGN de baja virulencia son causa de infección nosocomial y adquiridas en la comunidad. Los avances en la inmunosupresión así como uso frecuente de técnicas invasivas han permitido a ésta, superar a bacterias Gram positiva como principales causantes de morbilidad nosocomial (2,10).

Esta bacteria está ampliamente distribuida en el agua y en el suelo, ocasionalmente pueden cultivarse de fuentes humanas: esputos, orina, heces, secreciones vaginales. Es el microorganismo más común transportado por el personal intrahospitalario, coloniza el 45% de sitios de traqueostomía de pacientes internados (2,10).

Tratamiento

Combinación efectiva de un β -lactámico (piperacilina, ticarcilina, ceftazidima) y un aminoglucósido. Antibiótico β -lactámico asociados a inhibidores: ampicilina-sulbactam, carbapenémicos: imipenem, meropenem (10).

b. Patogenia

Ausencia de factores de virulencia, reduce su papel a patógeno oportunista, su crecimiento a pH ácido con temperaturas más bajas puede aumentar capacidad para invadir tejidos desvitalizados. No tiene capacidad de producir citotoxinas, salvo lipopolisacaridos (LPS) (10).

Posee cápsula que inhibe fagocitosis y ayuda a la adhesión local pero si produce bacteriocinas y así globalmente, sin alteración de las defensas normales del huésped, su papel sería limitado (10,11).

c. Epidemiología

La localización más frecuente en infecciones intrahospitalarias son las respiratorias en la unidad de cuidados intensivos (UCI), heridas operatorias en cirugía, en pacientes de medicina, estas infecciones bacterémicas son causantes de multiresistencia antimicrobiana, particularmente a cefalosporinas de tercera generación y cuarta generación, mediado por acción de b-lactamasas cromosomales y por impermeabilidad, además de presencia de carbapenemasas entre otras acciones clínicas (10,11).

d. Manifestaciones clínicas

Agente causantes de infecciones supurativas de cualquier órgano como por ejemplo genitourinarias: uretritis. Infecciones intracraneales: meningitis, abscesos. Aparato respiratorio: Traqueotomía. Tejidos blandos: celulitis local asociada a catéteres intravenosos. Heridas traumáticas, quemaduras, incisiones quirúrgicas, bacteriemia (5,10,11).

Un estudio en Cuba, en 1997 por Bolaños, E. Se identificaron y caracterizaron bacilos Gram negativo no fermentadores aislados en el medio hospitalario, mostrándose a especies de *Pseudomona sp* en un 88.2% y *Acinetobacter sp* en un 17.8% como los principales causantes de infecciones intrahospitalarias dentro del grupo de bacilos Gram negativo no fermentadores (40).

Otro estudio en Chile, en el 2005 se determinó que *Acinetobacter baumannii* ha emergido como un patógeno intrahospitalario de la mayor relevancia mundial como agente causal de infecciones como neumonía, bacteriemia, meningitis, infecciones del tracto urinario y de partes blandas, asociándose a alta mortalidad.(41)

B. Antibióticos

1. Generalidades

Los antimicrobianos son sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas, que inhiben a concentraciones bajas el crecimiento de bacterias, hongos o virus, pero el uso desmedido de éstos ha provocado que los microorganismos evolucionen desarrollando mecanismos de resistencia que impiden la acción de los fármacos y en consecuencia, conducen a fallos terapéuticos (15).

Un microorganismo es susceptible a la acción de un antimicrobiano cuando este inhibe el crecimiento bacteriano o se produce la muerte celular. Por el contrario, la resistencia implica la ausencia del efecto inhibitorio o letal. Los mecanismos de resistencia surgen como un proceso de adaptación natural de los microorganismos a la acción inhibitoria o letal de los antimicrobianos (15,16).

Los antibióticos pueden ser bacteriostáticos (bloquean el crecimiento y multiplicación celular) o bactericidas (producen la muerte de las bacterias). Para desempeñar estas funciones, los antibióticos deben ponerse en contacto con las bacterias (18).

La prueba de la acción de un antibiótico en el laboratorio muestra cuanta exposición a la droga es necesaria para frenar la reproducción o para matar las bacterias. Aunque a una gran cantidad de un antibiótico le tomaría un tiempo menor para matar las bacterias que ocasionan una enfermedad, tal dosis comúnmente haría que la persona sufra de una enfermedad ocasionada por la droga (17,18).

a. Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son una amplia clase de antibióticos incluyendo derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactams, carbapenems e inhibidores de la betalactamasa (β -lactamasa); básicamente cualquier agente antibiótico que contenga un anillo β -lactámico en su estructura molecular(23).

b. Mecanismo de acción de los β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son bactericidas, y actúan inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. La barrera de peptidoglicanos es importante para la integridad estructural de la pared celular. El paso final de la síntesis de los peptidoglicanos, la transpeptidación, se facilita por unas transpeptidasas conocidas como "penicillin binding proteins" (PBPs, proteínas de anclaje de penicilinas) (21,22).

El núcleo β -lactámico de la molécula se une irreversiblemente al PBP. Esta unión irreversible evita el paso final (la transpeptidación) de la formación de la barrera de peptidoglicanos, interrumpiendo la síntesis de la pared celular. Es posible, además, que la inhibición de los PBPs (mediante dicha unión irreversible), haga también que se activen enzimas autolíticos de la pared celular bacteriana (21,22,23).

3. Carbapenem

Los carbapenemes son un tipo de antibiótico β -lactámico con amplio espectro de actividad bactericida y son sumamente resistentes a las betalactamasas. Siendo los representantes el imipenem y el meropenem (23,24).

El imipenem es hidrolizado e inactivado por una enzima del epitelio tubular renal, llamada dehidropeptidasa I. Este catabolismo disminuye considerablemente los niveles urinarios del imipenem y lleva a la producción de un metabolito potencialmente nefrotóxico. La inhibición de la dehidropeptidasa I por medio de la cilastatina se emplea rutinariamente al combinar el imipenem y esta sustancia que no tiene actividad antimicrobiana por partes iguales. La marca comercial de la combinación imipenem-cilastatina es Tienam (24).

El meropenem en cambio no es hidrolizado por la dehidropeptidasa tubular renal debido a que tiene un grupo metilo en el carbono 1 (C1). Meropenem tiene una alteración de su cadena lateral C2, que le confiere más actividad en contra de bacilos Gram-negativo aerobios y potencial epileptogénico reducido (25).

El mecanismo de acción antimicrobiano del imipenem es fundamentalmente el mismo de otros β -lactámico. Se une a las peptidasas bacterianas, las proteínas de unión de la penicilina (penicillin-binding proteins, o PBP), que son responsables de la elongación y la unión cruzada del peptidoglicano de la pared celular. Esto resulta en el desarreglo de la construcción de la pared celular, inhibición del crecimiento celular y frecuentemente en lisis y muerte bacteriana. En las bacterias Gram-negativa ocurre en el espacio periplásmico, entre la pared celular y la membrana celular circundante (24,25).

Imipenem es uno de los antibióticos β -lactámico más pequeños que existen. Su escaso tamaño le hacen posible ganar acceso al espacio periplásmico

de los bacilos Gram-negativo pasando a través de los canales creados por proteínas "porinas"(24,25).

El amplio espectro de los carbapenemes se atribuye a tres factores: Su habilidad de penetrar la membrana celular de múltiples bacilos Gram-negativo, su afinidad por proteínas de unión a penicilina perteneciente a un amplio espectro de bacterias y su resistencia a un amplio espectro de β -lactamasas tanto de bacterias Gram-positivo como Gram-negativo (24,25).

a. Resistencia a los Carbapenem

Cuando aparece resistencia al imipenem ésta ha sido mediada por la modificación de las porinas en los bacilos Gram negativo que previenen la penetración por el imipenem (ejemplo: en *Pseudomonas aeruginosa*), alteración de las PBP que reducen la afinidad del imipenem sobre la pared celular (ejemplo: *Enterococcus faecium* y estafilococos meticilino-resistentes) o desarrollo de β -lactamasas capaces de hidrolizar e inactivar el anillo β -lactámico del imipenem.

Es de notar que se ha reportado la aparición de resistencia a imipenem durante el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. Esto se debe generalmente a la aparición de permeabilidad en la membrana celular, aunque la bacteria permanece susceptible a otros β -lactámicos antipseudomonales. Finalmente, el imipenem es un potente inductor de "cefalosporinasas cromosomales inducibles", una clase de β -lactamasa producida por algunos bacilos Gram negativo ante la presencia de antibióticos β -lactámicos, y que son capaces de hidrolizar un gran número de los mismos. Sin embargo, el imipenem típicamente no es hidrolizado por éstas " β -lactamasa inducibles".

b. Toxicidad de los Carbapenemes

Los efectos adversos más frecuentes del imipenem en los 2.516 pacientes inicialmente tratados fueron flebitis del sitio de infusión (5%), náusea o vómito (4%), diarrea (3%), exantema o fiebre medicamentosa (2.7%) y convulsiones

(1.5%). Los efectos sobre los valores de laboratorio fueron infrecuentes (1.5%) y desaparecieron al suspender la terapia: leve aumento de las enzimas hepáticas, eosinofilia, pruebas de Coombs positivo, trombocitopenia y aumento del tiempo de protrombina. La presencia de *Clostridium difficile* en las heces fue reportada solamente en el 0.76% de los 2.516 casos tratados, y la presencia de colitis pseudo-membranosa fue del 0.16%(41).

Los factores de riesgo para desarrollar convulsiones son las lesiones cerebrales previas, epilepsia y la presencia de insuficiencia renal asociada a una dosificación no ajustada/reducida del antibiótico. Medicamentos como la teofilina, las quinolonas, el metronidazol, el ganciclovir y la ciclosporina reducen el "umbral convulsivo" en pacientes concomitantemente tratados con imipenem(41).

Por el potencial de facilitar las convulsiones el imipenem no se ha recomendado en el tratamiento rutinario de las meningitis bacterianas(41).

4. Modo de acción de los antibióticos

El antibiótico introducido en el organismo por vía oral o parenteral o directamente aplicado en la superficie cutaneomucosa despliega una actividad contra las bacterias o microorganismos susceptibles, cuyo efecto se expresa en dos alternativas: destruye al microorganismo o lo inhibe en su crecimiento y reproducción. En el primer caso, la lisis o muerte se denomina efecto bacteriolítico o bactericida, mientras que la inmovilización vital se designa efecto bacteriostático (17,19).

Los principales mecanismos se pueden agrupar de la siguiente manera. Para destruir bacterias, los antibióticos deben penetrar por la pared de éstas sin que sean metabolizados intrínsecamente, y actuar en el "blanco". De este modo, para conocer los mecanismos de resistencia es de suma importancia entender la forma en que actúa cada clase de antibióticos (17).

Prácticamente todos los agentes antimicrobianos obstaculizan funciones críticas dentro de la bacteria. Varias actividades bioquímicas son especialmente vulnerables a la interferencia por los antibióticos, por ejemplo, la síntesis de la pared celular bacteriana y la función de sus membranas, la síntesis de proteínas, el metabolismo de ácidos nucleicos y las vías metabólicas intermedias (17,19).

C. Mecanismos de resistencia

Se considera la resistencia microbiana como la pérdida de la susceptibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible. Este hecho involucra necesariamente la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo, que se transmite a sus descendientes, los que por este motivo resultan también resistentes al antimicrobiano en cuestión (20,29).

Los cambios genéticos que explican la resistencia pueden producirse por varios mecanismos que involucran ya sea al ADN cromosomal, como en la mutación, o por la adquisición de material genético extracromosomal, como en la mutación, o por la transducción, transformación o conjugación (3,8,29,30).

La resistencia microbiana constituye un problema de grandes implicaciones clínicas, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, siempre más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de las infecciones; además ha obligado a abandonar y eliminar del arsenal terapéutico a muchas drogas que inicialmente fueron muy útiles (8,20,30).

Mecanismos de actividad antibiótica

El mecanismo de resistencia más común a los antibióticos es su inactivación por mecanismos enzimáticos. Algunas enzimas inactivadoras de fármacos quizá fueron formadas para evitar el "suicidio" por especies productoras de antibióticos.

Estas enzimas pueden ser transferidas a otra especie, los genes de tales enzimas inactivadoras ocasionan resistencia a los antibióticos. Los ejemplos clásicos de enzimas con tales propiedades son las β -lactamasas, las modificadoras de aminoglucósidos y la cloranfenicol acetiltransferasa (21,22).

Las β -lactamasas hidrolizan el anillo β -lactámicos de las penicilinas y las cefalosporinas, y lo transforman en el derivado inactivo ácido peniciloico. La estructura parietal más compleja de los microorganismos Gram negativo, con una membrana interna y otra externa, permite la síntesis de β -lactamasas dentro del citoplasma y su excreción al espacio periplásmico (22,29).

Por el mecanismo mencionado, los Gram negativo, en forma constitutiva, producen cantidades relativamente pequeñas de enzima, que impiden el acceso de los antibióticos β -lactámicos activos, a los "blancos" presentes en la membrana, que son las Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP) (21,22,29).

Se ha reportado que los β -lactámicos forman complejos covalentes estables con algunas de las PBPs (peniciloil-PBPs), que hacen que estas autolisinas se inactiven. Pues bien, existen indicios de que las β -lactamasas serían unas "autolisinas" evolucionadas que en vez de formar complejos estables con los β -lactámicos, se habrían especializado en cortar el anillo lactámico (dando ácido peniciloico) a expensas de su actividad transpeptidasa original (21,22,29).

D. Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter sp.*

La resistencia a los antibióticos representa uno de los principales problemas de la población en lo referente a salud pública y a la práctica clínica. Esto es debido al incesante incremento en el uso de antibióticos durante los últimos años, además de que las bacterias resistentes a los antibióticos se han propagado de forma abrumadora (1).

En la actualidad, la responsabilidad de los microorganismos Gram-negativo como productores de infecciones intrahospitalarias ocupa el primer lugar en el mundo. Dentro del grupo de bacilos Gram negativo no fermentadores (BNF) más frecuentemente aislados, de muestras clínicas de infecciones intrahospitalarias, se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter sp.* (2,5,8).

P. aeruginosa y *Acinetobacter sp.* son resistentes, tanto de manera natural como adquirida, a un gran número de antibióticos. Esto se debe a las características de su membrana celular que tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad. La resistencia a los antibióticos usualmente activos sucede en el medio hospitalario. Las cepas pueden transmitirse entre ellas el material genético que media la resistencia, incluso a partir de otras bacterias Gram negativo como las enterobacterias.

Otro factor preocupante es la capacidad de *P. aeruginosa* de tornarse resistente en el curso del tratamiento antibiótico. Los mismos antibióticos son capaces de inducir los mecanismos de resistencia que un aislamiento tiene latentes (2,5,8).

El tratamiento antimicrobiano de estas infecciones puede estar afectado por el patrón de multirresistencia a los betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (2,5,8).

Refiriéndonos a los betalactámicos, diferentes mecanismos están implicados en la resistencia de las cepas clínicas de *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacter* sp., aunque como en otros bacilos Gram negativo, el principal mecanismo de resistencia es la producción de betalactamasas codificadas cromosómicamente o por plásmidos, dichos mecanismos pueden transmitirse entre ellas o entre otras bacterias Gram negativo. Debido al gran incremento en la resistencia, cada vez se utilizan más antibióticos de amplio espectro como los carbapenems, principalmente para este tipo de cepas (2,3,30).

Las características de la estructura de estos antibióticos les permiten una rápida penetración a través de las membranas, además su elevada afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y su gran estabilidad frente a la hidrólisis causada por la mayoría de las carbapenemasas (β -lactamasas) les proporcionan un amplio espectro (4,6,7,29).

E. Metaloenzimas

Las β -lactamasas se dividen en tres grupos: clase A de Ambler (penicilinasas), clase B de Ambler (metaloenzimas) y clase D de Ambler (oxacilinasas). Estas enzimas hidrolizan, al menos parcialmente, carbapenémicos y otros β -lactámicos. Las β -lactamasas de clase A se han reportado raramente en *Acinetobacter* sp y *Pseudomonas* (1,26,).

Las β -lactamasas de clase B, denominadas también metaloenzimas se caracterizan por presentar uno o dos iones de zinc cercanos al sitio activo, facilitando el reconocimiento y especificidad para la hidrólisis de los carbapenemes. Los genes que codifican para estas enzimas con frecuencia se encuentran en el cromosoma bacteriano, sin embargo recientemente se describe la diseminación de metaloenzimas a través de elementos genéticos móviles, tales como integrotes o plásmidos conjugativos que promueven la transferencia horizontal de metaloenzimas entre diferentes especies bacterianas, lo que facilitara la divergencia evolutiva de estas enzimas (1,2,26,35).

En la última década la expresión de metaloenzimas se ha descrito en bacilos Gram negativo causantes de infecciones intrahospitalarias, considerando a estos agentes un factor de riesgo en el fracaso terapéutico y originando un incremento de morbilidad y mortalidad. Las metaloenzimas se distinguen de las serin- β -lactamasas por hidrolizar notablemente a los carbapenemes (26).

Las carbapenemasas por excelencia son metaloenzimas que requieren para su actividad Zn y que por tanto son inhibidas por compuestos quelantes de cationes divalentes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Estas carbapenemasas, que constituyen la clase B de la clasificación de Ambler confieren resistencia no inhibida por el ácido clavulánico a todos los betalactámicos (1,26).

Este principio se ha utilizado con éxito en la metodología de difusión del disco, se persigue evidenciar la diferencia de halos de inhibición entre el imipenem ó meropenem con y sin el agente inhibidor ya mencionado, o simplemente observar una zona de sinergismo entre el imipenem ó meropenem y el inhibidor. Los otros tipos de carbapenemasas, se deducen por la falta de un resultado positivo para metalo- β -lactamasas (MBLs), la resistencia frente a imipenem y meropenem (2,4,7).

El conocerse la forma de actuar de este mecanismo ha permitido distinguir formas para demostrar su presencia, existiendo diferentes formas tanto moleculares como fenotípicas que cuentan con una amplia sensibilidad y especificidad (2,4,7).

En un estudio realizado en Buenos Aires, Argentina en el 2006 por Pagniez G., Radice M. et al. Se mostró un 100% de especificidad y sensibilidad en la detección de metaloenzimas en la población de *Pseudomonas aeruginosa* analizadas por un ensayo de detección fenotípica de metalo- β -lactamasas empleando discos de EDTA. (43)

a. Epidemiología

Las metaloenzimas se expresan preferentemente en especies de bacilos Gram negativo no fermentadores de glucosa siendo los pertenecientes al género de *Pseudomonas* las encontradas con mayor frecuencia en aislamientos clínicos. En la década de los 80 se describió el primer hallazgo de la expresión de una metaloenzima que generaba resistencia a los carbapenemes, la enzima se encontraba codificada en el cromosoma bacteriano. (26,31,37).

En los años 90 se reportó la primera metaloenzima codificada en un plasmado móvil (son las estructuras extracromosomales de mayor importancia epidemiológica, responsables de la propagación horizontal de múltiples genes de resistencia). (31,37).

Las primeras variantes de metaloenzimas fueron detectadas en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en Europa y en América Latina, los reportes de organismos productores de metaloenzimas se describen en Canadá, Estados Unidos y Brasil. Otras variantes posteriores también fueron descritas en *P. aeruginosa* en Brasil (37,38).

La prevalencia de la expresión de metaloenzimas en aislamientos clínicos hasta el momento se ha mantenido en niveles no comparables con la expresión de B-lactamasas de espectro extendido de la clase A (26,32,33,35).

Hasta hace algunos años la vía de diseminación de metaloenzimas a miembros de la familia de Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* y otros bacilos Gram negativo no fermentadores de glucosa se desconocía, sin embargo, en los últimos cinco años un gran número de los reportes describen que la mayor parte de estos genes de resistencia se encuentran incluidos en plásmidos conjugativos. (1,26,31).

Los genes de metaloenzimas codificados en plásmidos conjugativos le confieren a las bacterias un gran potencial para la diseminación de estos genes a otros patógenos intrahospitalarios. El extenso perfil de sustratos que hidrolizan las metaloenzimas y la participación de elementos genéticos móviles contribuirán sin duda a la rápida diseminación de la multirresistencia entre las especies bacterianas (1,26,31,33,36).

IV. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas en la terapéutica actual por las pocas opciones que quedan para el adecuado tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes, al no ser identificados estos mecanismos por el desconocimiento o por la poca importancia que se le da a la susceptibilidad antimicrobiana impide identificarlos en cepas multirresistentes como lo son los bacilos Gram negativo no fermentadores, principalmente *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter sp*. de gran importancia en el ambiente hospitalario (1).

Es muy probable que se presenten diversos mecanismos de resistencia como metalobetalactamasas; las cuales si no son detectadas e interpretadas adecuadamente por el laboratorio pueden ocasionar fallos graves en la terapia que el médico decida aplicar para tratar las infecciones de sus pacientes (1).

Considerando que *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp* son responsables de la mayoría de infecciones intrahospitalarias en Guatemala con un 34.15% entre ambos aislamientos (*Pseudomonas sp.* 17.59% y *Acinetobacter sp* 16.56%) ocupando el tercer lugar en cuanto a frecuencia de aislamientos se encuentra abajo de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, es de vital importancia caracterizar estas cepas en cuanto a mecanismos de resistencia para evitar repercusiones negativas tanto para la salud de los pacientes como para la economía de las instituciones hospitalarias, ya que estos microorganismos presentan diversos mecanismos de resistencia así como la elevada capacidad para adquirir o desarrollar nuevos mecanismos (3,4,39).

Debido a los distintos mecanismos de resistencia que muestran estas bacterias, se ha utilizado a los carbapenemes, que son los antibióticos β -lactámicos de más amplio espectro con buena actividad frente a la mayoría de Gram negativo, aunque cepas multirresistentes ya están presentando resistencia ante estos antibióticos (3.9% en aislamientos de *Pseudomonas sp.* y 4.8% en

aislamientos de *Acinetobacter sp.* según Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos) (39).

Las metaloenzimas son el mecanismo de resistencia de mayor importancia clínica y epidemiológica a nivel mundial por el alto nivel de resistencia que causan para los β -lactámicos, a la alta tasa de mortalidad asociada y a la persistencia en el ambiente hospitalario (3,4).

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Determinar la presencia de metaloenzimas como mecanismos de resistencia en aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* multiresistentes referidas al Laboratorio Nacional de Salud.

B. Objetivos Específicos

1. Determinar el tipo de muestra y servicio donde fueron aisladas las cepas de *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas sp.* con presencia de metaloenzimas.
2. Relacionar la presencia de metaloenzimas con la resistencia a otras familias de antibióticos en los microorganismos en estudio.

VI. HIPÓTESIS

En esta investigación no se formula hipótesis por ser de tipo descriptivo de corte transversal.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo:

Cepas de *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter sp* referidas al Laboratorio Nacional de Salud -LNS- 2007

B. Muestra:

Se incluyeron por conveniencia 95 aislamientos, 29 cepas de *Pseudomonas sp* Y 66 cepas de *Acinetobacter sp* del banco de cepas multirresistentes del Laboratorio Nacional de Salud provenientes del Hospital Roosevelt de Guatemala, referidas de enero a julio del 2007.

C. Recursos

1. Recurso Humanos

- a. Tesista: Br. Patricia Espinoza
- b. Asesor: Lic. Jorge Matheu

2. Recursos Institucionales

Laboratorios que refieren cepas al Laboratorio Nacional de Salud, a la Unidad de Diagnóstico, Área de Bacteriología.

D. Materiales

a. Equipo

Cabina de bioseguridad biológica Nivel 2
Congelador a -40°C
Mechero Bunsen
Incubadora (37°C)
Refrigerador (4°C)

b. Materiales

Cajas de Petri
Hisopos estériles
Tubos de vidrio
Asas bacteriológicas
Regla

Pinzas

Gradillas

c. Reactivos y Medios

Estándar de MacFarland de 0.5 de turbidez

Agua destilada estéril

Agar sangre de carnero

Agar MacConkey (MK)

Agar Müller-Hinton

Discos con antibióticos: Imipenem, Meropenem, Amikacina,

Ciprofloxacina, Ceftazidima, Cefepime, Gentamicina,

Piperacilina/Tazobactam, Piperacilina.

Discos con EDTA 0.5M

Tiras de Oxidasa

E. Metodología

1. Se analizaron 95 aislamientos, 29 cepas de *Pseudomonas sp* Y 66 cepas de *Acinetobacter sp* con la técnica de difusión en disco.
2. Se llevó a cabo la lectura de los halos de inhibición de cada antibiótico
3. Se reportaron los resultados como susceptible o resistente, basado en los parámetros de la CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) 2007.
4. Se determinó la presencia de metaloenzimas en los 95 aislamientos multirresistentes
5. Revisión de fichas epidemiológicas de los pacientes con información sobre procedencia tanto de muestras como de servicio, de donde se recaudaron las 95 cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.*,

6. Análisis estadístico utilizando el programa estadístico de computación WHONET 5.4

F. Procedimiento

1. Los aislamientos del banco de cepas del Laboratorio Nacional de Salud que se encuentran congelados a -70°C , fueron resembrados en agar sangre de carnero y agar MK, para su recuperación y confirmación por medio de difusión en disco.
2. Se incubó 24 horas a 37°C .
3. Se realizó una suspensión de bacterias hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0.5 del estándar de MacFarland.
4. Se inoculó 2 cajas de agar Müller-Hinton por cepa con la suspensión de bacterias utilizando un hisopo estéril al cual previamente se le eliminó el exceso de muestra contra las paredes del tubo donde se encontraba la suspensión y se hizo el inóculo en 3 direcciones. Este paso se debe llevar a cabo antes de que se cumplan 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión, con el fin de mantener la concentración previamente alcanzada de bacterias.
5. Los discos con antibiótico de Imipenem, Meropenem, Amikacina, Ciprofloxacina, Ceftazidima, Cefepime, Gentamicina, Piperacilina/Tazobactam, Piperacilina, se colocó con una pinza estéril distribuidos de forma homogénea a 2 cm como mínimo de distancia entre cada disco, en 2 de las cajas de agar Müller-Hinton inoculó con las cepas.
6. Se incubó por 24 horas a 37°C .

7. Se realizó la lectura de los halos de inhibición a los discos de Imipenem, Meropenem, Amikacina, Ciprofloxacina, Ceftazidima, Cefepime, Gentamicina, Piperacilina/Tazobactam, Piperacilina, determinando su sensibilidad o resistencia.
8. Las cepas que resultaron resistentes a uno o ambos carbapenemes, se les realizó nuevamente una suspensión hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0.5 del estándar de MacFarland y se inoculó de la misma manera pero en esta ocasión se colocaron los discos de Imipenem y Meropenem y entre ellos un disco impregnado con EDTA al 0.5M, a una distancia no mayor a 2cm entre cada carbapenem.
9. Se incubó por 24 horas a 37°C.
10. Se observó la presencia de Metaloenzima donde el disco de EDTA 0.5M estuvo actuando como compuesto quelante causando la inhibición de esta enzima en caso de estar presente, observándose así alguna deformación o bien un aumento del halo de inhibición en las zonas donde el EDTA entró en contacto con la acción de uno o ambos carbapenemes; lo que es sugerente de la presencia de Metaloenzima.
11. Se revisaron las fichas epidemiológicas de los pacientes identificando el tipo de muestra y los servicios de donde provenían los 95 aislamientos.
12. Se relacionaron la presencia de metaloenzimas con la resistencia a otras familias de antibióticos de forma descriptiva basándose en los resultados que se obtuvieron de los análisis CIM, de todas las cepas del estudio.

G. Diseño de la investigación

a. Variables de interés

Mecanismo de resistencia, halos de inhibición o deformación.

b. Análisis de los resultados

Para el análisis de resultados se utilizó el programa de computación WHONET que permite calcular parámetros estadísticos como los que se utilizó para la variable de las metaloenzimas como mecanismo de resistencia.

La relación de la presencia de metaloenzimas con la resistencia a otras familias de antibióticos se determinó de forma descriptiva basado en los parámetros de la CLSI 2007.

VIII. RESULTADOS

La presencia de metaloenzima como mecanismo de resistencia en aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* multirresistentes que fueron referidas al Laboratorio Nacional de Salud mostró ser mayor en las cepas de *Pseudomonas sp.* ya que el 66 % (19 de 29) de éstas presentó dicho mecanismo,

mientras que en las cepas de *Acinetobacter sp*, únicamente el 33% (22 de 66) lo presentó en este estudio (Gráfica 1).

Gráfica 1. Distribución de los aislamientos de *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter sp*, multirresistentes N=95 y la presencia de metaloenzima N=41.

Microorganismos Analizados	Total de Aislamientos Analizados N=95	Aislamientos Analizados con Metaloenzima N=41
<i>Pseudomonas sp.</i>	29 (31%)	19 (66%)
<i>Acinetobacter sp.</i>	66 (69%)	22 (33%)

Fuente datos experimentales

El principal tipo de muestra donde fueron aisladas las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* con presencia de metaloenzima (N=41) fue en muestras de aspirado traqueal para ambas bacterias. En dichas muestras fueron aisladas 11 (58%) de *Pseudomonas sp.* y 6 (27%) cepas de *Acinetobacter sp.* mientras que en muestras de secreciones varias en *Pseudomonas sp.* se aisló en 4 (21%), y *Acinetobacter sp.* en 5 (23%).

Tabla 1. Tipos de muestra donde fueron aisladas las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* con presencia de metaloenzima N=41

Tipo de Muestra	<i>Acinetobacter sp.</i> N=22 (54%)	<i>Pseudomona sp.</i> N=19 (46%)
Sangre	4 (18%)	1 (5%)
Absceso	1 (5%)	0
Catéter	6 (27%)	3 (16%)
Secreciones varias	5 (23%)	4 (21%)
Aspirado traqueal	6 (27%)	11 (58%)

Fuente datos experimentales

El servicio de unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP), fue el servicio que envió el mayor número de muestras en donde se aislaron cepas con presencia del mecanismo de resistencia metaloenzima, presentando *Pseudomonas sp.*, en 8 (42%) y de las cepas de *Acinetobacter sp.*, en 7 que hace un 32%, seguido en frecuencia muy de cerca únicamente por la unidad de cuidados

intensivos adulto con 5 (26%) para *Pseudomonas sp.* y con 5 (23%) en *Acinetobacter sp.*

Tabla 2. Tipo de servicio donde provenían aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* con metaloenzima (N=41)

Tipo de Servicio	<i>Acinetobacter sp.</i> N=22 (54%)	<i>Pseudomona sp.</i> N=19 (46%)
Emergencia	1 (4%)	0
*UCI	5 (23%)	5 (26%)
Medicina	4 (18%)	2 (11%)
Pediatría	2 (9%)	3 (16%)
Cirugía	3 (14%)	1 (5%)
*UCIP	7 (32%)	8 (42%)

Fuente datos experimentales

*UCI=unidad de cuidados intensivos adulto, UCIP=unidad de cuidados intensivos pediátricos

Para las cepas de *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas sp.* (N=41) que presentaron metaloenzima y su relación con la resistencia de otras familias de antibióticos, se observó en *Acinetobacter sp.* (N=22) una resistencia inusual a β -lactámicos como cefepime con 57.9% mayor que en ceftazidima 52.6%. De igual manera *Acinetobacter sp.* (N=22) presentó resistencia no usual a en los aminoglucósidos, presentando amikacina mayor resistencia (73.7%) que gentamicina con

(57.9%). En ambos casos los antibióticos de mayor espectro (cefepime y amikacina) con mayor resistencia que los de menor espectro (ceftazidima y gentamicina). No así en las cepas de *Pseudomonas sp.* con metaloenzima (N=19), al presentar los de mayor espectro menor resistencia que los de más bajo espectro tanto en β -lactámicos y aminoglucósidos.

Tabla 3. Aislamientos de *Acinetobacter sp* y *Pseudomonas sp.* con metaloenzimas (N=41) y su relación de resistencia con otras familias de antibióticos.

Antibiótico	Resistencia <i>Acinetobacter sp.</i> con metaloenzima n=22	Resistencia <i>Pseudomona sp.</i> con Metaloenzima n=19
Betalactámicos		
Piperacilina	94.7%	68.8%
Piperacilina/Tazobactam	73.7%	50%
Ceftazidima	52.6%	56.2%
Cefepima	57.9%	31.2%
Aminoglucosidos		
Amikacina	73.7%	50%
Gentamicina	57.9%	68.8%
Fluoroquinolona		
Ciprofloxacina	57.9%	43.8%

Fuente datos experimentales

Los 19 aislamientos de *Pseudomonas sp.* y los 22 aislamientos de *Acinetobacter sp* que presentaron metaloenzima como mecanismo de resistencia en su mayoría fueron resistentes a ambos carbapenemes (imipenem y meropenem) con un 84% (N=16) para *Pseudomonas sp.* y con un 63.6% (N=14) para *Acinetobacter sp.* Se observó que para presentar metaloenzima fue más frecuente que presenten resistencia a ambos carbapenemes.

Tabla 4. Descripción de Resistencia/Susceptibilidad de las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* con Metaloenzima (N=41)

Actividad a Carbapenemes	<i>Acinetobacter sp.</i> Con Metaloenzima N=22 (54%)	<i>Pseudomonas sp.</i> Con Metaloenzima N=19 (46%)
Resistente a ambos carbapenemes	14 (63.3%)	16 (84%)
Resistente a Meropenem y sensible a Imipenem	0%	1 (5.26%)
Resistente a Meropenem e intermedio a Imipenem	0%	1 (5.26%)
Intermedio a Meropenem y sensible a Imipenem	3 (13.6%)	0%
Sensible a Meropenem y Resistente a Imipenem	5 (22.7%)	1 (5.26%)

Fuente datos experimentales

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La emergencia y diseminación de la resistencia bacteriana se considera un fenómeno creciente alrededor del mundo y se ha convertido en un problema de salud pública. A la fecha se han reconocido diversas especies bacterianas con multirresistencia adquirida a los antibióticos, tal es el caso de los géneros de

Pseudomonas sp y *Acinetobacter sp*, que causan infecciones principalmente intrahospitalarias (9,11,15).

En este estudio se determinó la presencia de metaloenzima como mecanismo de resistencia en 95 aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* multirresistentes provenientes de diferentes servicios y tipos de muestra. Se estableció la existencia de metaloenzima, por la resistencia a uno o a ambos carbapenemes (Imipenem, Meropenem) y el sinergismo mostrado por el EDTA con estos antibióticos. La resistencia a carbapenemes producida por metaloenzimas se debe tomar en consideración en todos los aislamientos hospitalarios de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* aunque llegarán a presentar aparente susceptibilidad a alguno de estos antibióticos *in vitro*, lo que hace importante su búsqueda rutinaria (1,2,4,9,15,20).

En éste estudio la resistencia por metaloenzima mostró que ambas bacterias la presentan, *Pseudomonas sp* en 65.5% y *Acinetobacter sp.* con un 33.3%, concordando con lo que se reporta en la literatura, que indica en hospitales europeos una frecuencia hasta del 70% entre las *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* resistentes a los carbapenemes (1,2).

La presencia de metaloenzima como mecanismo de resistencia en las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* estudiadas puede deberse a la facilidad que tienen estos tipos de bacterias para desarrollar y adquirir nuevos mecanismos de resistencia como los plásmidos autotransferibles, que estarían albergando la inserción de integrones responsables de la codificación de resistencia a carbapenemes por metaloenzimas. Esto sugiere que es necesaria incrementar medidas de control de resistencia (Gráfica 1) (1,4,6).

En el estudio se observó que el aspirado traqueal fue el principal tipo de muestra donde se aislaron las cepas que presentaron el mecanismo de resistencia de metaloenzimas. Lo anterior puede asociarse a que las bacterias encuentran en los tejidos de donde proviene aspirado traqueal los

requerimientos de humedad necesarios, siendo un factor crítico en los hospitales por la alta variedad de sitios donde estas bacterias pueden mantenerse y transferirse a pacientes, como lo son los equipos de ventilación mecánica, soluciones de limpieza, medicamentos, entre otros. Esto indica la importancia de sistemas de vigilancia en infecciones intrahospitalarias (Tabla 1) (14,15).

El aumento en la frecuencia de aislamientos con presencia del mecanismo de resistencia metaloenzima en UCIP (unidad de cuidados intensivos pediátricos) y UCI (unidad de cuidados intensivos adultos) en *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* sugiere que en este tipo de servicios los pacientes se encuentran expuestos prolongados tratamiento con antibióticos que pueden alterar la microbiota normal y afectar la capacidad protectora de la misma provocando la selección de cepas multiresistentes. Además que los pacientes en contacto frecuente con trabajadores de la salud corren mayor riesgo de infecciones cruzadas, principalmente por las malas prácticas higiénicas como pueden ser el inadecuado lavado de manos o la falta de este o bien la mala limpieza o desinfección de equipos. El que las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* productoras de metaloenzimas provengan principalmente de estos servicios debe tomarse como alerta, ya que podrían difundirse a través del personal de salud y los equipos médicos a otros servicios (Tabla 2) (8,9).

El estudio mostró un perfil de resistencia similar entre los aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* que presentaron metaloenzimas como mecanismo de resistencia, observándose variantes importantes en las cepas de *Acinetobacter sp.* con presencia de metaloenzimas, como lo fueron, el presentar mayor resistencia cefepime (57.9%) que ceftazidima (52.6%), al ser cefepime una cefalosporina de cuarta generación y ceftazidima de tercera generación no es lo esperado. Esta resistencia presentada en las cefalosporinas de los aislamientos de *Acinetobacter sp.* no concuerda con lo reportado en la literatura la cual indica

las ventajas de una cefalosporina de cuarta generación con mayor capacidad de penetración a la membrana celular, rápido acceso al espacio periplásmico y mayor estabilidad a la hidrólisis por β -lactamasas, esperando por esto que su resistencia en el estudio hubiera sido menor en cefepime que ceftazidima. Las ventajas mencionadas anteriormente en las cefalosporinas de cuarta generación, puede hacer que cefepime tienda a usarse más veces en monoterapia, evitando la toxicidad de los aminoglucósidos, además los análisis fármaco-económicos sugieren que puede ser más eficaz que otras cefalosporinas, lo anterior lleva a la conclusión que el mayor uso de este antibiótico en infecciones pudo haber causado la elevación en la resistencia de las mismas. (Gráfica 5) (22,24,29,30).

No así en las cepas de *Pseudomonas sp.*, con presencia de metaloenzima donde sí fue menor la resistencia en cefepime con un 31.2% contra un 56.2% en las ceftazidima. El que *Pseudomonas sp.* no presentara mayor resistencia a cefepime en comparación a ceftazidima, podría ser la evidencia de que ésta bacteria ha sido sometida a antibióticos de amplio espectro como los carbapenemes, provocando la selección de este mecanismo de resistencia y evitando elevados porcentajes de resistencia con respecto a cefepime. Puede ser esta una razón del porqué fue mayor la frecuencia de metaloenzimas en aislamientos de *Pseudomonas sp.* que en *Acinetobacter* (Gráficas 1 y Tabla 3) (24).

Otro comportamiento inusual encontrado en el mismo grupo de aislamientos de *Acinetobacter sp.* con metaloenzimas fue que en el grupo de antibióticos aminoglucósidos, donde amikacina presentó mayor resistencia con un 73.7% que gentamicina con un 57.9%, lo cual no concuerda con la literatura debido a que amikacina es de mayor espectro que gentamicina. Esta resistencia observada en los aminoglucósidos puede deberse a un abuso en el uso de antibióticos de amplio espectro, pudiendo causar con esto una elevación en la resistencia, mayor a la de los antibióticos de más bajo espectro (Tabla 4) (1,4,7,24).

En este estudio se observó que la presencia de metaloenzima es más frecuente encontrarla en microorganismos que presenten resistencia a ambos carbapenemes (imipenem y meropenem), pero a la vez demuestra que no es la única forma en que un microorganismo pueda presentar metaloenzima, que con menor frecuencia la podría presentar teniendo resistencia únicamente a uno de los carbapenemes. Lo anterior sugiere que la evaluación de las metaloenzimas debe de realizarse en todas las cepas multirresistentes y evaluar la sensibilidad de ambos carbapenemes. La vigilancia de la resistencia es esencial para proveer información sobre la magnitud y las tendencias de la resistencia, las medidas que se tomen y las acciones que se sigan dependerán del nivel en el que se genere, colecte y analice dicha información (Tabla 5) (1,2,4,7).

La descripción de nuevas carbapenemasas es cada día más frecuente y al ser la metaloenzima uno de los mecanismos emergentes considerado responsable del aumento de la resistencia a imipenem y a meropenem hace necesario la implementación rutinaria de técnicas rápidas y específicas para lograr la identificación de estas enzimas (1,2,4,7).

X CONCLUSIONES

1. Los aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* multirresistentes del Hospital Roosevelt de Guatemala presentan metaloenzima como mecanismo de resistencia en un 43%, concordado con lo reportado en la literatura internacional.
2. Se determinó que las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* con presencia de metaloenzima fue mayor en las muestras que provenían de

aspirado traqueal que en las de secreciones varias, catéter, absceso y sangre.

3. En los servicios de cuidados intensivos pediátricos y de adultos fue donde se aislaron con mayor frecuencia las cepas de *Pseudomonas sp*, y *Acinetobacter sp*. con metaloenzima como mecanismo de resistencia.
4. De los aislamientos de *Acinetobacter sp*. que presentaron metaloenzima como mecanismo de resistencia en este estudio, únicamente amikacina y cefepime fueron los antibióticos con resistencia inusual.
5. En esta muestra de cepas de *Pseudomonas sp*, y *Acinetobacter sp*. la presencia de metaloenzimas fue más frecuente al presentar resistencia a ambos carbapenemes.

XI. RECOMENDACIONES

1. Implementar la determinación de metaloenzima como mecanismo de resistencia en *Pseudomonas sp*, y *Acinetobacter sp*. en los laboratorios hospitalarios del país, que ayuden a mejorar un tratamiento terapéutico adecuado.

2. Realizar un estudio posterior que se enfoque en evaluar nuevas alternativas terapéuticas en pacientes que presenten aislamientos de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* con presencia de metaloenzima.

XII. REFERENCIAS

1. Sánchez A., Salso S., Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Servicio de microbiología clínica, Hospital clínico san carlos, Madrid rev esp quimioter. 2004 Dec;17(4):336-40. www.seq.es/seq/0214-3429/17/4/336.pdf -

2. Oliver, A. resistencia a carbapenemas y *acinetobacter baumannii*. servicio de microbiología. hospital son dureta. palma de mallorca. españa. 2004. <http://www.doyma.es> el 19/08/2007.
3. Suárez, C. Resistance mechanisms to carbapenems in *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae and strategies for prevention and control. Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas.2006 vol. 30, no. 1 [citado 2008-09-10], pp. 43-54.
4. Rodríguez, v. la era de las carbapenemasas sociedad venezolana de microbiología. xxix jornadas venezolanas de microbiología. cumaná, noviembre de 2005. vol 10, no.1 pp 36-42 .
5. Ferrero, M., Incidencia Y Resistencia De Bacilos Gram Negativos No Fermentadores. Hospital Escuela José F. de San Martín - Rivadavia 1250 - Corrientes (3400) Argentina. Facultad de Cs. Exactas nat. y Agrim. - Depto. de Bioquímica. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. vol. 24, no. 2 [citado 2007-09-02], pp. 24-32.
6. Martínez, L. y Hernández, A. Mecanismos De Resistencia A Las Carbapenemas En *Pseudomonas aeruginosa* Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Universitario Virgen Macarena. Universidad de Sevilla.2004
7. Marchiaro P., Sensitive EDTA-Based Microbiological Assays for Detection of Metallo-β-Lactamases in Nonfermentative Gram-Negative

Bactéria, Journal Of Clinical Microbiology, Nov. 2005, p. 5648-5652
Vol.43

8. Martín, G, Carmona, O, Comegna, M *et al.* Tendencia de la resistencia a β -lactámicos y otros antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales de Venezuela. resistencia nosocomial y comunitaria. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [online]. ene. 2003, vol.23, no.1 [citado 19 Enero 2008], p.21-29. Disponible en la WorldWide Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-
9. Ferrero, Susana M. Incidencia y resistencia de bacilos gram negativos no fermentadores. Facultad de Cs. Exactas Nat. y Agrim. - Depto. de Bioquímica. Hospital Escuela José F. de San Martín - Rivadavia 1250- Corrientes (3400) Argentina. Disponible en: www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/3-Medicina/M-136.pdf
10. Montero A. Corbella X, (2006). Problemática clínica de las infecciones por *Acinetobacter baumannii* multiresistente, Aplicación modelo de neumonía experimental en raton, Sevilla
11. Alexis P. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado *Rev Chil Infect* 2005; 22 (4): 298-320
12. V. Andrade. Emergencia de la resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* productora de Metalobetalactamasas, *Revistas científicas de America Latina, Bioquímica Clínica, Universidad autonoma de Mexico*

13. Jordi Vila y Francesc Marco Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. Infecciones Immunologia. Barcelona. España.
14. Gabriela Algorta. Bacilos Gram Negativos No Exigentes *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2022.pdf
15. Infecciones hospitalarias en unidades de cuidados intensivos de ocho países en desarrollo. Rev Panam Salud Publica .2007, vol.21, n.1 pp. 53-54. Available from: <<http://www.scielosp.org/scielo.php>
16. Zageta M. Antibióticos. Ecom. Noviembre 2002. 22 de Noviembre de 2003. Disponible en: <http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/antibioticos/default>
17. <<ftp://members.tripod.com//fotografía/textos/antibióticos1.htm> 22 de Noviembre de 2003.
18. <http://www.textoscientificos.com/antibioticos.htm> 26 de Octubre 2005
19. Bergolio. Antibióticos. Quinta ed. España: Editorial Médica Panamericana, 1993. p 3.
20. Chirinos J. Mecanismos de la resistencia microbiana. La revista médica del C.I.E.M. 31 de Enero de 2004. Disponible en: www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/larev.rev01.htm
21. Jane J. Burns. Mecanismos de Resistencia Bacteriana, Clínicas Pediátricas de Norteamérica, Volumen 3/1995

22. Mario O. Introducción a los mecanismos de resistencia a los antibióticos.
<http://www.monografias.com/trabajos11/resanti/resanti.shtml>
23. Martín-Gil J, Villa FM, Ramos-Sánchez MC, Martín-Gil FJ. "Studies on beta-lactam antibiotics - Differential thermal-analysis of Cephalosporins".es.wikipedia.org/wiki/Categoría:Antibióticos_betalactámicos
24. Fundacion Santafe de Bogota. Artículos Para Médicos.
<http://www.abcmedicus.com/articulo/medicos/2/id/212/pagina/1/carbapenems.html>
25. Giner Almaraz, S.; Canós Cabedo, M.*, Y Ferrer Gómez, C. Meropenem: Un Nuevo Carbapenem En El Arsenal Terapeuta. Sección de Microbiología. Hospital Virgen de los Lirios. Alcoy (Alicante).Laboratorio de Salud Pública. Centro de Salud Pública de Castellón. www.sefh.es/revistas/vol19/n2/109_113.PDF.
26. Vay, C. et al. Actividad "in vitro" de diferentes antibacterianos sobre bacilos gram-negativos no fermentadores, excluidos *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* *Rev. argent. microbiol.* 2005, vol.37, n.1 [citado 2010-01-31], pp. 34-45 . Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo>.
27. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS approved standard M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999. 19 de Noviembre de 2007. Disponible en: www.cdc/ncidod/hip/lab/FactSheet/esbl.htm
28. Departamento de Biología Molecular. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud pública de México* 1994;36. 22 de

Noviembre de 2003. Disponible en:
http://xipe.insp.mx/salud/36/364_7s.html

29. Brito, A. Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a la gentamicina, tobramicina amikacina en Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 2000, vol.20, no.1, p.01-01. ISSN 1315-2556.
30. Pérez I Alfonso, García C Patricia, Poggi M Helena, Braun J Stephanie, Castillo V Claudia, Román Juan Carlos et al . Presencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. *Rev. méd. Chile* . 2007 Abr [citado 2010 Ene 31] ; 136(4): 423-432.
31. Karen Lolans, 1 Thomas W. Rice, 1 L. Silvia Muñoz-Price, 2 y John P. Quinn. Brote de múltiples ciudades Carbapenem-Resistente *Acinetobacter baumannii*. La producción de los aislamientos Carbapenemase OXA-40. *Antimicrobianos*, sep 2006, p. 2941-2945 Vol. 50, N ° 9 Copyright © 2006, la Sociedad Americana de Microbiología. Todos los derechos reservados.
32. R. Jacinto, Marco. *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un servicio de neonatología. *Rev. perú. med. exp. salud publica*. vol.25, no.2, p.250-252. Disponible en: <<http://www.scielo.org.pe/scielo>>.
33. Simone Noue'r Aranha, 1 Marcio Nucci, 1 Ma'rcia P. de Oliveira-, 1 Fla'via Lu'cia Piffano Costa Pellegrino, Y Beatriz Meurer Moreira Factores de riesgo para la Adquisición de multidrogas resistentes *Pseudomonas aeruginosa* la producción de SPM Metallo-Lactamase - *Antimicrobianos y chemotherapy*, sep 2005, p. 3663-3667 Vol. 49, N °

9. Copyright © 2005, la Sociedad Americana de Microbiología. Todos los derechos reservados.
34. Axel Siroy, 1 Virginie Molle, 2 Christelle Lemaître-Guillier, 3 David Vallenet, 4 Martine Pestel-Caron. Canal de Formación de CarO, la Resistencia-Carbapenem Asociado a la proteína de membrana exterior de *Acinetobacter baumannii*. Copyright © 2005, la Sociedad Americana de Microbiología. Todos los derechos reservados.
35. Balazs Libisch, Monika Muzslay, Maria Gacs, Janos Minarovits, Marta Knausz, 4 Joseph Watine, Epidemiología Molecular del VIM-4-Metallo-Lactamase-Producir *Pseudomonas sp.* En aislados en Hungría Antimicrobianos, diciembre de 2006, p. 4220-4223 Vol. 50, N ° 12 Copyright © 2006, la Sociedad Americana de Microbiología. Todos los derechos reservados.
36. Dongeun Yong, Yeoung Seon Choi, Kyoung Ho Roh, Kim Ki Chang, Youn Hee Park, Jong Hwa Yum, Kyungwon Lee. El aumento de la prevalencia y diversidad de Metallo--Lactamases En *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, Y Enterobacterias de Corea. Copyright © 2006, la Sociedad Americana de Microbiología. Todos los derechos reservados.
37. Yohei Doi, Doroti de Oliveira García, Jennifer Adams, y David L. Paterson. Coproducción de Novela 16S rRNA y Methylase RmtD Metallo-Lactamase-RRP-1 en un Panresistant *Pseudomonas aeruginosa* Aislar de Brasil. Copyright © 2007, la Sociedad Americana de Microbiología. Todos los derechos reservados.
38. María Virginia Villegas, Karen Lolans, María del Rosario Olivera, José Carlos Suarez. Primera detección de Metallo-Lactamase-VIM-2 en

Pseudomonas Aeruginosa aislados de Colombia. Copyright © 2006, la Sociedad Americana de Microbiología. Todos los derechos reservados.

39. OPS. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos Brasilia, Brasil 27 al 29 de julio, 2005. OPS/HDM/CD/A/408/06
40. Esnard Bolanos. Identificación y caracterización de bacilos gramnegativos no fermentadores aislados en el medio hospitalario. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 1997, vol. 35, no. 1 [citado 2008-09-10], pp. 30-37. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid.
41. Yew WW, Kwan SY, Wong PC, Lee J. Ofloxacin and imipenem in the treatment of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* lung infections. *Tubercle* 71: 131-133, 1990.
42. Morga M, Rubén; Santander P, Edgardo; Arias C, Teresa y Mendez A, Fermín. Integrones y su relación con el fenotipo de resistencia en bacilos gramnegativos aislados en el Hospital Torres Galdames de Iquique, Chile. *Rev. chil. infectol.* [online]. 2007, vol. 24, no. 5, pp. 384-390. ISSN 0716-1018.
43. Cejas, D., Almuzara, M., Santella, G. *et al.* Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Rev. Argent. Microbiol.* [online]. oct./dic. 2008, vol.40, no.4 [citado 15 Septiembre 2009], p.238-245. Disponible en: <<http://www.scielo.org.ar/scielo.php>

XIII. ANEXO

	Bacilos cortos o son alargados.
	Estructura de la pared típica de bacterias

GENERALIDADES DE LOS BACILOS GRAM NEGATIVO NO FERMENTADORES	Gram negativo
	Son muy numerosos y muy extendidos en la naturaleza.
	La mayoría son saprofitas, pero algunas son patógenas e incluso causantes de enfermedades de primera magnitud en humanos y animales.

BACILOS GRAM NEGATIVO NO FERMENTADORES

ANTIBIÓTICOS

GRUPO DE ANTIBIÓTICOS	SUBGRUPO DE ANTIBIÓTICOS	ANTIBIÓTICO
Penicilinas	Penicilinas de bajo espectro	<ul style="list-style-type: none"> • benzathina • benzylpenicilina (penicilina G) • phenoxymethylpenicilina (penicilina V) • penicilina procaina <p>Efectivas frente a Gram positivo y Neisseria.</p>
	Penicilinas penicilinas-resistentes de bajo espectro	<ul style="list-style-type: none"> • Meticilina • Dicloxacilina • Flucloxacilina
	Penicilinas de moderado espectro	<ul style="list-style-type: none"> • Amoxicilina • Ampicilina • Efectivas frente a Gram

		positivo y Gram negativo.
	Penicilinas de amplio espectro	<ul style="list-style-type: none"> • co-amoxiclav (amoxicilina+ácido clavulánico) • ampicilina-sulbactam
	Penicilinas de espectro extendido	<ul style="list-style-type: none"> • Piperacilina • Ticarcilina • Azlocilina • Carbenicilina • Eftivas principalmente frente a Gram positiva. También bacteroides, Serratias y Klebsiella.
Cefalosporinas	Cefalosporinas de primera generación	<p>Espectro moderado Gram positivas y menor Gram negativa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • cefalexina • cefalotina • cefazolina
	Cefalosporinas de la segunda generación	<p>Espectro moderado a Gram negativa (Haemophilus). De acción bactericida.</p> <ul style="list-style-type: none"> • cefaclor • cefuroxima • cefamandol
	Cefalosporinas de	Espectro moderado contra Gram

	segunda generación	negativo. <ul style="list-style-type: none"> • cefotetan • cefoxitina
	Cefalosporinas de tercera generación	Amplio espectro. <ul style="list-style-type: none"> • ceftriaxona • cefotaxime <p>Amplio espectro con actividad anti-<i>Pseudomonas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • ceftazidime
	Cefalosporinas de cuarta generación	Amplio espectro con actividad realizada contra bacterias Gram positiva y estabilidad ante beta-lactamasasa. <ul style="list-style-type: none"> • cefepime • ceftirome

Carbapenems		<p>Espectro más amplio de los antibióticos beta-lactámicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • imipenem con cilastatin • meropenem • ertapenem
Monobactams		<p>A diferencia de otros beta-lactámicos, no hay anillo fundido unido al núcleo del beta-lactamo. Así, hay menos probabilidad de reacciones de susceptibilidad cruzada.</p> <p>Aztreonam</p>