



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

**DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA
ENZIMÁTICOS EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RESISTENTE A
CARBAPENÉMICOS, Y SU SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A
CEFTOLOZANO/AZOBACTAM Y CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA**

PRESENTA:

DRA. MARY GABRIELA USCAMAYTA ZABALETA

DIRECTOR DE TESIS

M.C. RAFAEL FRANCO CENDEJAS

Ciudad Universitaria, Cd. MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 GENERALIDADES	7
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	8
2.2.1. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	9
2.2.2. RESISTENCIA EN <i>PSEUDOMONAS SPP.</i>	9
2.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA	11
2.3.1 BETA-LACTAMASAS	12
2.3.2 BOMBAS DE EXPULSIÓN	14
2.3.3 PORINAS Y MECANISMOS DE PENETRACIÓN	16
2.4 EFECTO CONJUNTO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA	16
2.5 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	17
2.5.1 DIAGNOSTICO DE CARBAPENEMASA MEDIANTE CIM TEST	19
2.6. DETECCIÓN GENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS	21
2.7 NUEVOS INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS CON ACCIÓN CONTRA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	22
2.7.1 CEFTOLOZANO/TAZOBACTAM	22
2.7.2 CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GENERAL	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1. VARIABLES	30
6. RESULTADOS	33
7. DISCUSIÓN	39
8. LIMITACIONES	43
9. CONCLUSIONES	43
10. BIBLIOGRAFÍA	44

DEDICATORIA

A Dios, por permitir estar viva, continuando con mis sueños, ser mi apoyo y confidente; a mi familia mis padres Marcela y Luis, mi hermana Lourdes, importante pilar en mi vida que, con su apoyo incondicional, he logrado alcanzar muchos objetivos en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Rafael Franco Cendejas que, sin su apoyo incondicional, guía, comprensión, conocimiento, fueron un pilar importante en la elaboración de la tesis. Agradecida por permitirme conocer y trabajar con un profesional, investigador, y calidad de ser humano, son para mí un ejemplo a seguir.

Personal de Laboratorio de Microbiología Instituto Nacional de Rehabilitación, particularmente a las QFB Melissa Hernández y Claudia Colin que, con su colaboración, enseñanza, apoyo y entusiasmo, permitieron la realización de la presente tesis.

Personal de Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Cancerología, por su apoyo continuo en el proceso de enseñanza aprendizaje

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista, presente en infecciones asociadas a cuidados de la salud e intrahospitalarias. La resistencia a carbapenémicos ha incrementado en los últimos años, considerándose actualmente como uno de los 3 patógenos prioritarios por la OMS para la elaboración de nuevos antibióticos. Ceftazidima/avibactam (CZA) y ceftolozano/tazobactam (C/T), recientemente aprobadas por la FDA aparecen como opciones nuevas en el tratamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. El presente estudio pretende evaluar a partir de muestras de hemocultivos de dos centros hospitalarios de referencia, mecanismos de resistencia enzimáticos presentes en estas bacterias, y la acción in vitro de CZA y C/T. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se trata de un estudio descriptivo, transversal, observacional, de Enero de 2007 a Septiembre de 2017 en dos centros hospitalarios, Instituto Nacional de Cancerología e Instituto Nacional de Rehabilitación. La determinación de resistencia a carbapenémicos, fue realizada por métodos de microdilución en caldo. Presencia de carbapenemasas se identificó por método de inactivación a carbapenémicos de acuerdo a las normas de las CLSI. La determinación fenotípica se realizó por método de sinergia con discos de ácido borónico, cloxacilina y EDTA. La susceptibilidad in vitro de CZA y C/T fue determinada por método de difusión en disco, tomando en cuenta los cortes propuestos por la CLSI 2018. **RESULTADOS:** De 734 cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, se aislo 100 muestras de hemocultivos, se procesaron 78 de acuerdo a criterios de inclusión y exclusión. Se identificó presencia de carbapenemasas en 45%, y de ellas metalobetalactamasas fue del 40%, correspondiendo a 9 % de VIM 9% y 11% de IMP. La actividad de CZA y C/T fue del 42% y 28% respectivamente, con actividad menor al 50% en todas las cepas analizadas. **CONCLUSIÓN:** *P. aeruginosa* expresa múltiples mecanismos de resistencia, la presencia de metalobetalactamasas en mayor porcentaje limita la actividad de CZA y C/T, con mecanismos de resistencia aún poco conocidos.

1. INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) ha sido reconocida como organismo ubicuo debido a su extraordinaria supervivencia y habilidades de adaptación en una amplia gama de entornos tales como suelo, agua, alcantarillado y hospitales, considerándose por lo tanto, un patógeno común de infecciones intrahospitalarias entre las que destacan neumonía adquirida en el hospital, neumonía asociada al ventilador (NAV), bacteriemia, infecciones de piel y tejidos blandos e infecciones del tracto urinario (IVU), particularmente en pacientes críticos o inmunocomprometidos. Ocupando el segundo lugar entre los patógenos gramnegativos informados en el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (1).

P. aeruginosa presenta un serio desafío terapéutico debido a que presenta una susceptibilidad intrínsecamente reducida a una gama de antimicrobianos y posee una gran capacidad para desarrollar resistencia a múltiples clases de antibióticos. *P. aeruginosa* lleva una molécula inducible AmpC cefalosporinasa, que es similar a la cromosómica AmpC codificada por las Enterobacterias, mostrando resistencia a todos los betalactámicos disponibles para uso clínico, con excepción de los carbapenémicos. Además de la regulación del gen MexA-MexB-OprM y la pérdida de OprD, considerados mecanismos prevalentes de resistencia a carbapenémicos, mismos que se asocian a la hiperproducción de AmpC.

El incremento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* multidrogoresistente en años recientes, ha elevado considerablemente las tasas de morbimortalidad, tomando terapias alternativas como el uso de fosfomicina, colistina, aminoglucósidos; los últimos dos con riesgo de nefrotoxicidad. A partir de ello nuevos antibióticos actualmente se encuentran disponibles para uso como son ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam (2).

Avibactam es un miembro de una nueva clase de inhibidor de betalactamasa, los diazabiciclooctanos (DBO) que, comparado a los inhibidores actualmente disponibles para uso clínico, son más potentes y tienen un espectro más amplio.

Inactiva efectivamente la clase A (Incluyendo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase [KPC]), clase C (AmpC), y algunas betalactamasas de clase D (OXA), con un valor bajo de concentración inhibitoria mínima. Así, el avibactam extiende la actividad antibacteriana de la ceftazidima contra la mayoría de los organismos resistentes a Ceftazidime.

Ceftolozano es una nueva cefalosporina, cuyo mecanismo de acción es el mismo que el de otros betalactámicos: actúa sobre las proteínas de unión a penicilina e inhibe síntesis de células de pared bacterianas. Tazobactam tiene un efecto antibacteriano muy limitado cuando se administra en monoterapia. Inhibe varias beta-lactamasas, incluyendo amplio espectro y enzimas de espectro extendido (3). Ceftolozane es la cefalosporina con la actividad más fuerte contra *P. aeruginosa*, ya que es estable en presencia de AmpC beta-lactamasas y no se ve afectada por la pérdida de porinas de membrana o por la presencia de bombas de eflujo activas (4). La eficacia de ambos, ceftolozane-tazobactam y ceftazidima avibactam ha sido evaluada para el tratamiento de infecciones abdominales complicadas e infecciones del tracto urinario complicadas.

El presente estudio pretende determinar mecanismos de resistencia implicados en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, y evaluar la actividad in vitro de Ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam, en dos centros hospitalarios de referencia.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, móvil por flagelo polar único, aerobio, no esporulado, oxidasa positivo, catalasa positivo, que produce pigmentos fluorescentes verde– amarillentos, indol negativo y rojo de metilo negativo (5).

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, es relativamente ubicua y comúnmente se le encuentra en polvo, agua, plantas, verduras, animales y ambientes marinos. Puede crecer bien en diferentes medios y soporta gran variedad de condiciones físicas, y prefiere los ambientes húmedos (5).

Pseudomonas aeruginosa está asociada a infecciones del tracto respiratorio y urinario; infecciones en quemados u otros traumatismos severos que afecten a amplias zonas de la piel o bien en pacientes con fibrosis quística; sin embargo, no es un parásito estricto, sino un oportunista típico, especialmente en medios hospitalarios, iniciando una infección cuando el individuo se encuentra inmunocomprometido; también puede causar infecciones sistémicas, infecciones nosocomiales derivadas de cateterismos, traqueotomías, punciones lumbares y transfusiones; infecciones en pacientes con tratamientos inmunosupresores, corticosteroides, antibióticos o radiaciones; puede contaminar heridas quirúrgicas, abscesos, quemaduras e infecciones de oído (6,7).

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

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

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La resistencia antibiótica es un problema mundial. Nuevas formas de resistencia a los antibióticos pueden cruzar fronteras internacionales y extenderse entre continentes con facilidad. Los líderes mundiales de salud han descrito la resistencia de los microorganismos a los antibióticos como "bacterias de pesadilla" que "representan una amenaza catastrófica" para las personas en todos los países del mundo.

Cada año en los Estados Unidos, al menos 2 millones de personas adquieren infecciones graves con bacterias que son resistentes a uno o más de los antibióticos. Al menos 23,000 personas mueren cada año como resultado directo de estas infecciones resistentes a antibióticos (8).

Las infecciones resistentes a antibióticos agregan costos considerables y evitables al sobrecargado sistema de salud en el mundo entero. En la mayoría de los casos, las infecciones resistentes a los antibióticos requieren tratamientos prolongados y / o costosos, extienden las estadías en el hospital, resultan en una mayor discapacidad y muerte en comparación con infecciones que son fácilmente tratables con antibióticos (8).

2.2.2. RESISTENCIA EN *PSEUDOMONAS SPP.*

P. aeruginosa es una causa común de infecciones asociadas a servicios de salud incluidos neumonía, bacteriemia, infecciones de vías urinarias e infecciones de sitio quirúrgico.

Aproximadamente 8% de todas las infecciones asociadas a cuidados de la salud reportadas por CDC (Center for Disease Control and Prevention) son causadas por *P. aeruginosa*. Cerca del 13% de infecciones graves asociadas a cuidados de salud

son causadas por *P. aeruginosa* MDR (multidrogoresistente), repercutiendo en el empleo de una serie de antibióticos como cura de estas infecciones.

Se estima que 51 000 infecciones asociadas a cuidados de salud ocurren por *P. aeruginosa* en Estados Unidos cada año. Más de 6 000 (13%) de estas son causadas por gérmenes MDR, con un aproximado de 400 muertes producidas por este tipo de infecciones (8).

En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía desde 2.1 hasta 15.8%. En las unidades de cuidados intensivos (UCI) la situación es más preocupante: un estudio realizado en 895 pacientes de 254 UCI en México encontró que 23.2% de éstos tenía una infección nosocomial. La neumonía fue la infección más común (39.7%), seguida de la infección urinaria (20.5%), la de herida quirúrgica (13.3%) y la del torrente sanguíneo (7.3%). La letalidad asociada a estas infecciones nosocomiales fue de 25.5%. En las unidades neonatales y servicios pediátricos los riesgos de bacteriemia son significativos pues a los factores de riesgo conocidos se agregan la saturación de los servicios, el uso de mezclas de soluciones parenterales y el abuso en la cateterización.

En un estudio realizado por la Secretaria de Salud el año 2011 acerca de la medición de la prevalencia de Infecciones Nosocomiales en Hospitales Generales de las principales instituciones públicas de salud, se determinó a *Pseudomonas* spp. como el tercer patógeno en frecuencia asociado a Infecciones Nosocomiales (13%) (9).

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a un rango variable de antimicrobianos principalmente por una disminución en la permeabilidad de la membrana, expresión de bombas de eflujo y la producción de AmpC cefalosporinasas inducibles. Todo esto lleva fácilmente al desarrollo de resistencia antimicrobiana comúnmente empleada en el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* como son Piperacilina/tazobactam, ceftazidima, carbapenémicos, fluoroquinolonas o aminoglucósidos. De acuerdo a los datos reportados por la EARS- Net (European

Antimicrobial Resistance Surveillance Network) el 2015, los principales porcentajes de resistencia para *P. aeruginosa* aislados para Piperacilina/tazobactam, carbapenemes y fluroquinolonas fue del 20%, mientras que para Ceftazidima y aminoglucósidos fue del 13%.

Por otra parte la prevalencia de *P.aeruginosa* MDR ha incrementado en las últimas décadas alcanzando un valor del 30% aproximadamente en Europa. Un estudio multicéntrico en bacteriemias causadas por *P. aeruginosa* en España, encontró que el 15% de los aislados eran XDR (Drogo resistente extenso). Siendo los principales mecanismos de desarrollo de resistencia en *P. aeruginosa*, la hiperproducción de genes cromosómicos tipo Amp C betalactamasa, la represión o inactivación de porinas para carbapenémicos como OprD, o la desregulación de bombas de eflujo. Por lo tanto la emergencia de XDR o MDR es usualmente una acumulación de mecanismos cromosómicos mediados por la bacteria. En adición la adquisición de plasmidos median la codificación de genes con presencia de carbapenemasas, incrementado en forma más radical la presencia de resistencia antibiótica. Las metalo-betalactamasas (MBLs) son las más comunes carbapenemasas detectadas, junto con las enzimas IMP y VIM. Carbapenemasas de tipo A (Principalmente tipo KPC) son menos frecuentes, siendo más frecuentemente aisladas en Sud América.

2.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Pseudomonas aeruginosa es resistente, tanto de manera natural como adquirida, a un gran número de antibióticos, como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos (10). Esto se debe a las características de su membrana celular que tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad. La resistencia a los AB (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 negativas como las enterobacterias.

Otro factor preocupante es la capacidad de *P. aeruginosa* de tornarse resistente en el curso del tratamiento antibiótico. Los mismos AB son capaces de inducir los mecanismos de resistencia que un aislamiento tiene latentes. Otras sustancias como el zinc, componente de una clase de catéteres urinarios, también inducen cambios moleculares que activan la resistencia a imipenem (11). Se ha evidenciado que en 10.2% de los tratamientos para *P. aeruginosa* emerge una cepa resistente que antes del tratamiento era sensible. Esta inducción de resistencia varía dependiendo de cada antibiótico. Por ejemplo, ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación con actividad antipseudomonas, tiene el más bajo riesgo de inducir resistencia en bacterias previamente sensibles a ceftazidima; en contraste, imipenem presenta la más alta tasa de emergencia de resistencia después del tratamiento (12). Lo preocupante, son las pocas opciones que quedan para el efectivo tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes.

Los antibióticos que se consideran con buena actividad son: las penicilinas antipseudomonas (piperacilina, ticarcilina, carbenicilina, azlocilina) asociadas a inhibidores de beta-lactamasas, ceftazidima, cefepime, monobactámicos como aztreonam, carbapenémicos (imipenem y meropenem), quinolonas especialmente ciprofloxacina y aminoglucósidos. Sin embargo, ante el surgimiento de aislamientos multirresistentes a veces es necesario acudir a antibióticos que se consideraban fuera de uso por su alta toxicidad como las polimixinas.

Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de beta-lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales.

2.3.1. BETA-LACTAMASAS

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos, de esta manera destruyen el sitio activo del AB e impiden su actividad.

Las betalactamasas se caracterizan por su capacidad de inhibir determinados subgrupos de betalactámicos, es por esto que algunas subclasificaciones las denominan, penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas, dependiendo de la familia de betalactámicos que tenga mayor susceptibilidad a ser atacadas por la enzima.

Así mismo, estas enzimas son susceptibles de ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas como el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam, aunque no todas son susceptibles ni responden de igual forma a esta inhibición. *P. aeruginosa* posee dos clases de betalactamasas: Amp-C y las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Amp-C, está codificada en el cromosoma de la bacteria y tiene la capacidad de ser inducida por los propios betalactámicos, especialmente cefalotina y ampicilina. Cuando esto sucede, hay resistencia a penicilinas y cefalosporinas (ceftazidime, cefepime); el grado de resistencia, depende del grado de represión de la Amp-C.

El problema radica en que esta enzima, es inducida en cuestión de días, por tanto, antes del tratamiento, los betalactámicos parecen servir, pero clínicamente el paciente no mejora y se descubre posteriormente la inducción completa de la enzima. Las BLEE son codificadas por plásmidos, se adquieren mediante transporte de DNA extracromosomal y se manifiestan también por resistencia a penicilinas y a cefalosporinas. En un tipo de enzimas llamadas carbapenemasas se evidencia resistencia a carbapenémicos.

Las betalactamasas más frecuentemente adquiridas por plásmidos son la PSE-1 y la PSE-4. Otras BLEE incluyen la PER-1 que confiere franca resistencia a ceftazidima pero que pierde su poder al adicionar clavulanato. TEM, SHV y OXA, son BLEE que generan resistencia a monobactámicos, penicilinas, cefalosporinas, pero respetan carbapenémicos. Existen metalo betalactamasas que tienen la capacidad de hidrolizar las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos pero no el aztreonam; estas son IMP y VIM recientemente descritas en Japón y Europa (13).

La resistencia mediada por este mecanismo se debe sospechar ante un antibiograma que revele resistencia a todas las penicilinas y cefalosporinas anti-pseudomonas (5). La opción terapéutica en este caso son los carbapenémicos, siempre que no se trate de una carbapenemasa .

2.3.2. BOMBAS DE EXPULSIÓN

El reciente descubrimiento de las bombas de expulsión activa ha ayudado a aclarar algunos de los fenotipos de resistencia de *P. aeruginosa* a los β -lactámicos (y a otros antimicrobianos). Existen varias familias de bombas (proteínas) capaces de eliminar antimicrobianos: algunas sólo eliminan un tipo de compuestos (p. ej. tetraciclinas), pero otras expulsan una amplia variedad de sustratos, con escasa relación química entre sí, por lo que se denominan bombas de expulsión multidroga. Hasta el momento se han caracterizado en detalle cuatro bombas de expulsión multidroga en *P. aeruginosa*. Todas ellas pertenecen a la subfamilia de bombas tipo RND (resistencia-nodulación-división), caracterizadas por la actividad conjunta de tres proteínas: una proteína situada en la membrana citoplásmica (la bomba, realmente), otra situada en la membrana externa que permite la eliminación de los antimicrobianos al medio externo (y que no es una porina en el sentido tradicional aplicado al término) y una tercera, periplásmica, que conectaría las dos proteínas anteriores. Estas bombas eliminan los antimicrobianos del interior de *P. aeruginosa* empleando la energía de la fuerza motriz de protones, intercambiando el antimicrobiano a eliminar con un hidrogenión.

Los sistemas identificados hasta ahora en *P. aeruginosa* son: MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN y MexX-MexY-OprM. Como puede observarse dos de los sistemas comparten la proteína de membrana externa OprM. Todos ellos están codificados por operones de tres genes, excepto MexX-MexY (por su ya indicada dependencia de OprM) y su expresión depende de genes reguladores, que con frecuencia están reprimiendo la expresión del correspondiente operón. La denominación de estos sistemas se ha hecho con arreglo a la disposición

de los respectivos genes en el cromosoma: el primer componente corresponde a la proteína periplásmica, el segundo a la bomba propiamente dicha y el tercero a la proteína de membrana externa. MexA-MexB-OprM se expresa de forma basal y su actividad afecta (entre otros muchos compuestos) a meropenem, pero no a imipenem. Esta bomba también elimina carboxipenicilinas (y otros β -lactámicos), por lo que la resistencia a la carbenicilina (o a la ticarcilina), en ausencia de β -lactamasas específicas, se ha relacionado con la hiperexpresión de este mecanismo de resistencia. Se acepta que la capacidad de MexA-MexB-OprM para eliminar meropenem, pero no imipenem, depende de la distinta estructura de ambos compuestos: meropenem posee un radical lipófilo, no presente en la imipenem, que le permite ser reconocido y eliminado por MexB. La expresión basal de este sistema es fundamental para explicar la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*: si el sistema se inactiva, el microorganismo se torna hipersensible a los β -lactámicos y otros antimicrobianos, aún cuando siga expresando AmpC.

Las mutantes de *P. aeruginosa* que sobreexpresan el sistema de expulsión MexA-MexB-OprM presentan resistencia a meropenem, pero no necesariamente en imipenem. Estas mutantes se denominan nalB y habitualmente aparecen como consecuencia de mutaciones en el gen regulador mexR, que deja de actuar como inhibidor de la expresión de mexAB-oprM. Curiosamente, las cepas de *P. aeruginosa* que sobreexpresan otro sistema, MexE-MexF-OprN, también suelen ser resistentes a imipenem, pero ello no se relaciona con la actividad específica del sistema de eliminación, sino a que estas mutantes, además, dejan de producir OprD, debido probablemente a la acción de un único regulador que activa la producción de la bomba e inhibe la expresión de la porina.

Meropenem también utiliza OprD para penetrar en *P. aeruginosa*, por lo que la resistencia con trascendencia clínica a este compuesto deriva de la combinación de la pérdida de OprD y de expresión de MexA-MexB-OprM. Debido a la alta estabilidad de la meropenem a la acción hidrolítica de AmpC, la hiperproducción de este enzima tiene menor trascendencia que en el caso de imipenem.

2.3.3. PORINAS Y MECANISMOS DE PENETRACIÓN

La penetración de la imipenem y otros carbapenemes a través de la membrana externa de *P. aeruginosa* ocurre a través de la porina OprD, específica para el transporte de aminoácidos dibásicos y de glutamato. Presumiblemente, la analogía estructural entre los carbapenemes y los aminoácidos dibásicos explica la capacidad de las primeras para penetrar usando OprD. Se ha demostrado que *P. aeruginosa* es más sensible a los carbapenemes en un medio mínimo que en Mueller-Hinton; si al medio mínimo se le añaden aminoácidos dibásicos (que compiten con las carbapenemes para penetrar a través de OprD) la actividad de estos antimicrobianos disminuye considerablemente, lo que no ocurre con las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos o quinolonas porque estos otros compuestos tienen vías de penetración independientes de OprD.

La síntesis de OprD disminuye en presencia de salicilato, por lo que este compuesto, disminuye también la actividad de los carbapenemes. La pérdida de la porina determina una menor concentración de imipenem en el espacio periplásmico, lo que junto con la producción de AmpC acaba determinando, finalmente, en resistencia. Algunas cepas con sensibilidad disminuida a imipenem (CMI de 2 a 8 µg/ml) no tienen una pérdida completa de OprD, pero sí expresan esta porina en mucha menor cantidad que las habitualmente sensibles (CMI ≤1 µg/ml). Imipenem tiene la capacidad de seleccionar in vivo mutantes deficientes en OprD, por lo que no es de extrañar que su uso en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* conlleve el riesgo de fracaso terapéutico, que varios estudios han cifrado en torno al 15-20% de los casos.

2.4. EFECTO CONJUNTO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia expuestos previamente se combinan de forma variable en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*; ello explica que muchas de ellas, deficientes en OprD, sean a la vez resistentes a imipenem y a meropenem, pero

que algunas sólo lo sean a una de los dos carbapenemes. Considerando que la expresión de AmpC es más frecuente que la hiperexpresión de MexA-MexB-OprM, se puede entender que, en cepas clínicas, la frecuencia de resistencia a la imipenem sea mayor que la del otro compuesto del grupo. Así pues, la resistencia de *P. aeruginosa* a β -lactámicos depende, tanto de la producción de β -lactamasas como de otros muchos factores no relacionados con estas enzimas. Por ello, en este microorganismo, es particularmente complejo intentar establecer los mecanismos de resistencia subyacentes en una cepa concreta partiendo únicamente del fenotipo de resistencia: en la mayoría de los casos será necesario estudiar también las bases moleculares de los posibles mecanismos implicados.

2.5. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A) Detección del fenotipo AMP C

Método de aproximación de discos: Es aplicable a betalactamasas AMPC inducibles. La técnica consiste en realizar un antibiograma convencional, para luego colocar un disco de cefoxitina o cualquier otro antimicrobiano inductor a una distancia de 27mm centro-centro de un disco de ceftazidima, ceftriaxona o cefotaxima (antimicrobiano sustrato, revelador o testigo). El microorganismo producirá una betalactamasa inducible si se observa un halo de inhibición truncado del antimicrobiano sustrato, testigo o revelador.

B) Detección del patrón fenotípico BLEE

En una placa de agar MH inoculada con una suspensión de la cepa en estudio ajustada al 0,50 en la escala Mc- Farland

1) En el método doble disco difusión, se usa el disco de amoxicilina/ ácido clavulánico (30 μ g) en el centro de una placa de Petri, y alrededor de este se colocaron discos de ceftazidima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), y

aztreonam (30µg) a 20 mm de distancia del disco central. La presencia de BLEE se manifiesta por el efecto sinérgico del inhibidor.

2) Método de discos combinados, enfrenta el disco de ceftazidima con ceftazidima clavulanico, un incremento mayor a 5 mm de ceftazidima/ ceftazidima clavulanico se le considera positivo (Subcomisión de antimicrobianos de la sociedad argentina, bacteriología, micológica y parasitología clínica [SADEBAC], 2006). Método doble disco difusión para BLEE-ges, se debe sospechar BLEE con halos de ceftazidima menor que 18 mm y observar sinergia entre los discos de imipenem-ceftazidima.

C) Detección del patrón fenotípico KPC

En una placa de agar MH inoculada con una suspensión de la cepa en estudio ajustada al 0,50 en la escala McFarland. Se debe observar el halo de ceftazidima (30µg) para *P. aeruginosa*, el cual debe ser resistente o intermedio. Luego observar el halo de inhibición de imipenem que debe ser igual a seis mm Al enfrentar los discos imipenem - EDTA/ SMA meropenem no se debe evidenciar sinergia. El halo de inhibición de aztreonam (30µg) debe ser igual a seis mm. El método microbiológico confirmatorio de actividad enzimática MASUDA, es con los discos de imipenem (10µg) y meropenem (10µg) deben debe resultar positivo.

D) Detección del patrón fenotípico MBL

En una placa de agar MH inoculada con una suspensión de la cepa en estudio ajustada al 0,50 en la escala McFarland.

(A) Método de doble disco, consiste en colocar un disco que contiene un agente quelante (EDTA, SMA, ácido dipicolínico o ácido 2-mercaptopropiónico) rodeado por un disco de imipenem (10µg) y otro de meropenem (10µg). Esta prueba es positiva (presencia de MBL) si se observa un aumento del halo de inhibición o la presencia de una zona de inhibición entre el imipenem y/o el meropenem y el agente quelante.

(B) Método de discos combinados, consiste en colocar discos de imipenem y meropenem suplementados con sustancias quelantes y discos de imipenem y meropenem solos, considerándose una prueba positiva si se observa un aumento del halo mayor a 5 mm de inhibición de los discos suplementados en comparación con los halos producidos alrededor de los discos que contienen antibiótico solo.

(C) Método E-test de imipenem/imipenem+EDTA: consiste en colocar una tira de e-test en una placa de Mueller-Hinton inoculada con una dilución de 0,5 en la escala de McFarland. Incubamos a 37 durante 24 h. Se considera la presencia de metalobeta-lactamasas cuando CIM imipenem/ CIM imipenem-EDTA debe ser mayor o igual a 8.

2.5.1. DIAGNOSTICO DE CARBAPENEMASA MEDIANTE CIM TEST (MÉTODO DE INACTIVACIÓN DE CARBAPENEMASA)

El concepto de demostrar la hidrólisis enzimática de los antibióticos betalactámicos mediante la incubación ellos con suspensiones bacterianas no es nuevo y se remonta a finales de los años 70 [20]. Sin embargo, el CIM es el primero en utilizar discos de prueba de susceptibilidad a antibióticos, que están disponibles a nivel mundial a bajo costo y tienen vidas útiles largas, como alícuotas de sustrato para esto. Esto mejora mucho la practicidad y reduce costos y mano de obra. Además, este método no se ve afectado por los cambios en variables tales como temperatura o tiempo de incubación, fabricante del disco, personal de laboratorio y la edad del cultivo o la suspensión bacteriana por lo que es un método fenotípico rentable de detección que puede detectar confiablemente la actividad carbapenemasa.

Como no requiere equipo especializado, reactivos o habilidades y poco tiempo de manos para realizar, es un método de alto rendimiento que permite el cribado de grandes cantidades de aislados en la mayoría de los laboratorios microbiológicos

Para ejecutar el CIM, se debe realizar una suspensión con 10uL de la cepa tomada de la placa de agar Mueller-Hinton o Agar sangre de carnero en 400uL de agua, posteriormente se agrega 10ug de un disco con Meropenem, se debe incubar la suspensión por un mínimo de dos horas a 35°C. Después de la incubación el disco se retira de la suspensión. Usando un circuito de inoculación, en Agar Mueller-Hinton se inocula una cepa indicadora de *E. coli* susceptible más el disco de meropenem retirado de la suspensión, se incuba a 35°C. Si el aislamiento produce carbapenemasas el disco de susceptibilidad de meropenem fue inactivado permitiendo en crecimiento deshinibido de la cepa indicadora susceptible, se puede comparar con otros discos incubados en otras suspensiones que no contienen carbapenemasas, debido a que producen una zona de inhibición clara. Si se requieren resultados el mismo día, se pueden leer resultados después de seis horas. (Figura No 1)

La aplicación de la CIM muestra que es capaz de detectar la producción de carbapenemasas en Gram-negativos que permite la distinción entre resistencia a carbapenémicos debido a actividad beta-lactamasa (19)

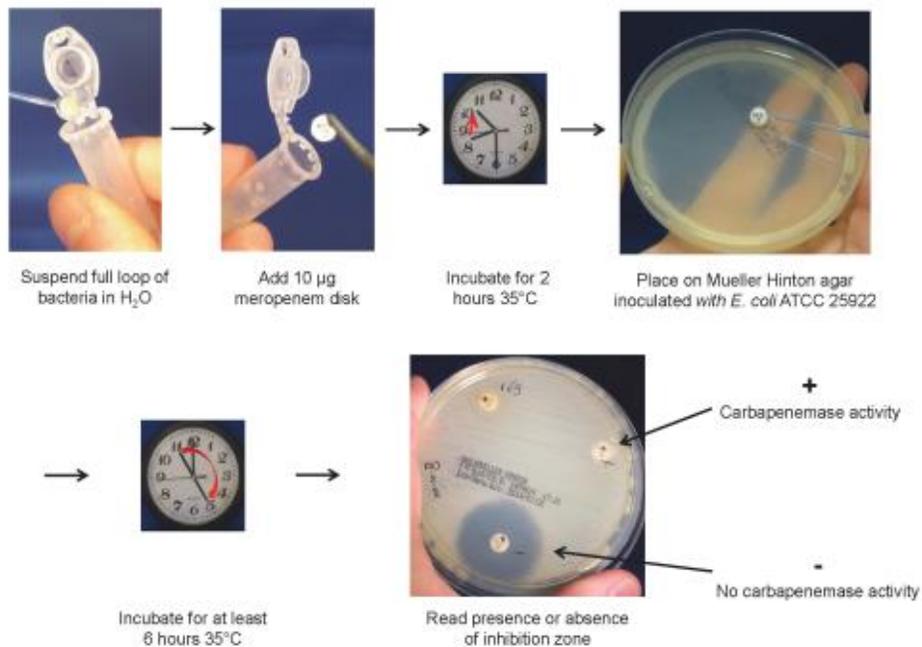


Figura No1 Proceso de determinación de carbapenemasa mediante método CIM test

2.6. DETECCIÓN GENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

La detección de carbapenemasas por métodos genotípicos puede llevarse a cabo por:

- a) PCR- multiplex“caseras”: Partiendo de colonias, usando varios juegos de plásmidos para detectar las principales carbapenemasas.
- b) PCR multiplex comerciales: Muestra directa/colonia.
- c) PCR en tiempo-real: Micromatrices (microarrays): Partiendo de colonia.

FENOTÍPICO				MOLECULAR
PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE CARBAPENEMASAS				
	Carba NP	mMIC	mMIC con eMIC	Otros (Biología Molecular)
Organismos	<i>Enterobacterias</i> y <i>P. aeruginosa</i> no susceptibles a uno o más carbapenémicos	<i>Enterobacterias</i> y <i>P. aeruginosa</i> no susceptibles a uno o más carbapenémicos	<i>Enterobacterias</i> que son positivas mMIC	<i>Enterobacterias</i> y <i>P. aeruginosa</i> que no son sensibles a uno o más carbapenémicos para determinar la presencia y tipo de carbapenemasa que son positivos en Carba NP o mCIM
Beneficio	Rápido	No necesita reactivos ni medios especiales	No necesita reactivos ni medios especiales	Determina el tipo de carbapenemasa en ausencia o presencia de la enzima.
Limitaciones	Necesita reactivos especiales Puede dar resultados inválidos No se detectan tipos de carbapenemasas	Requiere 24 hrs de incubación	Requiere 24 hrs de incubación	Requiere reactivos especiales y equipo necesario Busca genes específicos Falsos negativos, debido a que busca genes específicos.

Abreviaturas: eMIC, método de inactivación de carbapenem modificado con EDTA; mMIC, método de inactivación de carbapenem modificado, MIC, concentración inhibitoria mínima

Fig. No 2 Comparación de métodos de identificación de carbapenemasas.

2.7. NUEVOS INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS CON ACCIÓN CONTRA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

2.7.1. CEFTOLOZANO/AZOBACTAM

Ceftolozano/tazobactam (C/T) ha sido autorizado para el tratamiento de las infecciones intraabdominales complicadas (IIAc), para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario complicadas (ITUc), y para el tratamiento de la pielonefritis aguda.

El mecanismo de acción de ceftolozano es similar al de otros antibióticos betalactámicos. Ejerce una actividad bactericida uniéndose a proteínas de unión a penicilinas (PBP), lo que da lugar a la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana y la consiguiente muerte celular (11).

Tazobactam es un betalactámico estructuralmente relacionado con las penicilinas. No tiene actividad antibacteriana importante. Inhibe diversas betalactamasas de clase molecular A, incluyendo las enzimas de amplio espectro (TEM y SHV) y de espectro extendido tipo BLEE (CTX-M, SHV y TEM). Tazobactam no inhibe adecuadamente los siguientes tipos de betalactamasa (13):

- Enzimas AmpC (producidas por Enterobacteriaceae o *P. aeruginosa*).
- Carbapenemasas de clase A de Ambler (por ejemplo, carbapenemasas de *K. pneumoniae* [KPCs]).
- Carbapenemasas de clase B o metalo-betalactamasas (por ejemplo, metalo-betalactamasa New Delhi [NDM], VIM).
- Beta-lactamasas clase D de Ambler (OXA-carbapenemasas, incluyendo OXA-48).

El espectro de actividad de ceftolozano incluye distintas enterobacterias tales como *E. coli*, *Citrobacter koseri*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* y *Salmonella spp.* Incluye también bacilos Gram negativos no fermentadores (aunque su espectro no incluye *Stenotrophomonas maltophilia* o

Acinetobacter), algunas bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales, ciertos estreptococos y excepcionalmente algunos anaerobios. No presenta actividad frente a estafilococos ni enterococos.

Ceftolozano presenta buena actividad por si solo frente a *P. aeruginosa*, siendo en la actualidad la cefalosporina con mayor actividad frente a este patógeno ya que es estable en presencia de betalactamasas AmpC y no se ve afectado por la pérdida de porinas de membrana externa (OprD) o por la presencia de bombas de expulsión activa (12).

La Concentración máxima (C_{máx}) y el área bajo la curva (AUC) de ceftolozano/tazobactam aumentan de forma proporcional a la dosis en el intervalo de dosis únicas de ceftolozano de 250 mg a 3 g y en el intervalo de dosis únicas de tazobactam de 500 mg a 1,5 g. La unión de ceftolozano y del tazobactam a las proteínas plasmáticas humanas es baja (aproximadamente del 16% al 21% y del 30%, respectivamente). Ceftolozano se elimina mayoritariamente por vía renal como sustancia sin alterar. Es necesario ajustar la dosis en pacientes con insuficiencia renal moderada o grave (aclaramiento de creatinina estimado 38°C

2.7.2. CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM

Ceftazidima/avibactam (CZA) ha sido autorizado para el tratamiento de las infecciones intraabdominales complicadas (IIAc), para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario complicadas (ITUc) incluyendo la pielonefritis, para el tratamiento de la neumonía nosocomial incluyendo la neumonía asociada a ventilación mecánica y para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas aerobias en pacientes con opciones de tratamiento limitadas.

CAZ es una cefalosporina de 3ª generación. Tiene acción bactericida ya que inhibe la síntesis de la pared celular de peptidoglicano bacteriana mediante su unión a las proteínas de unión de penicilinas, provocando la muerte celular.

AVI inhibe las betalactamasas Ambler clase A (incluyendo las betalactamasas de espectro extendido, BLEE) y carbapenemasas (KPC), las de clase C (AMPc) y algunas betalactamasas de clase D como la OXA-48. AVI no inhibe enzimas clase B (metalobetalactamasa) ni muchas enzimas clase D.

Los mecanismos de resistencia que potencialmente pueden afectar a CZA incluyen proteínas de unión de penicilinas mutadas o adquiridas, disminución de la permeabilidad de la membrana, la expulsión de los fármacos y las enzimas betalactamasas refractarias a la inhibición por Avibactam y capaces de hidrolizar la Ceftazidima como son las enzimas clase B (metalo-betalactamasas) y muchas enzimas clase D. Así como, la producción de betalactamasas en cantidades elevadas que superan la capacidad inhibitoria de Avibactam.

La unión a proteínas plasmáticas de Ceftazidima y avibactam es aproximadamente del 10% y 8% respectivamente. La semivida plasmática de CZA es de 2 horas tras la administración intravenosa. CAZ se excreta sin metabolizar por la orina, por filtración glomerular. El 97% de AVI se recupera sin metabolizar por la orina con un aclaramiento de 158 mL/min lo que sugiere secreción tubular además de filtración glomerular. La farmacocinética de CZA es aproximadamente lineal en el rango de dosis estudiado (2g/0,5g), para una administración IV única. No se observó acumulación tras múltiples administraciones durante 11 días en sujetos sanos con función renal normal. La eliminación de CZA está disminuida en pacientes con falla renal de moderada a grave, por lo que es necesario hacer ajuste de dosis.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia antibiótica ha incrementado de manera dramática en los últimos años, encontrándonos en una etapa crítica en el uso de antibióticos, que por ende repercuten en mortalidad y costes económicos en la sociedad. Actualmente se consideran dentro de los 3 principales problemas de salud a nivel mundial, considerando que para el año 2050 será causa de aproximadamente 10 millones de muertes por año.

Pseudomonas aeruginosa, actualmente considerada uno de los principales gérmenes asociados a infecciones intrahospitalarias y de servicios de salud, expresa múltiples mecanismos de resistencia, que impacta en la mortalidad y costes en esquemas terapéuticos. Desde la aparición de *Klebsiella* resistente a carbapenémicos, la necesidad de emplear nuevas estrategias terapéuticas ha incrementado, sin embargo aún hoy nos encontramos en un dilema cuando analizamos opciones terapéuticas en cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Ceftazidima/Avibactam, Ceftolozano/tazobactam aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), son 2 nuevos antibióticos combinados cuyo espectro de actividad incluye bacterias Gram negativas (GNB) multirresistentes (MDR), incluyendo *P. aeruginosa*. Los ensayos clínicos mostraron no inferioridad a los comparadores de ambos agentes cuando se usan en el tratamiento de infecciones del tracto urinario e infecciones intra-abdominales complicadas (cuando se usa con metronidazol).

Por lo tanto, la adecuada administración antimicrobiana será esencial para preservar la actividad de estos agentes, además de conocer la efectividad de estos nuevos antibióticos, conociendo su actividad in vitro, y su aplicabilidad clínica, proponiendo una alternativa terapéutica frente a la emergencia de resistencia antibiótica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar mecanismos de resistencia enzimáticos en cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, y evaluar la susceptibilidad in vitro a Ceftazidima/avibactam y Ceftolozano/tazobactam, en dos Centros Hospitalarios de referencia de enero de 2007 a septiembre de 2017

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar frecuencia cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos en el tiempo de estudio.
2. Identificar, mediante métodos fenotípicos y genotípicos, mecanismos de resistencia más comunes expresados en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.
3. Analizar respuesta in vitro a Ceftazidima/avibactam y Ceftolozano/tazobactam en cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos.
4. Correlacionar susceptibilidad de Ceftazidima/avibactam y Ceftolozano/tazobactam, en relación a otros agentes betalactámicos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

A. TIPO DE ESTUDIO

- Estudio transversal, experimental, descriptivo.

B. UNIVERSO

- Cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos en dos centros hospitalarios de referencia de enero 2007 a septiembre 2017

C. MUESTRA

- 78 cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos aisladas en sangre, en dos centros de Referencia Hospitalaria de enero 2007 a septiembre 2017.

D. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

1. Inclusión

- Cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos de cultivo de sangre de Enero de 2007 a diciembre de 2017 en dos centros Hospitalarios.
- Cepas de *P. aeruginosa* recuperables resistentes a carbapenémicos, de acuerdo al periodo de estudio.
- Presencia de perfil de susceptibilidad de los aislamientos microbiológicos en estudio, de acuerdo a criterios de interpretación de CLSI.

2. Exclusión

- Cepas de *P. aeruginosa* contaminadas.

E. METODOLOGÍA

Se recolectó un total de 734 cepas no duplicadas de *P.aeruginosa resistente a carbapenémicos*, en forma consecutivamente en dos centros Hospitalarios en la ciudad de México, Instituto Nacional de Cancerología de enero de 2007 a septiembre de 2017 y el Instituto Nacional de Rehabilitación de Julio de 2011 a Septiembre de 2017. Cada centro participante, determinó la susceptibilidad mediante el sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux) o por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight)

La concentración inhibitoria mínima fue determinada utilizando las guías de la CLSI (Clinical and Laboratory Standars Institute) por métodos de microdilución y difusión en disco. La calidad de control e interpretación de los resultados fueron realizados de acuerdo a CLSI M100- E28 2018. De acuerdo a los cortes de microdilución para susceptibilidad y resistencia conocidos por la CLSI, se consideró *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos con MIC ≥ 8 , resistente a cefalosporinas antipseudomonas (ceftazidima, cefepime) MIC ≥ 32 , resistente a aztreonam MIC ≥ 32 , resistente a piperacilina/tazobactam MIC $\geq 128/4$. Se determinó la presencia de carbapenemasas de acuerdo al método de inactivación de carbapenémicos cMIC test, de acuerdo a las normas de la CLSI (Fig. No 3). Las pruebas fenotípicas con inhibidores se realizó mediante pruebas de sinergia en difusión en disco, de acuerdo

a las normas de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y siguiendo el algoritmo de la Fig. No 4, Fig. No 5. Los cortes de susceptibilidad de acuerdo a la CLSI fueron para Ceftolozano/tazobactam y Ceftazidima/avibactam de ≥ 21 , por método de difusión en disco. *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, se usaron para el control de calidad Fig. No 6. PCR y secuenciación de DNA se utilizó para detectar betalactamasas de clase B (metalo-beta-lactamasas VIM, IMP, y NDM). Betalactamasas de la clase A y C se detectaron por métodos fenotípicos. Se infirió otros mecanismos de resistencia presentes (bomba de eflujo, pérdida de porinas) en cepas donde no se evidenció presencia de betalactamasas ó carbapenemasas de clase A, C o D.

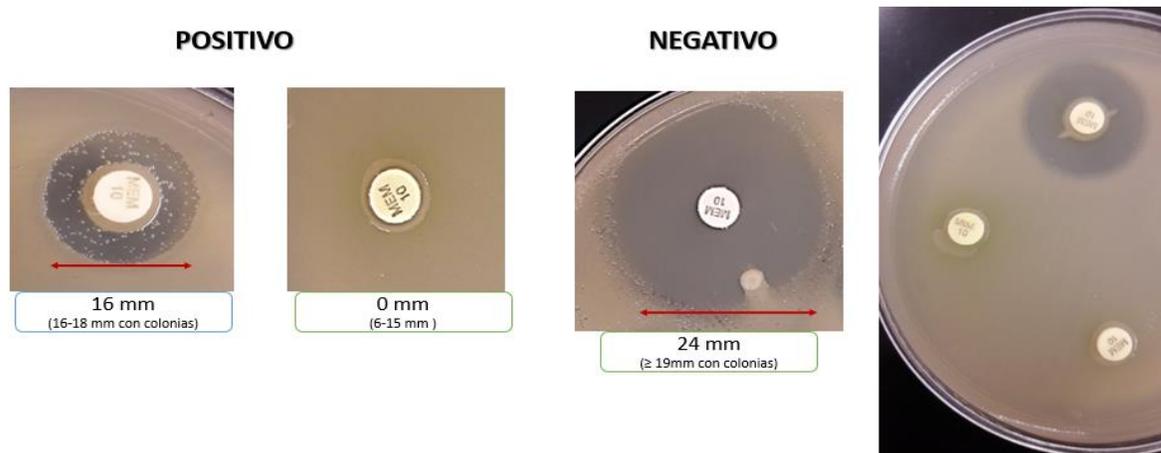


Fig.No 3 No Determinación de carbapenemasas mediante método de inactivación de carbapenémicos

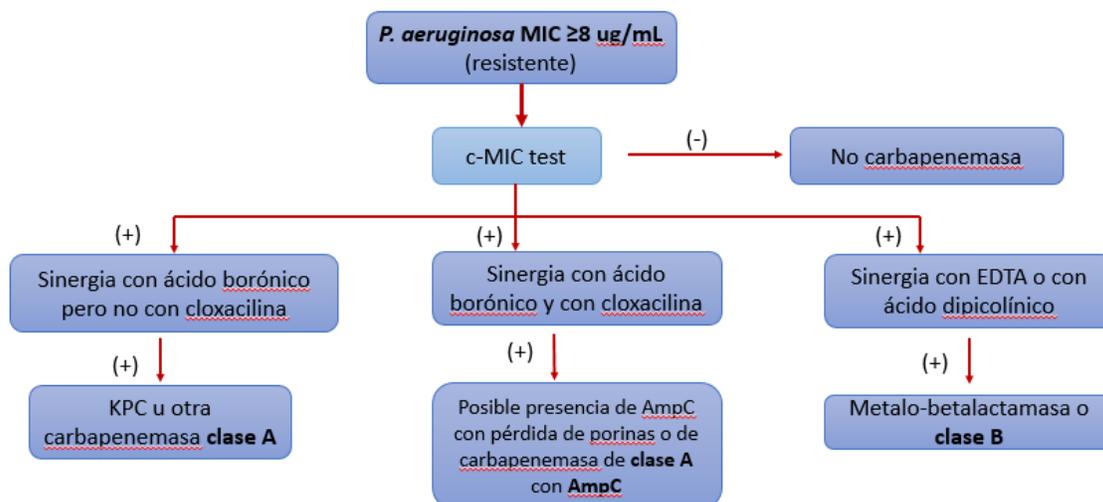


Fig. No 4 Algoritmo de identificación fenotípica de carbapenemasas.

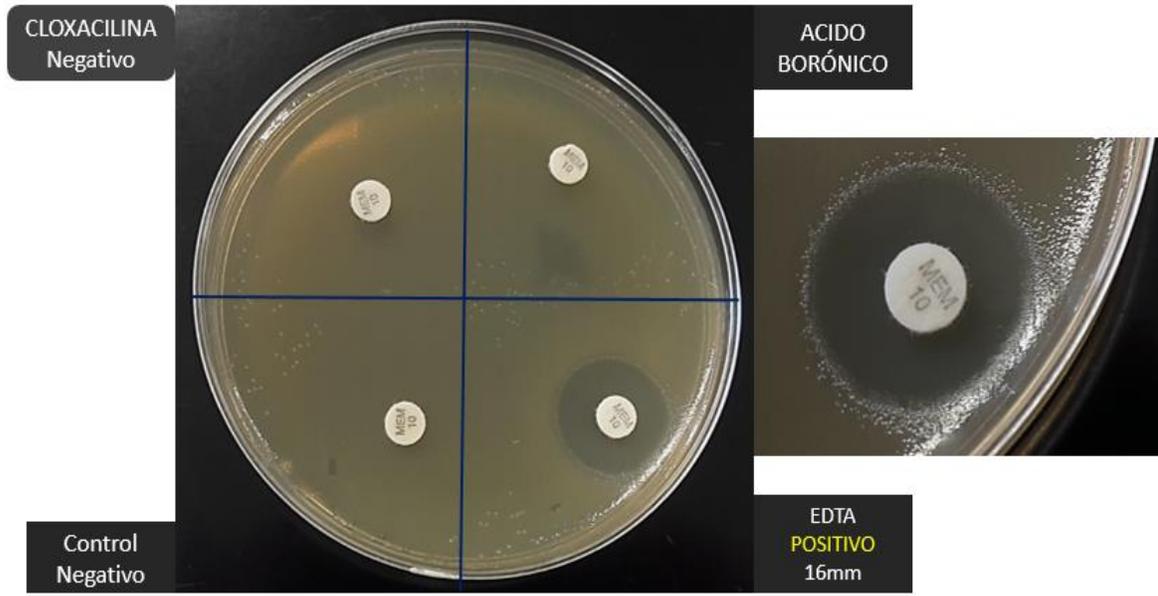


Fig. No 5 Determinación fenotípica con inhibidores de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*

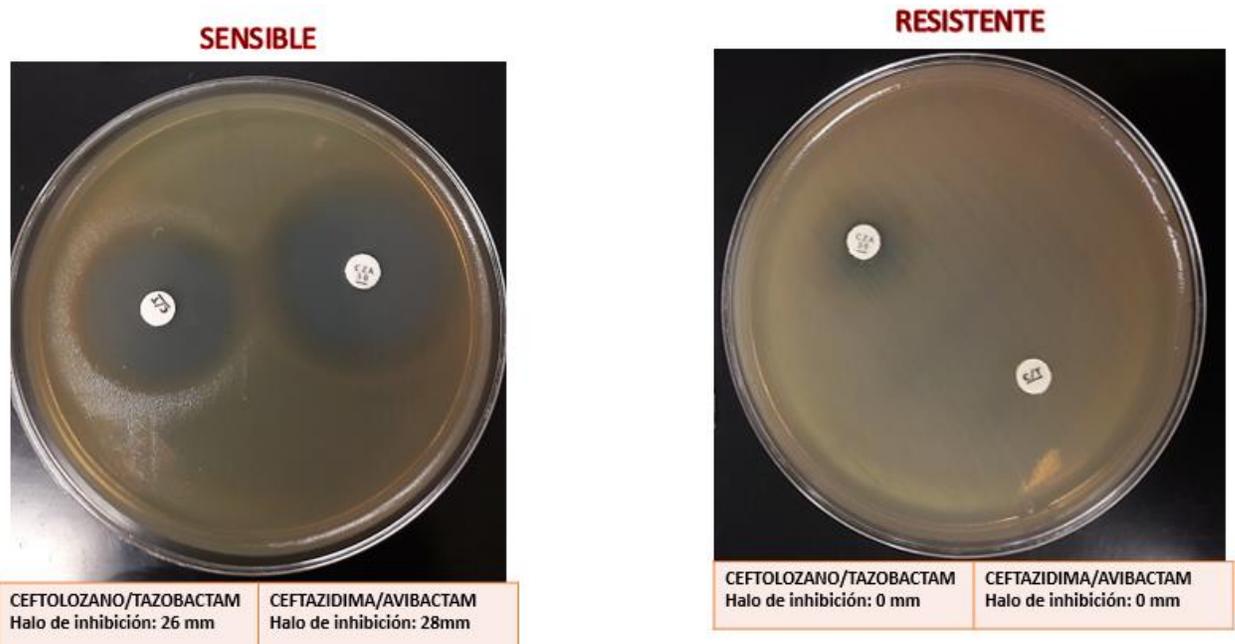


Fig. No 6. Actividad de Ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam en cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. (Derecha: resultado sensible, izquierda sin evidencia de actividad)

5.1, VARIABLES

VARIABLES	CUALITATIVA/NOMINAL	DEFINICIÓN OPERATIVA
RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS	SI NO	Mecanismo de resistencia a antibióticos expresado por carbapenemasas, sobrerregulación del sistema de Eflujo, disminución de la permeabilidad de la membrana externa.
MECANISMO DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS	5. Betalactamasas 6. Bombas de expulsión 7. Disminución en la permeabilidad de la membrana externa.	8. Resistencia producida por enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico 9. Bombas de expulsión: Capaces de eliminar antimicrobianos 10. La pérdida de porinas determina una menor concentración del antibiótico en el espacio periplásmico.

<p>TIPO DE CARBAPENEMASA</p>	<p>De acuerdo a la clasificación de Ambler:</p> <ul style="list-style-type: none"> • CLASE A • CLASE B • CLASE D 	<p>Clase A, comprenden cinco grupos: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC. Hidrolizan a todos los betalactamicos. BLEE, KPC.</p> <p>Clase B, contienen zinc, son las llamadas MBL, se inhiben por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).</p> <p>Clase D: Las betalactamasas tipo OXA se detectan, en integrones situados en plásmidos o transposones. Solo conservan sensibilidad a cefalosporinas. Conocidas como Oxa. KPC tipo OXA</p>
<p>SUSCEPTIBILIDAD A CEFTOLOZANO/TAZOBACTAM- CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible • Intermedio • Resistente 	<p>De acuerdo a los cortes determinados por CIM de acuerdo a criterios de CLSI 2018:</p> <p>*Ceftolozano/tazobactam</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sensible ≥ 21 mm • Intermedio 17-20 mm • Resistente ≤ 16 mm

		<p>Ceftazidima/avibactam</p> <ul style="list-style-type: none">• Sensible ≥ 21 mm• Resistente ≤ 20 mm
--	--	--

6. RESULTADOS

De un total de 734 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, se aislaron 100 cepas de hemocultivos, de las cuales 15 (7 INCAN y 8 INR) fueron excluidas de acuerdo a criterios de exclusión e inclusión. Se procedió a realizar análisis de 85 cepas, 7 (2 INCAN y 5 INR) se excluyeron por pérdida de datos. Analizando un total de 78 cepas resistentes a carbapenémicos, que corresponden 55% (43) y 45% (35) al INCAN e INR respectivamente (Fig. No 7), con una media de MIC de 37ug/mL.

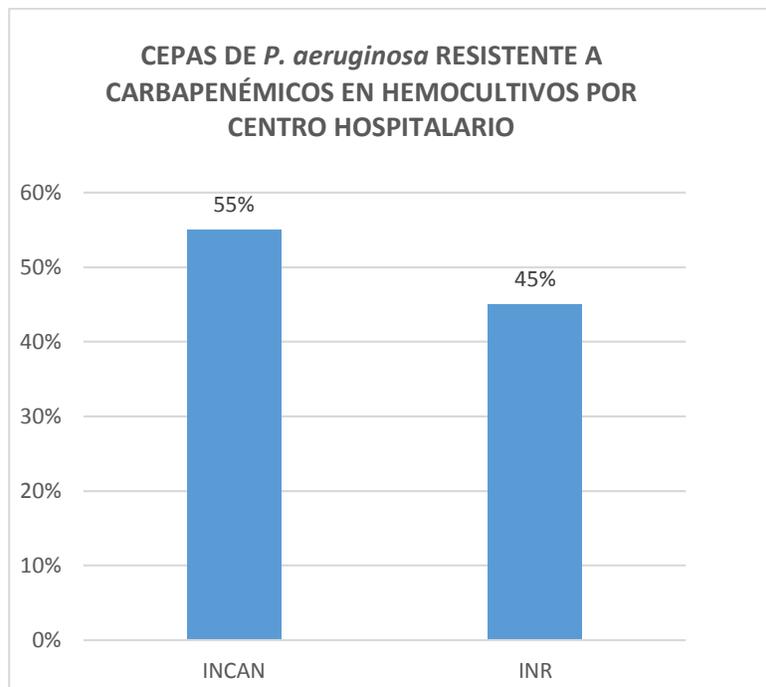


Fig. No 7

De las cepas analizadas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, cuando se comparó con otros betalactámicos, se identificó resistencia concomitante de un 82% (64/78) para Ceftazidima, 80% (62/78) para Cefepime, 74% (58/78) para Piperacilina/tazobactam y 67% (52/78) para Aztreonam (Fig. No 8).

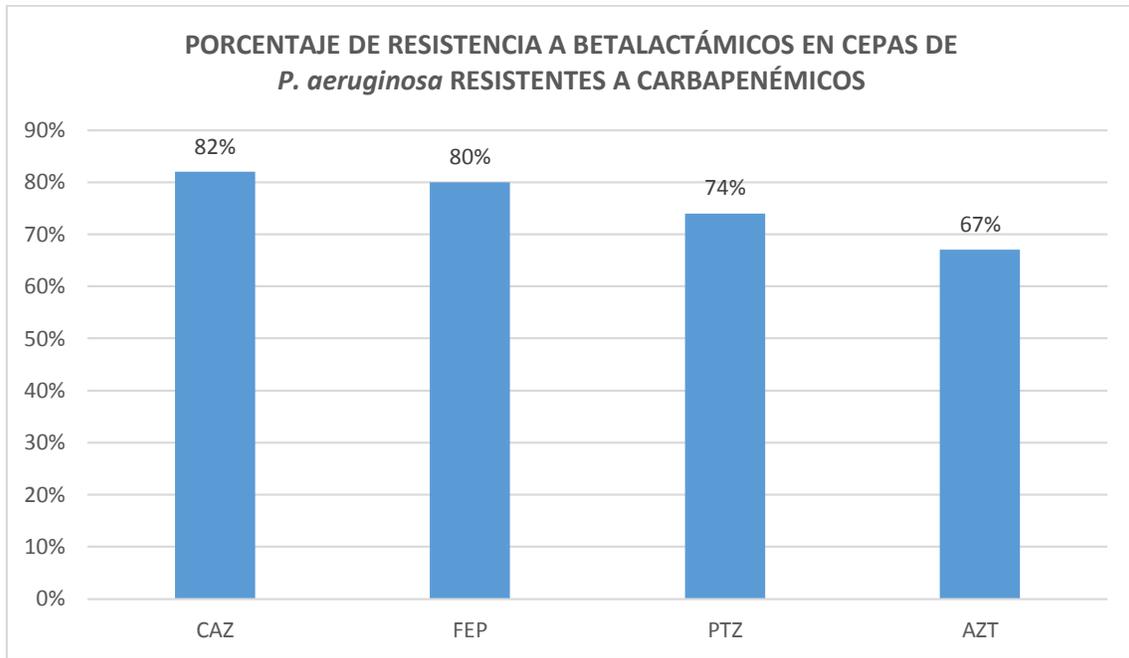


Fig. No 8

La determinación de carbapenemasas mediante método modificado de inactivación a carbapenémicos (cMIC test) fue positiva en 45% (35/78), 4 de ellas con halo de inhibición entre 16-18mm con desarrollo de colonias dentro del mismo, 2% (2/78) resultaron indeterminadas, y el 53% (41/78) negativas (Fig. No 9).

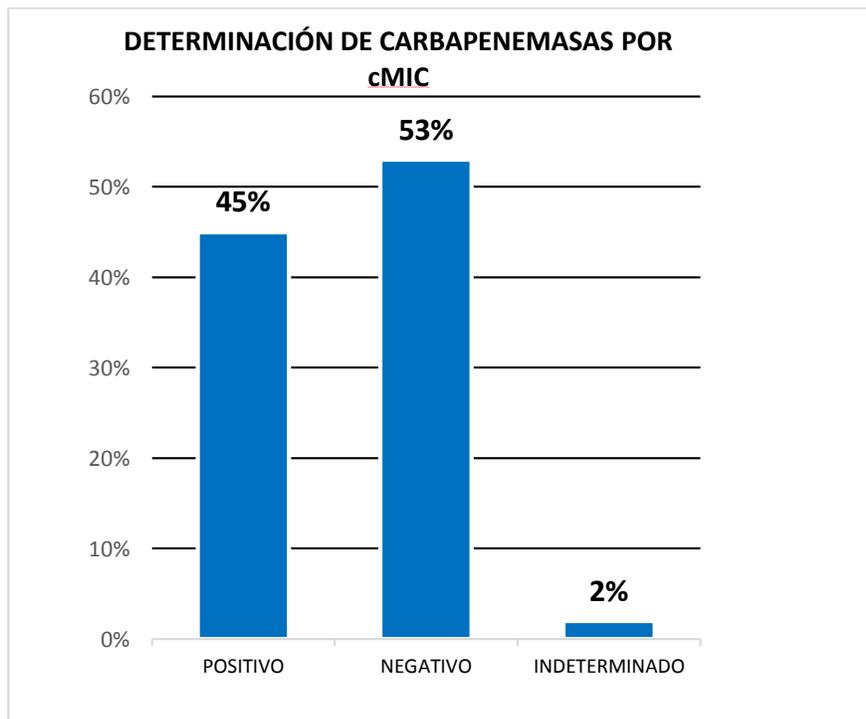


Fig. No 9

La determinación fenotípica de carbapenemasas, de acuerdo a la clasificación de Ambler, y/u otros mecanismos implicados en resistencia a carbapenémicos, mediante prueba de hidrólisis y sinergia con inhibidores fue del 40% (14/35) con EDTA (metalo-betalactamasa o clase B de Ambler), el resto no se identificó sinergia con ácido borónico, ni en presencia ó ausencia de cloxacilina, no logrando inferir mediante este método presencia de probable carbapenemasa clase A o KPC, AmpC con pérdida de porinas u otra clase A con AmpC (Fig. No 10).

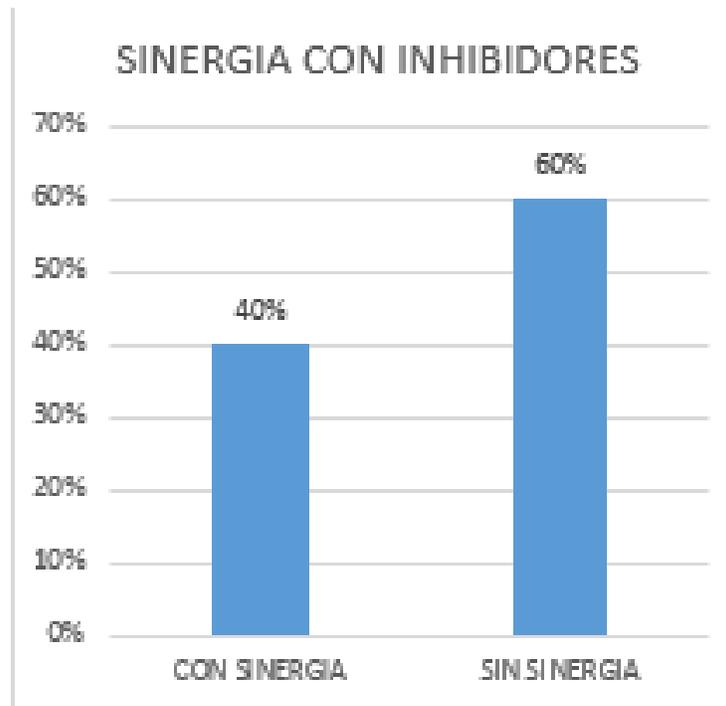


Fig. No 10

La presencia de metalo-betalactamasas, de acuerdo a reacción en cadena de polimerasa fue del 26% (16/78), 9% (7/78) corresponden a IMP y 11% (9/78) a VIM, no se identificó presencia de NDM (Fig. No 11)

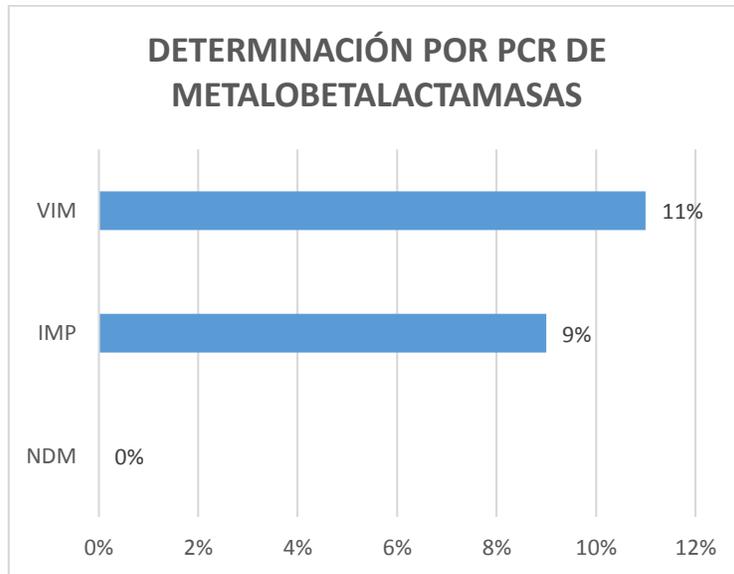


Fig. No 11

La relación de detección de identificación genotípica (VIM, IMP, NDM) de metalo-betalactamasas mediante PCR y métodos fenotípicos de sinergia con EDTA, fue del **57%** (8/14).

La sensibilidad a CZA y C/T se realizó mediante pruebas de difusión en disco, con susceptibilidad encontrada para CZA de 42% (33/78) y del 28% (22/78) para C/T. (Fig. No 12)

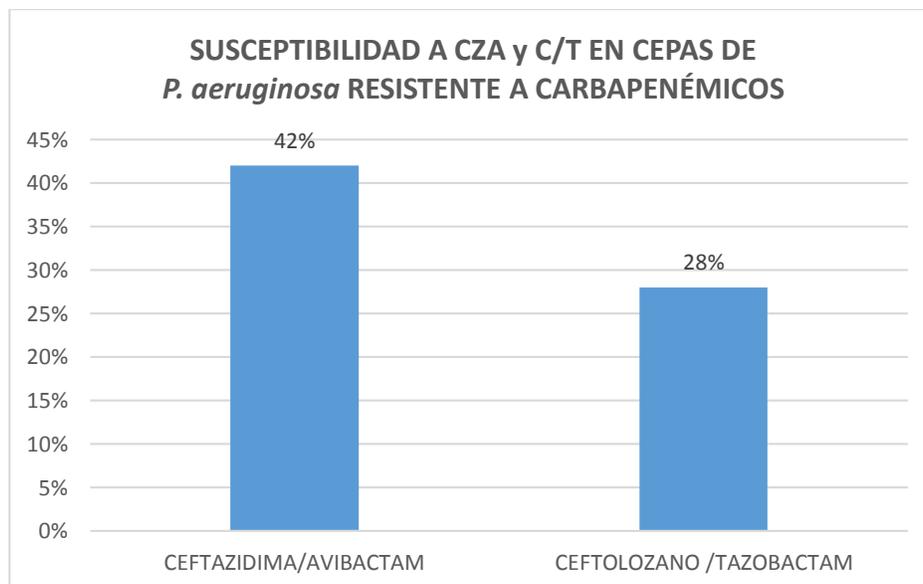


Fig. No 12

De las 78 cepas analizadas el 17% (13/78) fue susceptible a CZA y C/T, 27% (21/78) fue susceptible solo a una de las dos.

La actividad in vitro de Ceftazidima/avibactam en comparación a Ceftolozano/tazobactam y otros betalactámicos fue superior, como se muestra en la **tabla No 1**.

Tabla No 1: ACTIVIDAD IN VITRO DE CEFTAZIDIMA/AVIBACTAM Y CEFTOLOZANO/TAZOBACTAM EN CEPAS DE P. aeruginosa RESISTENTE A CARBAPENÉMICOS				
Organismos (No aislados)	Agente antimicrobiano	Susceptibilidad % (n= 78)	Intermedio % (n=78)	Resistencia % (n=78)
<i>P.aeruginosa</i> no susceptible a carbapenémicos (78)	Ceftazidima	15 (12)	3 (2)	82 (64)
	Cefepime	14 (11)	6 (5)	80 (62)
	Piperacilina/tazobactam	14 (11)	12 (9)	74(58)
	Aztreonam	31 (24)	67 (52)	2 (2)
	Doripenem	4 (3)	4 (3)	92 (72)
	Imipenem	3 (2)	1 (1)	96 (75)
	Meropenem	0 (0)	1 (1)	99 (77)
	Ceftazidima/avibactam	42 (33)	---	58 (45)
	Ceftolozano/tazobactam	28 (22)	0%	72 (56)

La actividad de Ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam, en presencia de metalobetalactamasas (35/78) fue del 0%, y en presencia de otro tipo de carbapenemasa identificada mediante métodos fenotípicos para Ceftolozaco/Tazobactam no mostró actividad, en relación a Ceftazidima/avibactam que tuvo susceptibilidad al 18% (4/35) **Tabla No 2.**

Tabla No 2: ACTIVIDAD DE CZA Y C/T EN RELACIÓN A CARBAPENEMASAS AISLADAS.		
CARBAPENEMASAS (35)	CZA	C/T
METALOBETALACTAMASAS (13)	0 (0%)	0 (0%)
OTRAS CARBAPENEMASAS (22)	4 (18%)	0 (0%)

7.DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana en bacterias Gram-negativas ha conducido a un aumento de la morbilidad y mortalidad. Pocos agentes antimicrobianos se han introducido en los últimos años para combatir estas infecciones. Ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam son medicamentos nuevos que tienen resultados prometedores contra organismos multirresistentes. En este estudio, evaluamos la actividad antimicrobiana in vitro de estos dos medicamentos contra 78 aislados de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos de muestras de hemocultivos, en dos centros hospitalarios Instituto Nacional de Cancerología e Instituto Nacional de Rehabilitación, donde este patógeno, se encuentra dentro de los principales agentes infecciosos oportunistas, relacionados con infecciones asociadas a cuidados de salud e intrahospitalarias.

La resistencia a los carbapenémicos suele ser el resultado de convergencia de uno o múltiples mecanismos de resistencia. Los tres mecanismos más importantes de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* es la producción de carbapenemasas clase B de Ambler (también llamadas metalobetalactamasas), pérdida mutacional de una porina OprD y sobreexpresión de bombas de eflujo. En nuestro estudio se determinó presencia de carbapenemasas en un 45% (35/78), coincidiendo con lo reportado en la literatura como uno de los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*.

La presencia de metalobetalactamasas fue de 40%, reportándose un poco menor o equiparable a la incidencia reportada en países Europeos que alcanza hasta un 70 %. En cuanto a países de América Latina la incidencia encontrada en nuestro trabajo es más elevada, comparado por ejemplo a países como Buenos Aires, Argentina donde de acuerdo a un estudio realizado por G. Pagniez, y colaboradores encontraron una incidencia de MBLs en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemes de 11 %, en Chile en el estudio de Alfonso Pérez y colaboradores en encontraron una Incidencia MBLs en *P. aeruginosa* resistentes

al Imipenem de 18.6 %. En Brasil de 15 %; y en realizados en Colombia por P. Martínez y colaboradores encontraron una incidencia de 14.5 %.

La relación de detección de identificación genotípica de metalo- betalactamasas mediante PCR y métodos fenotípicos de sinergia con EDTA, fue del 57% (8/14), esto probablemente asociado a la variabilidad genética en la expresión de los mismos, y considerando que solo se realizó determinación de 3 carbapenemasas IMP, NDM, VIM.

La prevalencia de gen IMP 1 en Japón es aproximadamente de 1 al 4.4%, en Corea el VIM 2 tiene una frecuencia de 95%. En el sur de Europa predomina el VIM-1 6.5%; Alemania prevalencia de IMP-1 del 43%, seguido de IMP-6 e IMP-4, mientras que VIM-1, VIM-4, y VIM-5 se ha encontrado en un 29%. En Estados Unidos y Canadá los reportes existentes muestran la presencia de diferentes subtipos de IMP y VIM. En América del Sur la identificación de VIM-2 ha sido del 31% y de IMP-1 del 8.3%. (20). En México en el estudio realizado por Martínez y cols. se vió mayor frecuencia de VIM, seguido de IMP, coincidiendo con los hallazgos encontrados en nuestro estudio con presencia de 9% (7/78) de IMP y 11% (9/78) de VIM, no se identificó presencia de NDM, esto probablemente en relación a la distribución geográfica, e identificación demostrada en la actualidad.

Los estudios in vitro reflejan buenos resultados de Ceftazidima/Avibactam, frente a *P. aeruginosa*. El 92% de las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas en el estudio INFORM fueron sensibles a Ceftazidima/avibactam utilizando el punto de corte establecido de 8 mg/l, frente al 77% de cepas sensibles a Ceftazidima sola el 72,7% a Meropenem. De igual forma, el 91,1% de las cepas analizadas en un estudio multicéntrico realizado por Duin y cols., de bacteriemia por *P. aeruginosa* realizado en España fueron sensibles a CZA. La actividad demostrada en forma in vitro en nuestro estudio correspondió al 42%, menor en relación a lo reportado en estudios previos.

Ceftolozane / tazobactam muestra una potente actividad in vitro contra especies de *Pseudomonas*, aunque la resistencia inicial ya es detectable. Entre el 86% y el 95% de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* son susceptibles de acuerdo a la revisión realizada por David van Duin y cols. donde se muestra una MIC de ceftolozano / tazobactam $\leq 8 \mu\text{g} / \text{ml}$. En el mismo estudio al evaluar cepas resistentes a meropenem se vio una actividad in vitro del 60% -80% respectivamente. En nuestro estudio encontramos una susceptibilidad in vitro de C/T del 28%, menor en relación a lo reportado en la literatura previa.

Ceftazidima-avibactam tuvo mejor actividad que el ceftolozano- tazobactam contra todos los aislados de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (42% frente a 28%, respectivamente). Esto probablemente a que Ceftazidima-avibactam tiene una buena actividad contra aislamientos de OXA-48, pero pobre actividad contra NDM-1. Ceftolozano-tazobactam, por otro lado, tuvo poca actividad contra todos estos aislados, esto probablemente a la expresión importante de OXA-48, no identificada por métodos fenotípicos, presencia de metalo-betalactamasas, entre otros mecanismos que limitan la actividad de esta droga.

En relación a la susceptibilidad comparada frente a otros betalactámicos, fue muy baja, menor al 40%, comparado con la literatura previa donde se reporta una actividad entre el 60-85%. Esto asociado a que aún dentro de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos, la expresión de carbapenemasas y dentro de ellas las metalo-betalactamasas, aún se encuentran dentro de los principales mecanismos de resistencia expresados por la bacteria. Por otra parte la presencia de carbapenemasas de clase D, presencia de porinas y eflujo, son mecanismos de resistencia que han ido incrementando en su expresión a lo largo del tiempo, siendo parte de probablemente la actividad limitada de nuevos antibióticos.

Finalmente, al ser el primer estudio en México que compara la actividad in vitro de estos dos nuevos antimicrobianos, vemos la complejidad que aun enmarca la resistencia antimicrobiana, y el desarrollo de nuevas drogas continua siendo un reto.

A pesar de haber valorado la actividad in vitro de estas dos nuevas drogas y la expresión de genes comúnmente expresados para metalo-betalactamasas, consideramos la importancia de conocer mecanismos fenotípicos de resistencia a carbapenémicos, accesibles a muchos laboratorios para tener el enfoque necesario, al momento de iniciar la cobertura antibiótica con estos dos nuevos antimicrobianos.

8. LIMITACIONES

Considerando todos los tipos de carbapenemasas presentes en *P. aeruginosa*, expresadas en cassettes de genes e integrones transferibles entre cepas, la expresión genética de los mismos es muy variable, por lo que realizar la identificación genética específica se vio limitada en el estudio al realizar solamente expresión de metalo- betalactamasas y dentro de ellas VIM, IMP y NDM, que se considera un importante al momento de valorar la actividad in vitro de CZA y C/T.

Actualmente aún no se halla dilucidado todos los mecanismos de resistencia expresados frente a estas nuevas moléculas, de acuerdo a reportes de caso la resistencia para Ceftazidima/avibactam podría estar mediada por plásmidos y la resistencia ceftolozano/tazobactam dada por modificación de β -lactamasas intrínsecas (AmpC) y adquiridas horizontalmente, mismos que no fueron evaluados en el presente estudio, que pudieron afectar los resultados presentados.

9. CONCLUSIONES

- De las 78 cepas analizadas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos aisladas en hemocultivos, 45% (35/78) fueron productoras de carbapenemasas, 35% de las carbapenemasas corresponden a metalo-betalactamasas.
- VIM es la metalo-betalactamasa de mayor frecuencia expresada.
- La respuesta in vitro de Ceftazidima/avibactam y Ceftolozano/tazobactam para cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos fue de 42% y 28% respectivamente.
- La actividad de CZA y C/T sobre cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo-betalactamasas es nula.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alnour TMS, Ahmed-Abakur EH (2017) Multidrug Resistant *Pseudomonas (P) aeruginosa*: Medical Impact, Pathogenicity, Resistance Mechanisms and Epidemiology. *JSM Microbiology* 5(3): 1046.
2. (Castón JJ, De la Torre A, Ruiz-Camps I, Sorlí ML, Torres V, Torre-Cisneros J. 2017. Salvage therapy with ceftolozane-tazobactam for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02136-16)
3. (Sherwin K. B. Sy. A mathematical model-based analysis of the time–kill kinetics of ceftazidime/avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*).
4. (F. Álvarez Lerma, et al. Ceftolozane-tazobactam for the treatment of ventilator-associated infections by colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*)
5. Sánchez A. Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* Revista Española de Quimioterapia 2004;17:336-340.
6. Malhotra S. et al. Proteome análisis of the effect of mucoid conversión on global protein expresión in *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 shows induction of the disulfide bond isomerase, DsbA. *J Bacteriol* 2000; 182:6999-7006.
7. Porrel L. et al. Characterization o VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing Metallo- β -lactamase and Its plasmido-ahd integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Ag Chemoter* 2000; 44:891-897.
8. CDC U.S. Departament of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention
9. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, Secretaria de Salud MEDICIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES EN HOSPITALES GENERALES DE LAS PRINCIPALES INSTITUCIONES PÚBLICAS DE SALUD. Noviembre de 2011

10. Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya VI eds. Enfermedades Infecciosas. Medellin: CIB; 2003: 460-462
11. Conejo MC, Garcia I, Martínez L, Picabea L, Pascual A.. Zinc Eluted from Siliconized Latex Urinary Catheters Decreases Oprd Expression, Causing Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobl Agents Chemother* 2003; 7: 2313-2315.
12. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore M. Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risk Associated with Different Antipseudomonal Agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1379-1382
13. Ochis M, McCusker M, Bains M, Hancock R. Negative Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer membrane Porin OprD Selective for Imipenem and Basic Amino Acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1085-1090
14. van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second generation beta-Lactam/beta-Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Infect Dis* 2016; 63(2): 234-41
15. Livermore DM, Mushtaq S, Meunier D, et al. Activity of ceftolozane/tazobactam against surveillance and 'problem' Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and non fermenters from the British Isles. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(8): 2278-89. 146
16. Pfaller MA, Bassetti M, Duncan LR, Castanheira M. Ceftolozane/tazobactam activity against drug-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* causing urinary tract and intraabdominal infections in Europe: report from an antimicrobial surveillance programme (2012-15).
17. *J Antimicrob Chemother* 2017. 72(5): 1386-95.4. Shortridge D, Castanheira M, Pfaller MA, Flamm RK. Ceftolozane-tazobactam activity against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from US hospitals: Report from an antimicrobial surveillance program (PACTS, 2012-2015). *Antimicrob Agents Chemother* 2017. 61(7): e00465-17. 154 5.

18. Buehrle DJ, Shields RK, Chen L, et al. Evaluation of the In Vitro Activity of Ceftazidime Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam against Meropenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(5): 3227-31.
19. Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM (2015) The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in GramNegative Rods. *PLoS ONE* 10(3): e0123690. doi:10.1371/journal.pone.0123690
20. Martinez A. Gerardo., Identificación de genes responsables de resistencia a carbapenémicos en cepas nosocomiales de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en algunos hospitales de México. Unidad Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social, Durango, febrero 2009
21. Duin D. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. *CID* 2016;63 (15 July) • REVIEW OF ANTI-INFECTIVE AGENTS