

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

**DETECCION DE CARBAPENEMASAS TIPO
METALOBETALACTAMASA EN LA POBLACION DE *Acinetobacter
baumannii complex* RESISTENTE A IMIPENEM Y/O MEROPENEM
AISLADOS EN LAS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL
HOSPITAL ROOSEVELT.**

ROSA LIDIA CORTÉS MÉNDEZ

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2013

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

**DETECCION DE CARBAPENEMASAS TIPO
METALOBETALACTAMASA EN LA POBLACION DE *Acinetobacter
baumannii complex* RESISTENTE A IMIPENEM Y/O MEROPENEM
AISLADOS EN LAS UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL
HOSPITAL ROOSEVELT.**

Informe de Tesis

Presentado por

ROSA LIDIA CORTÉS MÉNDEZ

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

Por darme la vida dentro de un seno familiar único e irremplazable, maravilloso y de bendición para mi vida. Por rodearme de ángeles terrenales que supieron guiar mis pasos hacia este momento donde puedo honrar tu nombre y el de mis padres.

Honra a tu padre y a tu madre como el Señor tu Dios te ha mandado, para que tus días sean prolongados y te vaya bien en la tierra que el Señor tu Dios te da. (Deuteronomio 5:16)

A MI PADRE:

Ing. José Rolando Cortés Breijo, que con su amor sin medida, paciencia y cuidado guió cada uno de mis pasos, dándome las herramientas y lecciones de cómo ser mejor en la vida y siempre dar el máximo esfuerzo y de eso aun mas en los momentos de flaqueza. Hoy con amor, del que solo tú me pudiste enseñar, esfuerzo, paciencia, dedicación y fortalecida en tu memoria te doy las gracias por haber construido solidas bases en mi vida que han guiado mi caminar hacia esta nueva vida profesional plena y llena de éxito que sin ti no hubiese conocido y donde tú siempre quisiste verme.

Estudia para la vida chica! Te adoro papito!

A MI MADRE:

Sra. Silvia Yolanda Méndez Rosales, por creer en mí y que sin su amor, esfuerzo, sacrificio y dedicación en todos los momentos de mi vida no sería hoy la excelente mujer que soy, gracias por cuidar de mi cada dia y dedicarte a que no me faltara un beso y un abrazo cuando más lo necesite. Por todos tus sabios consejos y por estar siempre a mi lado

aun en los días más difíciles, por siempre pediste a Dios por mí y los míos. Mami hoy te coronó con el honor de ver concluidos tus esfuerzos que año con año dejaste en aquella farmacia y nos cegaron momentos insustituibles, mas no fue obstáculo suficiente para darme de ti siempre lo mejor.

¡El orgullo más grande que puedo tener es verte graduada! Misión cumplida mami te adoro!

A MI HERMANO:

Ing. Milton José Cortés Méndez, un ejemplo a seguir siempre en mi vida, haz sido un hermano, un padre, un compañero y un excelente amigo. Por cada aventura en nuestra infancia, por cada regaño y corrección en su momento, por cada palabra de aliento, consejo y guía, por no dejarme sola y siempre caminar a mi lado, porque contigo aprendí que significa la palabra hermano y hoy con satisfacción y gozo en mi corazón te puedo decir ingeniero veo en ti todo el sacrificio para que hoy me digas al fin licenciada, te adoro Milton eres único e irremplazable.

Vamos Rosita el último sprint no te rindas en la orilla, ya casi, vamos tu puedes! Lo logramos ingeniero! Te adoro.

A MI HIJO:

Luigi Roger Aaron Serrano Cortés, por ser motor de mi vida, desde que llegaste a revolucionarla y darle sentido a mis días, eres parte de un sueño que hoy está hecho realidad, por todo tu amor, alegría, entusiasmo y paciencia en cada uno de los mil trámites que acompañaste a mamá hacer a la universidad. *Te adoro mi vida!*

A MI ESPOSO:

Luis Giovanni Serrano Mejía, por el amor y apoyo incondicional, por animarme siempre a seguir adelante y a no darme por vencida a lo largo de esta travesía. Por su tiempo y uno que otro desvelo compartido. *Te amo!*

A MIS AMIGOS:

Licda. María Gordillo, por creer siempre en mi y darme tantas oportunidades como le fue posible, por sus consejos, apoyo, confianza amistad y cariño, hoy le puedo decir, misión cumplida! Por no solo ser mi jefa y exigir alto nivel laboral, sino también por ser mí amiga y demostrármelo tantas veces, queriendo siempre lo mejor para mí y los míos. Por siempre estar ahí para mí, la quiero mucho!

Licda. María Ruiz, por todas y cada una de sus palabras, mensajes y correos, dándome aliento y ánimos en todo momento, por su amistad demostrada a lo largo de esta travesía, por estar conmigo en los momentos más difíciles y por ayudarme a salir de ellos siempre con una sonrisa, te quiero mucho amiga!

Lic. José Cuessi, por su entusiasmo siempre proyectado a que la vida siempre será mejor luego de la graduación.

Lic. José Madrid, por los consejos, regaños, perseverancia, afecto incondicional, tiempo y todas las carreras que le hice pasar y por no permitir que me rindiera.

Sr. Jesús Corleto, por confiar y creer siempre en que llegaríamos a ver este día juntos.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por haberme abierto las puertas y en sus aulas y haber cobijado mi conocimiento con cada catedrático que me fue formando e inculcando un valor nuevo cada día. Gracias alma mater.

A MIS ASESORAS

Licda. Irma Juarez y Licda. Remei Gordillo, por todo su apoyo y colaboración en la realización de esta investigación, que sin sus directrices no estaría siendo hoy una realidad, gracias por su tiempo y siempre estar dispuestas a atenderme.

A MIS REVISORES

MSc. Blanca Samayoa y Lic. Martín Gil, por cada aporte hecho a esta investigación y por haber hecho que de una buena investigación se obtuviera como producto final un excelente trabajo de investigación.

AL HOSPITAL ROOSEVELT

En especial a la Licda. María Remei Gordillo jefe de la sección de Microbiología por permitirme el uso de las instalaciones en todo momento, acceso a su base de datos y por su valiosa colaboración y aportes durante el seguimiento y confirmación de todos los procedimientos realizados.

A LA Licda. Mónica Cruz

Por su colaboración y apoyo en la gestión de reactivos utilizados durante el proceso de este estudio de investigación.

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
	A. Definición	6
	B. Historia	6
	C. Epidemiología	7
	D. Factores de riesgo	8
	E. Brotes nosocomiales	9
	F. Mecanismos de resistencia	10
	1. Modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas	11
	a. Beta-lactamasas tipo AmpC	11
	b. Beta-lactamasas tipo Carbapenemasas	12
	2. Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa	15
	3. Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de Bombas de eflujo	16
	4. Modificación del sitio blanco	16
	G. Estudios relacionados	17
IV.	Justificación	19
V.	Objetivos	20
VI.	Materiales y Métodos	21

A.	Universo	21
B.	Muestra	21
C.	Recursos (Humano e Institucional)	21
D.	Materiales (Equipo, Reactivos, otros)	21
E.	Procedimiento	23
	1. Obtención de cepas	23
	2. Preparación del inóculo	23
	3. Metodología a seguir e interpretación de resultados	23
F.	Diseño de la Investigación	25
VII.	Resultados	26
VIII.	Discusión de Resultados	29
IX.	Conclusiones	31
X.	Recomendaciones	32
XI.	Referencias	33
XII.	Anexos	43

I. Resumen

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) es un microorganismo involucrado en brotes nosocomiales, capaz de crecer sobre casi cualquier superficie y ser resistente a condiciones adversas, lo que hace posible que desarrolle diversos mecanismos de resistencia antimicrobiana, lo cual facilita su diseminación y dificulta el tratamiento del paciente. Es de vital importancia conocer el comportamiento de este microorganismo para intervenir adecuadamente en la terapéutica del paciente infectado.

La emergencia y diseminación de la resistencia antimicrobiana es considerada actualmente un fenómeno complejo y creciente alrededor del mundo. Su importancia es tal que en 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró un problema de salud pública (World Health Organization, 1999).

El objetivo del estudio fué la determinación del mecanismo de resistencia a carbapenemasas tipo metalo-beta-lactamasas (MBL) a partir de cepas de *A. baumannii* con resistencia antibiótica a carbapenémicos (imipenem/meropenem) aisladas en las unidades de cuidado intensivo (UCI) provenientes de diversos tipos de muestras durante el periodo de enero a junio del 2,010.

La metodología del estudio incluyó 140 cepas a las cuales se le realizó la detección fenotípica de las carbapenemasas tipo MBL por medio del Test de Hodge y test de Hodge + ZnSO₄ ambos por difusión en disco y Etest MBL[®] por CIM (Concentración Mínima Inhibitoria), aplicando las normas de la CLSI (Committee of Laboratory Standards Institute). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico WHONET versión 5.0.

Los resultados obtenidos fueron: 136 aislamientos (97,1%) resistentes a imipenem y 137 aislamientos (97,9%) resistentes a meropenem, 139 aislamientos (99,3%) confirmaron la presencia de la enzima carbapenemasa y 127 aislamientos (91,4%) confirmaron la presencia del mecanismo de resistencia MBL. La muestra con mayor cantidad de aislamientos en este estudio fue el aspirado traqueal con 50 aislamientos (39,4%) y el área de cuidados críticos más afectada fue pediatría con 92 aislamientos (72,4%).

Los datos observados en el estudio proveen información para la implementación de medidas de corrección y prevención en la diseminación de este microorganismo, por ejemplo reforzando el lavado de manos, y restringiendo el uso de antibióticos que pueda inducir la resistencia a carbapenemes.

Se debe continuar con el análisis de estas cepas por métodos moleculares para poder identificar las clonas circulantes tanto intrahospitalarias como en la comunidad.

II. Introducción

El género *Acinetobacter* incluye varias especies de morfología cocobacilar Gram negativo, cuya especie representativa es *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) (Maragakis & Perl, 2008).

Las infecciones causadas por *A. baumannii* están asociadas principalmente a pacientes hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) representando una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Allen & Hartman, 2005; Manuel & cols., 2008; Marcos, 2000).

Acinetobacter es uno de los géneros nosocomiales con un patrón de resistencia extenso, aunque los carbapenemes, siguen siendo agentes confiables, la aparición de brotes resistentes ha constituido una preocupación importante en los hospitales, creando la necesidad de vigilar la aparición de cepas con multiresistencia. Los hospitales nacionales, Hospital General San Juan de Dios y Hospital Roosevelt, son de referencia en el país cuando se trata de pacientes con infecciones severas que buscan una alternativa terapéutica, pero en la mayoría de ocasiones, estos hospitales carecen de espacio físico para aislar a pacientes infectados por microorganismo resistentes, hacinándoseles en las UCI y en las salas de emergencia, induciendo la transferencia genética entre microorganismos dando como resultado cepas resistentes que se han diseminado entre los pacientes, limitándose así las alternativas terapéuticas disponibles. Se ha considerado la resistencia a carbapenemes, por sí misma, suficiente para definir un aislamiento de *A. baumannii* como altamente resistente (Kluytmans-Vandenbergh, Kluytmans, & Voss, 2005; Manuel & cols., 2008; Poirel, & Nordmann, 2006 & Richet, Mohammed, McDonald & Jarvis, 2001).

En Guatemala no existen registros epidemiológicos que indiquen específicamente el fenotipo de resistencia de *A. baumannii* aislado de pacientes en UCI, esto ha obligado a consultar datos extranjeros pudiendo incurrir en incongruencias en el protocolo terapéutico para toda la población guatemalteca. Considerando la problemática que causa la infección por *A. baumannii* en pacientes hospitalizados en UCI y la poca información en cuanto a los fenotipos de resistencia a carbapenémicos que la hacen poco tratable. En este estudio se pretendió evaluar las UCI del HR ya que ha sido de este hospital de donde se han obtenido publicaciones de la problemática emergente, además que han sido documentados brotes en áreas críticas tanto en adultos como pediatría (Mejía et al., 2008).

En este estudio se evaluaron algunos métodos que permiten conocer tanto el mecanismo de resistencia a los carbapenémicos como la identificación fenotípica de carbapenemasas tipo metalo-beta-lactamasas utilizando para ello los test de Hodge, Hodge + ZnSO₄ y el Etest MBL[®] (Lee, Chong, Shin, & et al. 2001; Yong, Lee, Yum, Shin, Rossolini & Chong, 2002).

III. Antecedentes

Conocido en 1911 como *Micrococcus calco-aceticus*, desde entonces ha tenido diversos nombres, conociéndose como *Acinetobacter* desde los años 50 (Manuel & cols, 2008).

Las infecciones causadas por este género, han sido clínicamente predominantes en países tropicales, siendo así un problema recurrente durante guerras y desastres naturales, causando recientemente epidemias hospitalarias en climas templados en varios hospitales de la región tropical. Lo más alarmante es la habilidad del microorganismo para transferir información genética adquiriendo así nuevos mecanismos de resistencia (Manuel & cols, 2008)

En Guatemala dentro del ambiente hospitalario y principalmente en las UCI, *A. baumannii* ha sido aislado en aparatos de ventilación mecánica, catéteres, líquido de diálisis peritoneal y una amplia variedad de instrumentos, constituyendo éstos reservorios epidemiológicos importantes en infecciones nosocomiales (Marcos, 2000).

Es considerado un microorganismo nosocomial con un perfil de multirresistencia extenso que incluye antibióticos clásicos como las carboxi y ureidopenicilinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, y otros más novedosos como las cefalosporinas de 3^a y 4^a generación y fluoroquinolonas. A pesar de que los carbapenemes, imipenem y meropenem, siguen siendo agentes de elección en la terapéutica hospitalaria en hospitales de referencia, la aparición de bacterias resistentes al imipenem en el HR constituye una preocupación importante que obstaculiza el manejo terapéutico adecuado (Alvarez & cols, 2005).

A. Definición

El género *Acinetobacter* incluye varias especies de bacterias de morfología cocobacilar, Gram negativo, son aerobios estrictos, no fermentadores, catalasa positivo, oxidasa negativo e inmóviles, de amplia distribución en el ambiente y que se aíslan normalmente de forma ubicua en la naturaleza, en la tierra, aguas residuales y alimentos. Crecen bien en todos los medios de cultivo de rutina y su temperatura óptima de crecimiento es de 33 a 35°C (Maragakis, & Perl, 2008 & Marcos, 2000).

El género *Acinetobacter* ha sufrido un aumento en el número de cambios taxonómicos a lo largo de la historia, lo cual ha limitado su estudio de una forma adecuada. La última definición taxonómica de *Acinetobacter* incluye 17 genoespecies, donde *A. baumannii* es la más frecuentemente aislada y con mayor importancia clínica ya que los brotes de infecciones nosocomiales documentados han sido comúnmente asociados con *A. baumannii* (Marcos, 2000).

En los seres humanos puede colonizar la piel, heridas, tracto respiratorio y tracto gastrointestinal. Algunas cepas pueden sobrevivir a la desecación durante semanas, lo que promueve la transmisión por fómites en hospitales así como la contaminación cruzada entre el personal de salud y los pacientes colonizados e infectados. (Manuel & cols, 2008)

B. Historia

La historia del género *Acinetobacter* data del siglo XX, en 1911, cuando Beijerinck, microbiólogo danés, describió un microorganismo al que llamó *Micrococcus calcoaceticus* que fue aislado del suelo tras enriquecerlo con un medio que contenía calcio-

acetato. En las siguientes décadas se describieron microorganismos similares, que se asignaron al menos 15 géneros y especies diferentes, incluyendo *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella iwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella iwoffii* var. *Glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* y *Achromobacter mucosus*. La designación actual del género, *Acinetobacter* (del griego ακινετος [akinetos], inmóvil) fue inicialmente propuesta por Brisou y Prévot en 1954 para diferenciar los microorganismos móviles de los inmóviles dentro del género *Achromobacter*, aunque no fue hasta 1968 que Bouvet y Grimont designaron al género como *Acinetobacter* que fue más ampliamente aceptado. Baumann et. al., publicaron un estudio en el que concluían que las diferentes especies mencionadas anteriormente pertenecían a un mismo género llamado *Acinetobacter* (Peleg, Seifert & Paterson, 2008).

C. Epidemiología

A.baumannii puede ser hallado en múltiples medios animados e inanimados, debido a la simplicidad en sus requerimientos de crecimiento y a la capacidad para usar una gran variedad de fuentes de carbono, a través de diversas vías metabólicas. Se le ha aislado en equipo hospitalario, como aparatos de ventilación mecánica, catéteres, líquido de diálisis peritoneal y una amplia variedad de instrumentos. Además *A. baumannii* puede formar parte de la microbiota de la piel de los adultos sanos (especialmente las manos) y puede colonizar la cavidad oral, faringe e intestino, constituyendo éstos un reservorio epidemiológico muy importante en infecciones nosocomiales (Marcos, 2000).

En los últimos años se han incrementado las infecciones nosocomiales por *A. baumannii*, algunas de estas graves como sepsis, neumonía y meningitis. No es infrecuente que algunas de estas infecciones nosocomiales aparezcan en forma de brotes. Las unidades más afectadas son las UCI y las unidades de quemados, donde el uso masivo de antibióticos puede seleccionar la aparición de cepas multirresistentes. (Marcos, 2000).

D. Factores de riesgo

Las especies de *Acinetobacter* se consideran generalmente microorganismos de baja virulencia, salvo en pacientes críticamente enfermos o inmunocomprometidos (García-Garmendia et al., 2001).

Estos microorganismos se asocian más a menudo con infecciones nosocomiales que comunitarias. En regiones tropicales se han reportado, con alguna frecuencia, neumonías adquiridas en la comunidad, que comúnmente se presentan en meses húmedos y cálidos (Allen, Chen, MZ; Hsueh, PR; Lee, LN; Yu, CJ; Yang, PC y Luh, KT. (2001)& Hartman, 2005; Chen, Hsueh, Lee, Yu, Yang & Luh, 2001).

La identificación de factores de riesgo es importante para el desarrollo de medidas de prevención de colonización e infección. Los múltiples factores identificados para la adquisición de infecciones por *Acinetobacter* incluyen enfermedad grave, infección o sepsis previa, ventilación mecánica prolongada, antibioterapia previa, colonización previa por *Acinetobacter* y estadía prolongada en UCI. Así mismo se ha asociado el uso previo de antimicrobianos con la colonización e infección por *Acinetobacter*, situación que refuerza la necesidad de un uso prudente de los antimicrobianos (Allen & Hartman, 2005; Fagon, Chastre, Domart, Trouillet, Pierre & Darne, 1989; García-Garmendia, et al., 2001;

Husni, et al., 1999; Lortholary, et al., 1995; Mahgoub, Ahmed & Glatt, 2002; Mulin, et al., 1995).

Otros factores de riesgo, como la ventilación prolongada y la estadía en UCI, no serían específicos para *Acinetobacter*, sino que más bien estarían relacionados a la enfermedad subyacente del paciente. Por ejemplo, diversos factores de riesgo para infecciones del torrente sanguíneo por *Acinetobacter* son indistintos de los asociados con bacteriemias debidas a otros bacilos gram negativo. Cuando se comparan otros factores de riesgo para bacteriemias ocasionadas por bacilos gram negativo y *Acinetobacter*, tales como presencia de dispositivos intravasculares, nutrición parenteral o neutropenia, no se encuentran diferencias significativas. (Wisplinghof, 200)

E. Brotes nosocomiales

A. baumannii se ha convertido en las últimas dos décadas en uno de los patógenos nosocomiales más relevantes, y es la causa de numerosas epidemias en hospitales de todo el mundo, afectando especialmente a pacientes críticos ingresados en la UCI. (Bergogne, 2001)

El control de estas epidemias resulta extremadamente difícil debido a la elevada capacidad de *A. baumannii* para persistir en el ambiente hospitalario y por su frecuente multirresistencia a los antibióticos. Es por tanto habitual que los brotes epidémicos deriven hacia situaciones endémicas si no se toman las medidas de control adecuadas rápidamente. Estos brotes obedecen a la contaminación de los equipos de ventilación, humidificadores, colchones y la utilización de agentes antimicrobianos específicos (Bergogne-Berezin & Towner, 1996; Cefai, Richards, Gould & McPeake, 1990; Gervich & Grout, 1985;

Landman, et al., 2002; Sherertz & Sullivan, 1985; Weernink, Severin, Tjernberg, & Dijkshoorn, 1995).

Aunque los patrones de resistencia varían de una región a otra, en los últimos años, la frecuencia de aislamientos positivos para *A. baumannii* resistente a los carbapenemes ha ido en aumento (Afzal-Shah & Livermore, 1998; Gales, Jones, Forward, Linares, Sader & Verhoef, 2001; Hsueh, et al., 2002; Mahgoub, Ahmed & Glatt, 2002; Smolyakov, et al., 2003).

En el Hospital Roosevelt, se puede citar como referencia el aumento progresivo de la resistencia dado que, para 1995 la resistencia de este *A. baumannii* para los carbapenemes (imipenem y meropenem) era del 9%, para el 2001 del 37%, para el 2004 del 40% y para el periodo del 2008-2009 se observa el incremento hasta un 87%. (Gordillo, 2010).

F. Mecanismos de resistencia

La resistencia a antimicrobianos entre las distintas especies de *Acinetobacter* se ha incrementado de manera sustancial en la última década. Su capacidad para adquirir resistencia a múltiples antimicrobianos puede deberse a la relativa impermeabilidad de su membrana externa y a la exposición ambiental a un gran reservorio de genes de resistencia. La resistencia a los carbapenemes ocurre por la combinación de dos o más mecanismos de resistencia y rara vez por la acción de un mecanismo único. (Lockhart, 2007).

Los principales mecanismos de resistencia que afectan a la especie *Acinetobacter* son: 1) modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas, 2) disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa debido a

la disminución en la expresión de porinas, 3) aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de eflujo y 4) modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico.

1. Modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas

Las dos beta-lactamasas que con mayor frecuencia pueden llevar a resistencia a los carbapenemes son las del grupo AmpC y las carbapenemasas.

a. Beta-lactamasas tipo AmpC

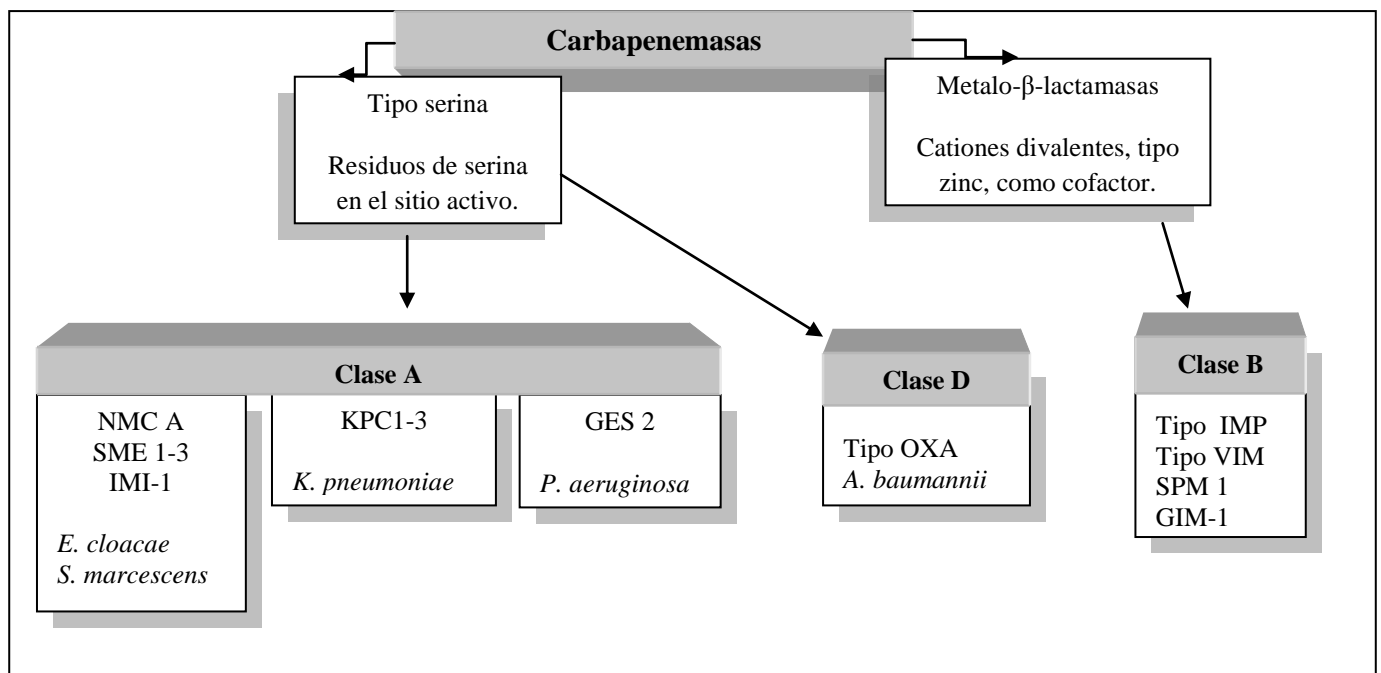
También llamadas cefalosporinasas, median la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefemicinas (cefoxotín y cefotetán) e inhibidores de beta-lactamasas. Algunas bacterias Gram negativo, como *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, poseen el gen ampC en los cromosomas, mientras otras bacterias, como *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp., han adquirido el gen a través de plásmidos (Helfand, & Bonomo, 2003; Jacoby & Muñoz-Price, 2005 & Philippon, Arlet & Jacoby, 2002).

Las beta-lactamasas tipo AmpC presentan baja afinidad a los carbapenemes; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplasmático permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se registre resistencia a los carbapenemes (Bradford, Urban, Mariano, Projan, Rahal, & Bush, 1997; Lee, Nicolas, Kitzis, Pialoux, Collatz, & Gutmann, 1991 & Livermore, 2002).

b. Beta-lactamasas tipo Carbapenemasas

Se han descrito dos tipos de carbapenemasas con base en estudios moleculares. El primer grupo son enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual se han denominado carbapenemasas tipo serina. El segundo grupo son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática siendo denominadas metalo-beta-lactamasas, en la Figura 1 se observa la clasificación de las carbapenemasas según Ambler. (Walsh, Toleman, Poirel & Nordmann, 2005).

Figura 1: Clasificación basada en la propuesta de Ambler



Disponible en: www.docstoc.com/docs/3269096

Las serin-carbapenemasas clase A del tipo Sme, IMI-1 y NMC-A comparten algunas características tales como: 1) Poseen una mayor capacidad hidrolítica contra imipenem que meropenem; 2) a diferencia de las metalo-beta-lactamasas, confieren resistencia a aztreonam, pero no a las cefalosporinas de 3ª generación; 3) son inhibidas por el ácido

clavulánico, y 4) se encuentran en los cromosomas, se pueden inducir y sólo han encontrado en unas pocas cepas de *Enterobacteriaceae*. (Livermore, 1995).

Las serin-carbapenemasas del tipo KPC fueron descritas muy recientemente donde, hasta el momento, todos sus genes codificadores se han encontrado en plásmidos. Todas las KPC presentan gran actividad hidrolítica contra aminopenicilinas, ureidopenicilinas, aztreonam y los carbapenemes, y baja actividad hidrolítica contra las cefalosporinas de tercera generación (Nordmann & Poirel, 2002).

La serin-carbapenemasa del tipo GES-2 aparece por una sustitución sencilla de aminoácidos de la GES-1 que pertenece al grupo de betalactamasas de espectro extendido no derivadas de TEM o SHV (Jones, 2001).

Las carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas) se han caracterizado principalmente en *A. baumannii*. El espectro de actividad entre todas las oxacilinasas es bastante similar, puesto que hidrolizan débilmente imipenem y meropenem, no hidrolizan ni cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam, a excepción de OXA 27, y todas son predominantemente penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a oxacilina. Son inhibidas por el ácido clavulánico, a excepción de OXA 23 que es resistente. A pesar de que hasta la fecha las oxacilinasas no han recibido tanta atención como las metalo-beta-lactamasas, es importante considerarlas como potencialmente peligrosas, pues aunque su actividad carbapenemasa es pobre, se incrementa si otros mecanismos de resistencia están presentes; como bombas de eflujo o disminución en la permeabilidad ocasionada por cambios en las porinas o por modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas (Helfand & Bonomo, 2003; Heritier, Poirel, Lambert & Nordmann, 2005; Livermore, 2002 & Nordmann & Poirel, 2002).

Por otro lado, las metalo-beta-lactamasas incluidas en la clase B tienen dos familias importantes, la VIM y la IMP, y aunque poseen baja homología en su secuencia de aminoácidos (aproximadamente 30%), tienen propiedades similares. Estas metalo-beta-lactamasas son transferibles puesto que su gran mayoría se encuentran en genes casetes localizados principalmente en integrones tipo 1 y, en algunas ocasiones, se encuentran en plásmidos o transposones. Habitualmente, estas enzimas están asociadas con otros genes de resistencia ubicados en los mismos genes casetes, lo cual les permite ser resistentes a múltiples antibióticos. Las metalo-beta-lactamasas se caracterizan por generar resistencia a los beta-lactámicos (oxiimino cefalosporinas, cefamicinas, carbapenem), aminoglucósidos y quinolonas, y presentan sensibilidad variable al aztreonam. Aunque el grado de resistencia a imipenem varía, CIM entre 4 mg/dl y 128 mg/dl, la resistencia a ceftazidima es de alto grado, con CIM > 64 mg/dl (Bradford, et al., 1997; Senda, et. al., 1996 & Takahashi, et. al., 2000).

Actualmente, ambas familias de metalo-beta-lactamasas están ampliamente diseminadas en cuanto a variedad de especies, aunque se hallan más comúnmente en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. También se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial y han sido detectadas en cerca de 28 países y 5 continentes. (Crespo, et. al., 2004 & Villegas, M; Lolans, K; Olivera, et al., 2006).

Por lo anterior, las metalo-beta-lactamasas median un mayor grado de resistencia comparadas con las serin-carbapenemasas y son objeto de una intensa búsqueda en el presente. Las metalo-beta-lactamasas pueden inhibirse experimentalmente con quelantes de metal como EDTA y los compuestos basados en tiol. El uso de betalactámicos como ceftazidime e imipenem en combinación con EDTA o ácido 2-mercaptopropiónico (MPA)

con técnicas proximales de difusión en disco se ha descrito para el descubrimiento de metalo-beta-lactamasas (Livermore & Woodford, 2000).

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

Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativo que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Los carbapenemes llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión. Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenemes. De esta manera, la velocidad de acumulación de los carbapenemes en el espacio periplasmático disminuye notablemente. Normalmente, la pérdida de porinas no confiere una resistencia franca y sólo eleva los valores de la CIM para carbapenemes sin superar los puntos de corte que determinan resistencia. (Nordmann, 1998).

En las especies de *Enterobacteriaceae*, son varias las porinas que participan en el transporte de carbapenemes; aparentemente, las porinas de gran tamaño son las más importantes en este proceso y son, entonces, las que deben perderse para disminuir significativamente la permeabilidad de la membrana externa a los carbapenemes. (Bradford, et al., 1997; Lincopan, Mcculloch, Reinert, Cassettari, Gales & Mamizuka, 2005 & Yamaguchi, Nukuga & Sawai, 1994).

De igual forma sucede en *A. baumannii*, en el cual varias porinas han sido asociadas al transporte de β -lactámicos incluyendo los carbapenemes. Aunque la pérdida de estas porinas ayuda al surgimiento de resistencia, en esta bacteria no es el mecanismo más importante. Por otro lado, en *P. aeruginosa*, una porina específica de sustrato, llamada OprD, es la encargada de transportar los carbapenemes a través de la membrana externa. Su pérdida eleva considerablemente la CIM de imipenem y, en menor grado, la de meropenem (Hancock, 1997 & Woodford, et. al., (2004).

3. Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos. La expresión de estas bombas puede ser permanente (expresión constitutiva) o intermitente (expresión que puede inducirse). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna bomba de eflujo capaz de expulsar al imipenem. En *P. aeruginosa*, el sistema de eflujo Mex AB OprM es capaz de transportar meropenem y su expresión exagerada conduce a la elevación de la CIM del antibiótico. En *A. baumannii* los sistemas de eflujo se han descrito mediando resistencia a las quinolonas pero, hasta el momento, no se han asociado con resistencia a los carbapenemes. (Livermore, 2002; Sato & Nakae, 1991 & Woodford, et. al., 2004).

4. Modificación del sitio blanco

El sitio blanco de los carbapenemes, y de todos los betalactámicos, son las proteínas unidoras de penicilinas (PUP), macromoléculas que hacen parte de la membrana

citoplasmática y participan en la síntesis de la pared bacteriana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los betalactámicos, pero que no afectan su actividad funcional. Aunque la producción de proteínas unidoras de penicilinas con baja afinidad por los betalactámicos no es un mecanismo de resistencia común entre los Gram negativo, el número de reportes se ha incrementado en los últimos años (Grkovic, Brown & Skurray, 2002).

Recientemente, en *A. baumannii* se describió que la ausencia de dos proteínas unidoras de penicilinas, una de 73,2 kd (PUP2a) y otra de 70,1 kd (PUP2b), se relaciona con resistencia de bajo grado a imipenem, meropenem o ambos (Poole, 2004).

G. Estudios relacionados

En Londres, Livermore, D en 1995, estudió las β -lactamasas de *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacter* sp. descubriendo que, durante un tratamiento antipseudomonal con antibióticos lábiles poco inductores, se puede dar selección parcial o total en mutantes derreprimidos. Otros mecanismos de resistencia son, impermeabilidad, eflujo, alteración del blanco de DNA girasa, hiperproducción de cefalosporinas y modificación de PBP.

En Guatemala, Hernández, C en 2002, realizó un estudio de resistencia en microorganismos nosocomiales en las unidades de intensivo pediátrico en el Hospital General San Juan de Dios, encontrando *A. baumannii* con una resistencia del 3.6 % con resistencia a aminoglucósidos y 10% a cefalosporinas (no fue probado imipenem).

En Guatemala Cuellar, M., en 2003, realizó un estudio de la susceptibilidad de los microorganismos no fermentadores en el Hospital Regional de Occidente “San Juan de Dios”. Determinó que la mayor cantidad de aislamientos pertenecían a las UCI siendo los dos microorganismos con mayor frecuencia aislados *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, para los mismos fue probado imipenem obteniendo una susceptibilidad del 94% para *P. aeruginosa* y del 98% para *A. baumannii*.

En Guatemala, Rosales, M., en 2004, realizó un estudio de determinación de susceptibilidad en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* con 638 aislamientos de muestras obtenidas de pacientes hospitalizados en el Hospital General San Juan de Dios, donde la mayor cantidad de aislamientos fueron obtenidos de las UCI y se determinó la resistencia a carbapenemes con un 25%.

IV. Justificación

A. baumannii ha sido considerado patógeno responsable de infecciones nosocomiales graves en UCI y debido a su compleja resistencia, limitan de manera significativa el tratamiento. Aunque los carbapenemes siguen siendo el tratamiento más eficaz frente a estas infecciones, la descripción de cepas multirresistentes ha sido más frecuente y agudiza el problema en infecciones que involucran a más de un microorganismo.

Este aumento en la resistencia radica en los múltiples brotes nosocomiales, el hacinamiento de pacientes infectados, la falta de lavado de manos, la práctica inadecuada en el uso de antimicrobianos, la falta de conocimiento de los mecanismos de resistencia que este género posee, entre otros. Lo anterior remarca la importancia de realizar informes periódicos que provean los perfiles de resistencia que orienten al médico al momento de la elección del medicamento más adecuado. (Kluytmans-Vandenbergh, Kluytmans, & Voss, 2005; Manuel & cols., 2008; Poirel, & Nordmann, 2006 & Richet, Mohammed, McDonald & Jarvis, 2001).

Es importante la determinación del fenotipo de *A. baumannii* con respecto a la presencia de carbapenemasas tipo metalobetalactamasas para proveer información de la cepas que muestran mayor resistencia a carbapenemes de acuerdo al tipo de muestra y su variación en pacientes adultos y pediátricos.

De tal manera que este estudio tuvo por objeto el determinar la presencia de carbapenemasas tipo MBL en cepas de *A. baumannii* aisladas en las UCI del HR resistentes a imipenem/meropenem para establecer medidas de contención de brotes causados por este microorganismo.

V. Objetivos

A. General

Determinar la presencia de carbapenemasas tipo metalobetalactamasas en cepas de *A. baumannii* resistente a imipenem y/o meropenem aisladas en unidades de cuidado intensivo del Hospital Roosevelt.

B. Especificos

1. Determinar la frecuencia de cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem/meropenem, positivos a carbapenemasas.
2. Determinar la frecuencia de cepas de *A. baumannii* con mecanismo de resistencia del grupo B de Amber a través de la tipificación fenotípica de las metalo-beta-lactamasas.
3. Determinar la frecuencia de *A. baumannii* positivos a carbapenemasas tipo metalo-beta-lactamasas por tipo de muestra.
4. Determinar la variación en la resistencia de *A. baumannii* en pacientes adultos y pediátricos.

VI. Materiales y Métodos

A. Universo

Todas las cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem, aislados en el Hospital Roosevelt de enero a junio de 2010

B. Muestra

Aislamientos de *A. baumannii* resistentes a imipenem/meropenem, provenientes de las UCI.

C. Recursos

1. Recurso Humano

- a. Investigadora: Rosa Lidia Cortés Méndez
- b. Asesora: Licda. Irma Juárez Mencos
- c. CoAsesora: Licda. Maria Remei Gordillo

2. Recursos Institucionales

Sección de Microbiología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Roosevelt Guatemala.

D. Materiales

1. Equipo

- a. Refrigerador
- b. Congelador
- c. Incubadora

- d. Densitómetro
- e. Incinerador o Mechero
- f. Pipetas volumétricas
- g. Caliper (medidor de halos)
- h. Pinzas

2. Reactivos

- a. Placas con Agar Sangre
- b. Placas con Agar MacConkey
- c. Placas con Agar Müeller Hinton
- d. Tubos con Caldo Müeller Hinton
- e. Discos de imipenem 10 µg
- f. Discos de meropenem 10 µg
- g. Agua molecular
- h. ZnSO₄ en polvo
- i. Tiras de Etest MBL
- j. Cepa ATCC *E. coli* 25922

3. Otros

- a. Asas descartables
- b. Hisopos de dacrón
- c. Tips estériles
- d. Guantes descartables
- e. Bata
- f. Papel mayordomo
- g. Toallas desinfectantes.

E. Procedimiento

1. Obtención de cepas

Aislamientos resistentes a imipenem/meropenem provenientes de diversas muestras clínicas, que incluyó muestras de heridas (purulentas), orina, sangre, muestras de tracto respiratorio, diversos líquidos corporales y secreciones varias recolectadas de los pacientes hospitalizados en las unidades de cuidado intensivo. Los servicios a incluirse fueron las unidades de cuidado intensivo de neonatos (alto riesgo (AR) y mínimo riesgo (MR)), pediatría (unidad de cuidados intensivos (UCIP) e intermedios UCIM)) y adultos (unidad de cuidado intensivo (UTIA) y observación) del HR durante enero a junio de 2010.

2. Preparación del inóculo

Antes de cualquier prueba, las cepas fueron reanimadas por medio de subcultivos en agar sangre (dos pases) y luego fueron purificadas en agar MacConkey en incubación a 36°C por 24 hrs.

3. Metodología a seguir e interpretación de resultados

a. Determinación de la susceptibilidad antibiótica

Se utilizó la información obtenida por el antibiograma del equipo semi-automatizado Vitek 1, marca Biomerieux[®], tomando en cuenta los aislamientos que tuvieron un resultado de imipenem/meropenem ≥ 16 mg/dl.

b. Detección fenotípica de carbapenemasas tipo metalo-beta-lactamasas

Todos los aislamientos se analizaron mediante los test fenotípicos de Hodge, Hodge + ZnSO₄ y Etest MBL (Lee, et al., 2001 & Lee, Lim, Yong, Yum & Chong, 2003).

i. Para evaluar la producción de carbapenemasas se utilizó la técnica de Hodge.

Este ensayo se basó en la técnica de difusión en disco, realizando una solución al 0.5 McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922, esta solución es aplicada a una placa con agar Müeller-Hinton con un hisopo de dacrón en tres direcciones opuestas, formando un tapete, cubriendo toda la superficie del agar, al centro se colocó un disco de sensibilidad de imipenem de 10 µg, por último se realizó una estría con la cepa en estudio de *A. baumannii*, partiendo de la orilla del disco hacia afuera (Anexo 1). El resultado positivo de la prueba fue un halo de inhibición alrededor del disco donde se vio disminuido en presencia de una estría de *Acinetobacter* productor de carbapenemasa. Transcurrido el tiempo de incubación (18 a 24 hrs) a 35°C, la carbapenemasa se produjo y fue secretada al medio extracelular, permitiendo el crecimiento en las proximidades de la estría de la cepa sensible de *E. coli*, lo que dió lugar a la deformación del halo.

ii. Para evaluar la producción de metalo-beta-lactamasas se utilizó la técnica de Hodge + ZnSO₄ y Etest MBL.

La técnica de Hodge + ZnSO₄: Esta técnica a diferencia de la anterior utilizó además del disco de imipenem de 10 µg, 140 µl solución preparada de ZnSO₄ (0,4 gr ZnSO₄ en 1 ml de agua molecular) que se colocó directamente al disco de imipenem, esto con la finalidad de evidenciar las carbapenemasas por quelantes de cationes divalentes (MBL), el resto de la técnica fue igual que la descrita anteriormente.

El método del Etest MBL: consistió en la utilización de unas tiras comercializadas que por un extremo están impregnadas con imipenem (IP) a diferentes concentraciones y por el otro con imipenem + EDTA (IPI). Se interpretó una prueba MBL positiva cuando se observó una disminución de ≥ 3 log en la CMI del imipenem en presencia del EDTA en relación con la CMI de imipenem sin el inhibidor (Anexos 2 y 3).

Para confirmar la presencia de carbapenemasas tipo MBL, fue necesario obtener el resultado positivo en ambos test, tanto en el test de Hodge + ZnSO₄ como en el Etest MBL, si el primero daba positivo y el segundo negativo, se consideraba negativa la presencia de MBL y viceversa.

F. Diseño de la Investigación

Estudio retrospectivo, con un muestreo por conveniencia, que se trabajó con 140 aislamientos de *A. baumannii* resistentes a imipenem/meropenem, obtenidos de distintos tipos de muestras que fueron remitidos al laboratorio de microbiología por las UCI del HR en el período de enero a junio de 2010.

Este estudio evaluó la presencia del mecanismo de resistencia carbapenemasa tipo MBL circulante en UCI. Para el análisis de los datos se utilizó el método estadístico descriptivo para determinar las frecuencias de presencia y ausencia de carbapenemasas. Además se efectuó un análisis descriptivo y comparativo de la frecuencia de la presencia de carbapenemasas según tipo de muestra y servicio (tipo de intensivo) con la ayuda del programa estadístico WHONET[®] versión 5.0.

VII. Resultados

Se analizó un total de 140 cepas de *A. baumannii* aisladas de distintos tipos de muestras de pacientes en UCI durante el periodo enero - junio de 2,010. De estas, se observó el perfil de resistencia inicial de la siguiente manera: 3 aislamientos (2,1%) resistentes para imipenem, 4 aislamientos (2,9%) resistentes para meropenem y 133 aislamientos (95%) resistentes a ambos. (Ver tabla 1)

Tabla 1: Perfil de resistencia inicial para imipenem/meropenem en 140 aislamientos de *A. baumannii* obtenidos de pacientes en UCI/HR.

	Imipenem		Meropenem		Imipenem/ Meropenem	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Resistente	136	(97,1)	137	(97,9)	133	(95,0)
Intermedio	3	(2,1)	1	(0,7)	NA*	NA*
Sensible	1	(0,7)	2	(1,4)	NA*	NA*

*NA: No Aplica

Fuente: Datos proporcionados por equipo semiautomatizado Vitek 1, Microbiología/Hospital Roosevelt.

En el segundo análisis se observó, presencia de la enzima carbapenemasa en 139 aislamientos (99,3%) y en 1 aislamiento (0,7%) ausencia de la misma (Ver tabla 2).

Tabla 2: Detección fenotípica de carbapenemasas en aislamientos de *A. baumannii* resistente a imipenem/meropenem obtenidos de pacientes en UCI/HR (n = 140).

	Test de Hodge	
	(n)	(%)
Positivo	139	(99,3)
Negativo	1	(0,7)

Fuente: Datos experimentales, metodología por difusión en agar.

Al realizar la detección fenotípica del mecanismo de resistencia tipo MBL en 139 cepas positivas para la enzima carbapenemasa, se detectó la presencia del mecanismo MBL en 127 cepas (91.4%) por ambos métodos evaluados. (Ver tabla 3)

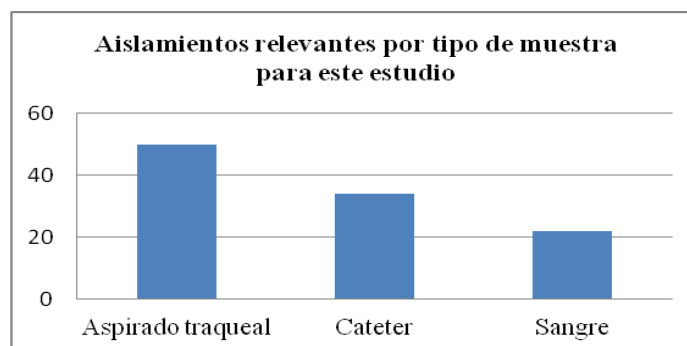
Tabla 3: Detección fenotípica del mecanismo de resistencia tipo MBL en aislamientos de *A. baumannii* positivos a la enzima carbapenemasa obtenidos de pacientes en UCI/HR (n = 139).

	Positivo		Negativo		Intermedio	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Hodge + ZnSO₄	131	(94,2)	8	(5,7)	0	0
Etest MBL	127	(91,4)	2	(1,4)	10	(7,2)
Conclusión	127	(91,4)	12	(8,6)	.-.	.-.

Fuente: Datos experimentales, metodología por difusión en agar.

Al analizar las 127 cepas MBL+ por tipo de muestra, se observó que los tipos más frecuentes fueron, 50 (39,4%) de aspirado traqueal, 34 (26,8%) de catéter y 22 (17,3%) de sangre. (Ver Grafico 1).

Grafico 1: Aislamientos MBL+ por tipo de muestra obtenida de pacientes en UCI/HR (n = 127)



Fuente: Datos experimentales

En el análisis de los 127 aislamientos de *A. baumannii* MBL+ por servicio se observó a UCI de pediatría con 92 aislamientos (72,5%) y a UCI de adultos con 35 aislamientos (27,5%). En UCI de pediatría la mayor cantidad de aislamientos se obtuvieron de UCIM y UCIP con 20,5% y 33,1% respectivamente. (Ver tabla 4).

Tabla 4: Frecuencia de aislamientos de *A. baumannii* carbapenemasa tipo MBL + en UCI por servicio. (n=127)

SERVICIO	(n)	(%)
Adultos	35	27,5
UTIA	22	17,3
Obs. Ad.	13	10,2
Pediatría	92	72,5
AR	14	11,0
MR	10	7,9
UCIM	26	20,5
UCIP	42	33,1
Total	127	100

Fuente: Datos experimentales

VIII. Discusión de Resultados

Las infecciones por *A. baumannii* multirresistente presentan gran preocupación a nivel mundial ya que este bacilo ha emergido como patógeno importante en pacientes hospitalizados en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) por presentar diferentes mecanismos de resistencia que dificultan su tratamiento, alargan la estancia hospitalaria y aumenta la mortalidad. Hasta ahora en Guatemala no se cuenta con estudios que especifiquen los mecanismos de resistencia para este patógeno, por tal razón se considera importante motivo de estudio el determinar la presencia de carbapenemasa tipo metalobetalactamasa (MBL) en pacientes de UCI específicamente para Hospital Roosevelt ya que en dicho nosocomio se han reportado brotes importantes por este patógeno (Mejía et al., 2008).

En el estudio de UCI del Hospital Roosevelt se evaluaron 140 cepas puras de *A. baumannii* provenientes de aislamientos clínicos diversos, siendo los principales y de mayor relevancia en este estudio, el aspirado traqueal (39,4%), catéter (26,8%) y sangre (17,3%). La UCI Pediátrica se determinó como la unidad generadora de mayor cantidad de aislamientos positivos 92 (72,5%), esto coincide con lo que se reporta en otros estudios donde se mencionan las condiciones críticas de este tipo de paciente lo que los hace más vulnerables a contraer infecciones por este patógeno multirresistente. (Pedroza, Cuotto, Velázquez, Torres & Rodríguez Lemoine, 2002).

El aislamiento de cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenemes es cada vez más frecuente, sobre todo en el Sur de Europa, así también en América Latina como en Brasil y Colombia. El porcentaje global de susceptibilidad encontrado en este estudio determinó que 97% de las cepas evaluadas presentaron resistencia a carbapenemes una resistencia

alarmante para nuestro país ya que para otros países latinoamericanos como por ejemplo Bolivia su resistencia no supera el 40% (Fernández E. et al, 2009)

Las carbapenemasas son enzimas consideradas responsables del aumento de la resistencia no solo a imipenem sino también a meropenem (Nordman P & Piorel L., 2002). En este estudio se demostró como la presencia de la enzima carbapenemasa en *A. baumannii* no solo se manifiesta cuando existe una resistencia en ambos carbapenemicos, imipenem/meropenem, 95.0% (n=133), sino también puede presentarse en monorresistencia a uno solo de los mismos, imipenem 2.14% (n=3), o meropenem 2.86% (n=4).

Los test fenotípicos que permiten determinar la presencia de carbapenemasas del tipo MBL son fáciles de realizar. Los test de Hodge, Hodge+ZnSO₄ y tiras de Etest MBL[®] ofrecieron resultados claros y fácilmente interpretables. Los test fenotípicos descritos son utilizados como técnicas rápidas de laboratorio para la detección de carbapenemasas y esto lo encontramos en varios trabajos publicados (Gallego L. et al, 2004; Orquidea-Pinzon J. et al, 2006). A pesar de la utilidad de los test fenotípicos los resultados obtenidos en este estudio indican y apoyan la sugerencia de otros autores con respecto a la necesidad de realizar también test de identificación genética para la caracterización específica de nuevas carbapenemasas de tipo OXA, datos que serian de utilidad en nuestro país ya que aun no se cuenta con estudios de este tipo y podrían mejorar las alternativas terapéuticas.

IX. Conclusiones

1. La existencia de carbapenemasas tipo MBL+ en *A. baumannii* en cepas aisladas en las áreas de cuidado intensivo del Hospital Roosevelt, presentó mayor resistencia de ambos carbapenémicos (imipenem/meropenem) y no a uno solo de éstos (imipenem o meropenem) en los aislamientos estudiados.
2. Este estudio confirma que el 99% de las cepas evaluadas, poseen la enzima carbapenemasa quien le confiere multirresistencia.
3. El mecanismo de resistencia tipo MBL se obtuvo por arriba del 90% en los aislamientos evaluados en este estudio.
4. Las cepas de *A. baumannii* que presentan carbapenemasas tipo MBL+ fueron más frecuentes en muestras que provenían de aspirado traqueal.
5. *A. baumannii* carbapenemasas tipo MBL+ se aisló con mayor frecuencia en UCI de Pediatría que en UCI de Adultos, esto por la vulnerabilidad de los pacientes pediátricos.

X. Recomendaciones

1. Implementar métodos sencillos de detección para carbapenemasas tipo MBL como mecanismo de resistencia en *A. baumannii* en todos los laboratorios hospitalarios del país y/o de referencia, que provean una mayor información para un tratamiento terapéutico adecuado.
2. Se recomienda que todas las cepas no susceptibles o resistentes a Imipenem o Meropenem sean evaluadas en forma rutinaria para determinar la presencia de carbapenemasa y la posible producción de MBLs mediante el sistema de rastreo con tiras de Etest MBL[®].
3. Realizar estudios posteriores que se enfoquen en genotipificación de cepas de *A. baumannii* para evaluar por métodos moleculares las clonas circulantes en las UCI del hospital Roosevelt y ampliarlo a todo el país.
4. Implementar nuevos planes estratégicos de educación continua para el personal médico (estudiantes y profesionales), paramédico (enfermería y auxiliares de hospital) y de laboratorio (técnicos y profesionales), acerca de las medidas de bioseguridad, lavado de manos y actualización de nuevos mecanismos de resistencia con el fin de contener la diseminación de estas infecciones multirresistentes.

XI. Referencias

Afzal-Shah, M y Livermore, DM. (1998). *Worldwide emergence of carbapenem resistant Acinetobacter spp.* J Antimicrob Chemother. 41: 76-7.

Allen, DM y Hartman, BJ. (2005). *Acinetobacter Species.* (6 ed.). Philadelphia: Elsevier Churchill.

Alvarez-Osorio y cols. (2005) *Actuación en brotes de infección nosocomial causados por Acinetobacter baumannii Multirresistente.* Hospital de Poniente. España: El Ejido, Almería.

Bailey, R; Scott, E. (1970). *Diagnostic microbiology.* Third edition. The C.V Mosby Company Saint Louis. (p161-163).

Bergogne-Berezin, E y Towner, KJ. (1996). *Acinetobacter spp., as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features.* *Revista Clinic Microbiologic*, 9, 148-65.

Bergogne-Berezin, E. (2001). *The increasing role of Acinetobacter species as nosocomial pathogens.* *Curr Infect Dis Rep*, 3:440-4.

Bradford, P; Urban, C; Mariano, N; Projan, SJ; Rahal, JJ y Bush, K. (1997). *Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC betalactamase, and the loss of an outer membrane protein.* *Antimicrob Agents Chemother*, 41:563-9.

Cefai, C; Richards, J; Gould, FK y McPeake, P. (1990). An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilator equipment. *J Hosp Infect*, 15: 177-82.

Chen, MZ; Hsueh, PR; Lee, LN; Yu, CJ; Yang, PC y Luh, KT. (2001). Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Chest*, 120: 1072-7.

Crespo, M; Woodford, N; Sinclair, A; Kaufmann, M; Turton, J; Glover, R; Velez, J; Castañeda, C; Recalde, M y Livermore, D. (2004). Outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*, 42:5094-5101.

Fagon, JY; Chastre, J; Domart, Y; Trouillet, JL; Pierre, J y Darne, C. (1989). Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis*, 139: 877-84.

Fernandez-Cuenca, F; Martinez-Martinez, L; Conejo, MC; Ayala, JA; Perea, EJ y Pascual, A. (2003). Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 251:565-74.

Gales, AC; Jones, RN; Forward, KR; Linares, J; Sader, HS y Verhoef, J. (2001). Emerging importance of multidrugresistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis*, 32 (Suppl 2): S104 -S13.

García-Garmendia, JL; Ortiz-Leyba, C; Garnacho-Montero, J; Jiménez-Jiménez, FJ; Pérez-Paredes, C; Barrero-Almodóvar, AE; et al. (2001). Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis*, 33: 939-46.

Gervich, DH y Grout, CS. (1985). An outbreak of nosocomial *Acinetobacter* infections from humidifiers. *Am J Infect Control*, 13: 210 -5.

Gordillo M. (2010). Análisis estadístico 2007-2009 debido a la problemática que tienen las Unidades de Cuidados Intensivos con la presencia de *A. baumannii*. Depto. Microbiología. Guatemala: Hospital Roosevelt.

Grkovic, S; Brown, MH y Skurray, RA. (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66:671-701.

Hancock RE. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol*, 5:37-42.

Helfand, MS y Bonomo, RA. (2003). Beta-lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 3:9-23.

Heritier, C; Poirel, L; Lambert, T y Nordmann, P. (2005). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacilinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:3198-202.

Hsueh, PR; Teng, LJ; Chen, CY; Chen, WH; Yu, CJ; Ho, SW; et al. (2002). Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis*, 8: 827-32.

Husni, RN; Goldstein, LS; Arroliga, AC; Hall, GS; Fatica, C; Stoller, JK; et al. (1999). Risk factors for an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter* nosocomial pneumonia among intubated patients. *Chest*, 115: 1378-82.

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>

Jacobs, C; Frere, J y Normark, S. (1997). Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gramnegative bacteria. *Cell*. 88:823-32.

Jacoby, G y Munoz-Price, LS. (2005). The new β -lactamases. *N Engl JM*, 352:380-91.

Jones, R (ED). (2001). Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobial Program. *Clin Infect Dis*, 32:S81-156.

Kluytmans-Vandenbergh, M; Kluytmans, J y Voss, A. (2005). Dutch guideline for preventing nosocomial transmission of highly resistant microorganisms (HRMO). *Infection*, 5/6:309-313.

Landman, D; Quale, JM; Mayorga, D; Adedeji, A; Vangala, K; Ravishankar, J; et al. (2002). Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med*, 162: 515-20.

Lee, E; Nicolas, M; Kitzis, M; Pialoux, G; Collatz, E y Gutmann, L. (1991). Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemothe*, 35: 1093-8.

Lee, K; Chong, Y; Shin, H; et al. (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol and Infect*, 7: 88 - 102.

Lee, K; Lim, Y; Yong, D; Yum, J y Chong, Y. (2003). Evaluation of the Hodge test and the imipenem- EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*, 41: 4623-4629.

Lincopan, N; Mcculloch, JA; Reinert, C; Cassettari, VC; Gales, AC y Mamizuka, EM. (2005). First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol*, 43:516-9.

Livermore D. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Londres: *Clin Microbiol Rev*, 8:557-84.

Livermore, D. (1997). Acquired carbapenemases. Londres: *J Antimicrob Chemother*, 39:673-6.

Livermore, D y Woodford, N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol*, 3: 489-95

Livermore, D. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, 34:634-40.

Livermore, D. (2002). The impact of carbapenemases on antimicrobial Development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*, 3:218-24.

Lockhart, S; Abramson, M; Beekmann, S; Gallagher, G; Riedel, S; Diekema, D; et al. (2007). Antimicrobial resistance among gram negative bacilli as causes of infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol*, 45:3352-9.

Lortholary, O; Fagon, JY; Hoi, A; Slama, M; Pierre, J; Giral, P; et al. (1995). Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis*, 20: 790-6.

Mahgoub, S; Ahmed, J y Glatt, A. (2002). Completely resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 23: 477-9.

Mahgoub, S; Ahmed, J y Glatt, AE. (2002). Underlying characteristics of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii*. *Am J Infect Control*, 30: 386-90.

Manuel, J y cols. (2008). Infeccion por *Acinetobacter*. *Journal Club Residentes de Familia*.

Maragakis, L y Perl, T. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. *Clin Infect Dis*, 46:1254-63.

Marcos, M. (2000). *Acinetobacter baumannii*. Depto. De Microbiología y Parasitología, Hospital Clínico. España: Universidad de Barcelona.

Mejía, C; Villatoro, G; Silvestre, M; Briz, H; Valle, R y Gordillo, R. (2008). Costo del tratamiento de infecciones nosocomiales por gérmenes multirresistentes, Hospital Roosevelt, Guatemala. *Rev. Panamericana Infectologia*, 10 (4 Supl 1):S96-100

Mulin, B; Talon, D; Viel, JF; Vincent, C; Leprat, R; Thouverez, M; et al. (1995). Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14: 569-76.

Nordmann, P. (1998). Trends in beta-lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis*, 27:S100-6.

Nordmann, P y Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemasas in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 8:321-31.

Pedroza, Cuotto, Velázquez, Torres & Rodríguez Lemoine. 2002. Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter baumannii* en tres centros hospitalarios. *Revista de la Facultad de Medicina*, 25 : 1 Caracas.

Peleg, A; Seifert, H y Paterson, D. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21: 538-82.

Philippon, A; Arlet, G y Jacoby, GA. (2002). Plasmiddetermined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:1-11.

Poirel, L y Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 12: 826-836.

Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*, 61:2200-23.

Richet, H; Mohammed, J; McDonald, LC y Jarvis, W. (2001). INSPEAR. Building communication networks: international network for the study and prevention of emerging antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*, 7: 319-322.

Sato, K y Nakae, T. (1991). Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 28:35-45.

Senda, K; Arawa, Y; Nakashima, K; et. al. (1996). Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:349-53.

Sherertz, R y Sullivan, M. (1985). An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J Infect Dis*, 151: 252-8.

Smolyakov, R; Borer, A; Riesenber, K; Schlaeffer, F; Alkan, M; Porath, A; et al. (2003). Nosocomial multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J Hosp Infect*, 54: 2-8.

Suarez, CJ., Kattan, JN., Guzman AM., & Villegas, MV. Mecanismos de Resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae*. Rev. Asociación Colombiana de Infectología Vol.10 -2 -2006. Pp-86.

Takahashi, A; Yomoda, S; Kobayashi, I; et. al. (2000) Detection of carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* in a Hospital. *J Clin Microbiol*, 38:526-9.

Villa, J y Marco, F. (2002). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 20:304-10.

Villegas, M; Lolans, K; Olivera, M; et al. (2006). First detection of metallo-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:226-9.

Walsh, T; Toleman, MA; Poirel, L y Nordmann, P. (2005). Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, 18:306-25.

Watanabe, M; Iybe, S; Inoue, M y Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:147-51.

Weernink, A; Severin, W; Tjernberg, I y Dijkshoorn, L. (1995). Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect*, 29: 189-99.

Wisplinghof, F; Edmond, M; Pfaller, M; Jones, R; Wenzel, R y Seifert, H. (2000). Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*, 31: 690-7.

Woodford, N; Tierno, PMJ; Young, K; Tysall, L; Palepou, M; Ward, E; Painter, R; Suber, D; Shungu, D; Silver, L; Inglima, K; Kornblum, J y Livermore, D. (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A betalactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:4793-9.

World Health Organization. Containing Antimicrobial Resistant. Review of the Literature and Report of a WHO Workshop on the Development of a Global Strategy for the Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva: World Health Organization; 1999

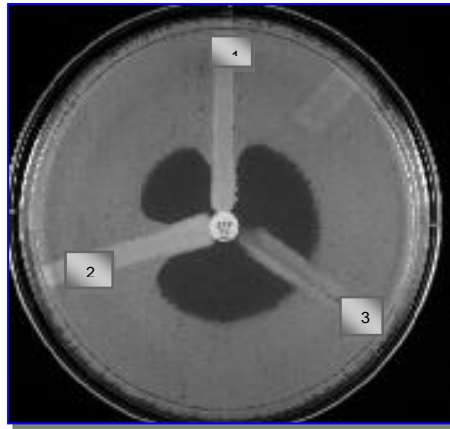
Yamaguchi, H; Nukuga, M y Sawai, T. (1994). Appearance of an R-plasmid mediated metallo b-lactamase in Gramnegative enteric bacteria. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>

Yong D, Lee K, Yum J, Shin H, Rossolini G, Chong Y. (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*, 40(10): 3798-3801.

XII. Anexos

Anexo 1: Esquemas de metodologías a utilizar para detección fenotípica de carbapenemasas en el estudio.

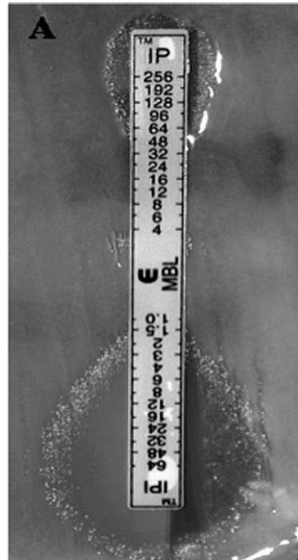
Test de Hodge



Interpretación: 1 y 2 resultado positivos, 3 resultado negativo.

Fuente: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 19th Informational Supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

Anexo 2: Método fenotípico en la detección de carbapenemasas tipo metalo-beta-lactamasas (MBL+) utilizando Etest.

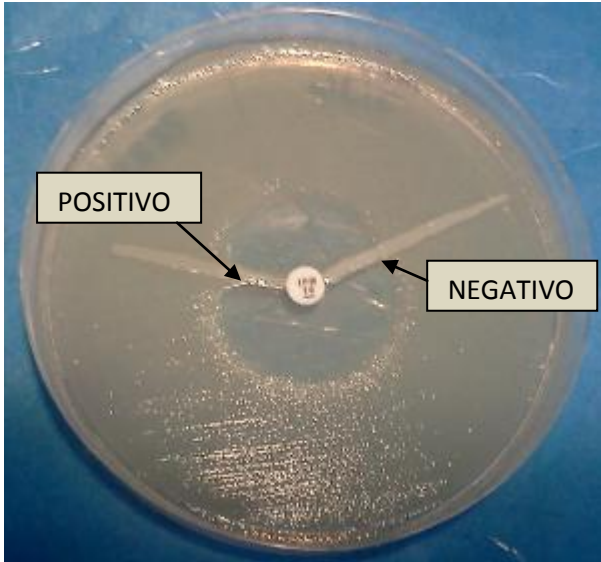


Inhibición de la metalo-beta-lactamasa con EDTA y aumento del halo de inhibición en presencia del inhibidor; (IP: imipenem; IPI: imipenem + EDTA).

Fuente: C. Juan Nicolau et al / *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(Supl 1):19-28

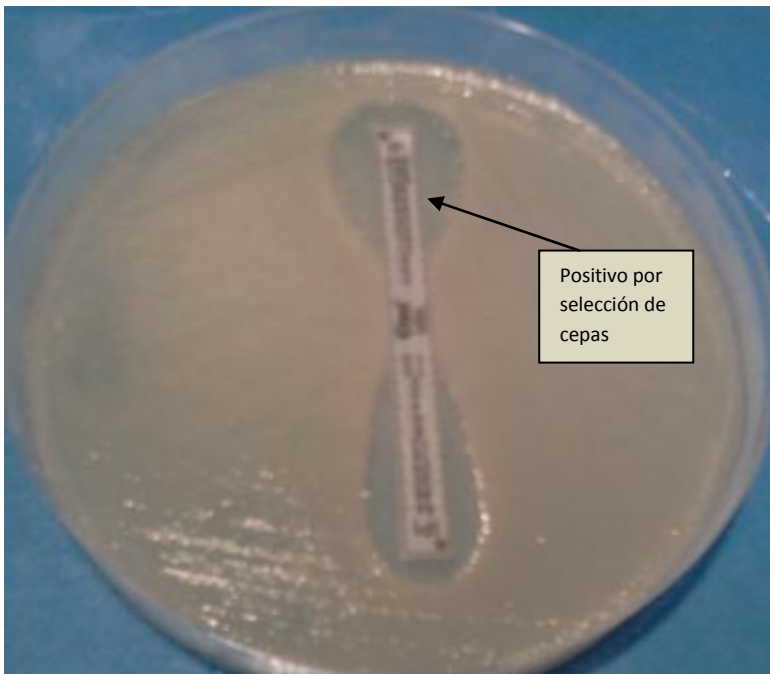
Anexo 3: Imágenes de los análisis realizados.

Evaluación de carbapenemasas por el método de Hodge.



Fuente: Datos experimentales

Evaluación de metalo-beta-lactamasas por el método del Etest MBL

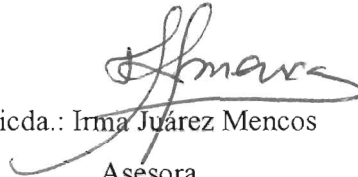


Fuente. Datos experimentales



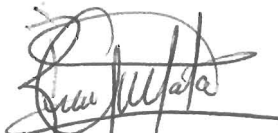
Rosa Lidia Cortés Méndez

Autora



Licda.: Irma Juárez Mencos

Asesora



Licda.: María Remei Gordillo Mata

Co-Asesora



M.Sc. Blanca Samayoa

Revisora



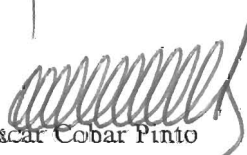
Lic. Martín Gil

Revisor



M.A. María Eugenia Paredes S.

Directora Escuela Química Biológica



Dr. Oscar Cobar Pinto

Decano Facultad CCQQ y Farmacia