

Detección de sistemas de expulsión involucrados en la resistencia a antibióticos en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Alejandra Aquino-Andrade,* Rosa María Ribas-Aparicio,* Georgina Filio-Rodríguez,* Rafael Coria-Jiménez,** Ana Lilia Rolón- Montes de Oca,*** Gerardo Aparicio-Ozores*

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa presenta varios mecanismos de resistencia a la acción de los antimicrobianos: inactivación enzimática de antibióticos, cambios en el sitio blanco y en la permeabilidad de la membrana, así como la expulsión de los antibióticos que logran entrar a la célula. Este último mecanismo se realiza a través de la activación de bombas de eflujo, también conocidas como sistemas de expulsión. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método fenotípico que emplea antibióticos reporteros y un inhibidor de bombas de eflujo para detectar sistemas de expulsión en cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* de origen clínico. Se estudiaron 21 cepas a las que se les determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) a 16 antibióticos diferentes. Se realizó la detección de β -lactamases de espectro extendido (BLEE) y metalo- β -lactamases (MBL). Para la detección de los sistemas de expulsión del tipo Mex se utilizaron varios antibióticos reporteros: carbenicilina para MexAB-OprM; eritromicina para MexCD-OprJ; norfloxacina para MexEF-OprN y gentamicina para MexXY. La CIM para cada antibiótico fue determinada en ausencia y presencia de la fenil-arginina- β -naftilamida (FA β N) que actuó como inhibidor de las bombas de eflujo. Las cepas evaluadas fueron resistentes a por lo menos tres antibióticos de familias diferentes, lo que evidenció el fenómeno de multirresistencia. No se detectó actividad de BLEE o MBL en ninguna de las cepas. Todos los cultivos en presencia del FA β N disminuyeron la CIM al menos para uno de los sustratos. Los sistemas de expulsión detectados que se relacionaron con la resistencia presentaron las frecuencias siguientes: MexCD-OprN y MexCD-OprJ en un 86%, MexAB-OprM en un 52% y MexXY en un 43%.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa has several mechanisms of resistance to the action of antimicrobials: enzymatic inactivation of antibiotics, changes in the target site and the membrane permeability, and the expulsion of antibiotics that are able to enter the cell. This latter mechanism is via activation of efflux pumps, also known as removal systems. The aim of this study was to develop a phenotypic method that uses antibiotic as reporters and an inhibitor of removal systems to detect efflux pumps in multidrug-resistant strains of *P. aeruginosa* from clinical origin. We determined the minimal inhibitory concentration (MIC) to 16 antibiotics at 21 strains tested. We performed the detection of extended spectrum β -lactamases (ESBL) and metallo β -lactamases (MBL). For detection of efflux pumps of Mex type, different antibiotics were used as reporters: carbenicillin for MexAB-OprM, erythromycin for MexCD-OprJ, norfloxacin for MexEF-OprN, and gentamicin for MexXY. The MIC for each antibiotic was determined in absence and presence of the phenyl-arginine- β -naftilamine (FA β N), which acted as an inhibitor for efflux pumps. The strains tested were resistant to at least three antibiotics from different families, which showed the phenomenon of multidrug resistance. ESBL or MBL production was not detected in any of the strains tested. All strains reduced the CIM at least for one of the substrates in the presence of FA β N. Removal systems detected that were associated with resistance, showed the following frequencies: MexCD-OprN and MexCD-OprJ with 86%, MexAB-OprM with 52%, and MexXY with 43%.

* Instituto Politécnico Nacional.

** Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F.

*** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, México, D.F.

Correspondencia:

Dr. Gerardo Aparicio-Ozores. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Carpio y Plan de Ayala S/N, colonia Casco de Santo Tomás, 11340, México D.F. Fax: +52-55-57296207, E-mail: gaparico@ipn.mx

Recibido: 24-08-2009

Aceptado: 12-11-2009

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia a antibióticos, sistemas de expulsión, inhibidor de los sistemas de eflujo.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ampliamente distribuida en hábitats acuáticos y el suelo, y también se encuentra como parte de la biota normal del intestino, boca y piel de animales.¹ La infección de tejidos sanos por este microorganismo es poco frecuente, pero en huéspedes inmunocomprometidos, puede infectar prácticamente cualquier sitio anatómico, esto explica porqué la mayoría de las infecciones que provoca esta bacteria son intrahospitalarias, especialmente en las Unidades de Cuidados Intensivos. Estas infecciones pueden considerarse severas y frecuentemente comprometen la vida del paciente, como lo demuestra la alta tasa de mortalidad por bacteriemia en pacientes neutropénicos que varía entre 30-50%; mientras que en los casos de neumonía nosocomial fluctúa del 45 al 70%.² *P. aeruginosa* también es el patógeno que más se asocia con la morbilidad y mortalidad de pacientes con fibrosis quística (FQ) debido a infecciones crónicas en vías respiratorias bajas. El problema en la alta incidencia y severidad de las infecciones por *P. aeruginosa* se ha asociado en la última década con un incremento de su resistencia a los tratamientos antimicrobianos convencionales.³ Las infecciones causadas por cepas resistentes son un problema importante en hospitales de todo el mundo, ya que triplican la tasa de mortalidad, aumentan hasta nueve veces la tasa de bacteriemia y prolongan al menos al doble la estancia hospitalaria, lo que tiene un impacto en costos altos.⁴

Se reconocen algunos mecanismos principales en los que *P. aeruginosa* resiste la acción de agentes antimicrobianos: inactivación de un antibiótico por modificación, cambio en el sitio blanco y cambio en la permeabilidad de la membrana por la acción de componentes estructurales o por la activación de alguno de los sistemas de expulsión o bombas de eflujo.⁵ Los sistemas de expulsión pertenecen a la familia de transportadores secundarios de resistencia-nodulación-división, los cuales están ampliamente distribuidos entre las bacterias Gram negativas, y en el caso de *P. aeruginosa* son determinantes en la resistencia a antimicrobianos. Las bombas de eflujo están constituidas por una proteína de membrana interna cuya función es el intercambio protónico, un componente de membrana externa formador de cana-

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, efflux pumps, efflux pump inhibitor.

les (porina) y una proteína periplásmica fusionada a la membrana.⁶ Estos sistemas funcionan capturando del citoplasma y expulsando de la célula sustratos variados que pueden incluir a los antibióticos, colorantes, detergentes, inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos, solventes orgánicos, homoserin-lactonas asociadas en la señalización célula-célula y posiblemente factores de virulencia. En *P. aeruginosa* han sido descritos al menos siete sistemas de expulsión, destacando por su contribución en la resistencia a antimicrobianos de aislados clínicos: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexCD-OprN y MexXY, cuya sobreproducción confiere resistencia a los antibióticos β -lactámicos piperacilina, ticarcilina, ceftazidima, cefepime y meropenem; así como a las quinolonas y a los aminoglucósidos.⁷ El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método fenotípico que emplea antibióticos reporteros y un inhibidor de bombas de eflujo para detectar sistemas de expulsión en cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* de origen clínico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

A partir de aproximadamente 300 cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico de la colección de cepas de nuestro grupo de trabajo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, y por tener registrado el patrón de resistencia a los antibióticos que recomienda el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI* 2005);⁸ se seleccionaron 21 cepas multirresistentes de acuerdo a su perfil de resistencia y que eran sospechosas de presentar como mecanismo de resistencia alguna de las bombas de expulsión. Seis fueron aisladas de lavado bronquioalveolar de pacientes con fibrosis quística (FQ) y 15 de pacientes que sufrieron una infección nosocomial (IN) en alguno de los dos hospitales de tercer nivel, de donde fueron aisladas. La identificación de las cepas se confirmó utilizando el sistema automatizado VITEK1 (Biomerieux). Se utilizaron como cepas control: *P. aeruginosa* ATCC 27853 para los ensayos de concentración inhibitoria mínima (CIM) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 para los ensayos de β -lactamasas.

Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por medio del método de microdilución en caldo

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) a diferentes antibióticos de las familias de β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos utilizando el método de microdilución en caldo que refiere el documento del CLSI.⁹ Cada una de las cepas se sembró en agar Müller Hinton (AMH) por el método de estría cerrada con hisopo y se incubó de 18-24 h a 37°C. Posterior a la incubación se tomaron de dos a tres colonias, las cuales se resuspendieron en solución salina isotónica (NaCl 0.85%) hasta alcanzar una turbidez equivalente a la del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). En paralelo se prepararon microplacas con 96 pozos de fondo redondo, en las que se realizaron diluciones dobles de cada uno de los antibióticos con un volumen final de 50 μ L; por último se colocaron 50 μ L del inóculo en cada uno de los pozos. Por cada placa se incluyó una cepa control, así como un pozo control de crecimiento para cada una de las cepas. Las microplacas fueron incubadas durante 18-24 h a 37°C. Al concluir esta incubación los resultados fueron leídos e interpretados utilizando las tablas de referencia del CLSI.⁸

Detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y metalo- β -lactamasas (MBL)

La detección de BLEE se realizó utilizando una tira plástica E (MR), delgada, inerte y no porosa. Un lado de la tira está calibrado con una escala de lectura de CIM en μ g/mL. Un gradiente exponencial de antibiótico predefinido, secado y estabilizado está inmovilizado. Se localiza en un extremo de la superficie de la tira la concentración máxima del antibiótico cefotaxima (CT) y en el otro extremo de la tira, la combinación del mismo antibiótico y de ácido clavulánico (CT/CTL). Se siguió el procedimiento que describió el proveedor. A partir de un cultivo fresco de cada una de las cepas se hizo una suspensión en solución salina equivalente a la turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, esta suspensión se sembró con hisopo en una placa de AMH y posteriormente se colocaron tiras E de cefotaxima/cefotaxima-ácido clavulánico (CT/CTL) y ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulánico (TZ/TZL) (AB BIODISK). Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37°C. La presencia de BLEE

fue interpretada cuando al comparar la deformación en las elipses de CT/CTL o de TZ/TZL presentaron una CIM reducida por $\geq 3 \log_2$ en la presencia de ácido clavulánico.

La detección de MBL se realizó en las cepas cuya CIM a imipenem observó una lectura de $\geq 8 \mu$ g/mL. Se usaron tiras que contenían imipenem/imipenem con EDTA (IP/IPI) (AB BIODISK) y se siguió la misma metodología descrita para BLEE. La presencia de MBL fue confirmada por la deformación de las elipses, observándose una CIM reducida por $\geq 3 \log_2$ en presencia de EDTA.

Detección de sistemas de expulsión

Para la detección de los sistemas de expulsión se utilizaron antibióticos reporteros como marcadores fenotípicos de diferentes bombas de expulsión tipo Mex: carbenicilina 512 μ g/mL (MexAB-OprM), eritromicina 128 μ g/mL (MexCD-OprJ), norfloxacina 64 μ g/mL (MexEF-OprN) y gentamicina 32 μ g/mL (MexXY). La CIM a cada antibiótico fue determinada de manera similar al método de microdilución en caldo que se describió previamente, en ausencia y presencia del inhibidor de los sistemas tipo Mex, el fenil-arginina- β -naftilamida (FA β N, también conocido como MC, 207,110 de Sigma), probado a una concentración de 50 μ g/mL. Se interpretó que la cepa poseía un sistema de eflujo cuando la CIM para cada sustrato disminuyó dos diluciones en presencia del inhibidor.¹⁰

RESULTADOS

Perfiles de resistencia obtenidos mediante el método de microdilución en caldo

Las 21 cepas de *P. aeruginosa* fueron retadas contra 16 antibióticos (Cuadro 1). Los aislados mostraron una resistencia del 100% para cefotaxima; del 95% para piperacilina, piperacilina/tazobactam y ceftazidima; 76% para ticarcilina/ácido clavulánico, aztreonam y ofloxacina; 71% gatifloxacina y levofloxacina; 67% ciprofloxacino; 62% tobramicina; 57% cefepime; 52% imipenem, meropenem y gentamicina; todos los aislados fueron susceptibles a amikacina. Las cepas evaluadas presentaron desde 3 hasta 15 marcadores de resistencia y en la mayoría se observó resistencia por lo menos a 3 antibióticos de familias diferentes, lo que evidenció el fenómeno de multirresistencia. Las cepas que presentaron un patrón de resistencia de 13 a 15 antimicrobianos mostraron perfiles de resistencia similares.

Cuadro I. Perfiles de resistencia de 21 cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico.

Cepa	β-lactámicos								Fluoroquinolonas				Aminoglucósidos			Total de marca- dores	
	PIP	PTZ	TIM	CAZ	FEP	CTX	IMP	MRP	AZT	CIP	GAT	LEV	OFL	AK	GE	TOB	
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	15
10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	15
14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	15
16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	15
17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	14
18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	14
19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	14
20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	14
21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	14
11	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	13
13	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	13
12	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	S	12
9	R	R	R	R	S	R	I	S	I	R	R	R	R	S	R	R	11
15	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	11
8	S	S	R	R	I	R	I	I	R	R	R	R	R	I	R	R	10
1	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	I	I	R	7
6	R	R	R	R	S	R	S	S	R	I	I	I	R	S	S	S	7
2	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	5
3	R	R	S	R	S	R	S	S	R	I	I	I	S	S	S	S	5
5	R	R	S	R	S	R	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	4
4	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3

Cepas 1-6 de pacientes de fibrosis quística. Cepas 7-21 de pacientes con infección intrahospitalaria. PIP: piperacilina; PTZ: piperacilina/tazobactam; TIM: ticarcilina/ácido clavulánico; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; CTX: cefotaxima; IMP: imipenem; MRP: meropenem; AZT: aztreonam; CIP: ciprofloxacina; GAT: gatifloxacina; LEV: levofloxacina; OFL: ofloxacina; AK: amikacina; GE: gentamicina; TOB: tobramicina.

Detección de β-lactamasas

En resultados que no se muestran, se observó que las tiras de la prueba E no detectaron la producción de BLEE ni de MBL en las 21 cepas. Lo anterior sugirió que la resistencia que presentaron las cepas a los antibióticos β-lactámicos, no se debió a un mecanismo de resistencia relacionado con la producción de β-lactamasas.

Detección fenotípica de las bombas de expulsión mediante el uso de antibióticos reporteros y el inhibidor FAβN

Se realizó la detección fenotípica de bombas de eflujo en las 21 cepas, utilizando diferentes antibióticos de importancia en la clínica, como sustratos específicos para detectar los cuatro principales sistemas de expulsión de *P. aeruginosa*. Todas las cepas disminuyeron la CIM al menos a uno de los sustratos en presencia de FAβN, sin embargo el criterio establece que para relacionar con un sistema de expulsión debe presentarse una variación de al menos dos veces. Dos de las cepas evaluadas mostraron actividad de los cuatro sistemas de expulsión analizados, cua-

tro cepas a tres sistemas, diez cepas disminuyeron la CIM al menos a dos de los antibióticos reporteros y cinco cepas mostraron la presencia activa de uno (*Cuadro II*). De las cepas estudiadas 11/21 disminuyeron la CIM para carbenicilina en presencia del inhibidor. Es importante destacar que algunas de las cepas como la uno, 17, 18 y 19 presentaron la disminución de CIM en 10 diluciones (512 a 0.5 µg/mL). La presencia de MexXY fue detectada utilizando como sustrato gentamicina, la CIM disminuyó en 10/21 cepas, en cinco de las cuales la CIM a gentamicina fue ≥ 8 µg/mL. La mayor parte de las cepas (18/21) disminuyeron la CIM a eritromicina al adicionar FAβN, estos cambios variaron de dos a siete diluciones. La norfloxacina fue usada para la detección de MexEF-OprJ, 19/21 cepas disminuyeron la CIM al menos en dos diluciones a esta fluoroquinolona en presencia del inhibidor, 12 de las cuales presentaron CIM ≥ 8 µg/mL y en seis de ellas la CIM para norfloxacina varió de 8-32 µg/mL.

DISCUSIÓN

P. aeruginosa es reconocido como uno de los patógenos nosocomiales más importantes, también es el

Cuadro II. Detección fenotípica de sistemas de expulsión por cambio en la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cuatro antibióticos reporteros en presencia del inhibidor FA β N.

Cepa	CIM (μ g/ μ L)								# SED
	Carbenicilina		Gentamicina		Eritromicina		Norfloxacina		
	-FA β N	+FA β N	-FA β N	+FA β N	-FA β N	+FA β N	-FA β N	+FA β N	
12	512	32	16	0.125	128	32	16	0.5	4
18	512	0.5	8	0.031	128	32	16	1	4
1	512	0.5	8	0.031	128	8	0.125	0.062	3
4	128	32	0.25	0.25	128	32	8	0.5	3
10	512	256	16	0.125	128	16	16	0.5	3
11	512	128	16	8	128	16	16	0.5	3
2	256	16	4	0.25	128	16	4	0.25	2
5	128	0.5	1	0.031	64	0.5	0.125	0.062	2
6	128	64	4	0.25	128	32	8	0.5	2
8	512	512	32	32	256	8	32	4	2
9	64	64	32	32	256	32	16	2	2
13	512	512	32	32	128	16	32	8	2
15	512	4	0.25	0.062	128	64	16	0.5	2
16	512	512	16	16	128	32	16	1	2
17	512	0.5	0.25	0.125	128	8	4	0.125	2
19	512	0.5	8	0.031	128	64	1	0.031	2
3	64	16	2	0.25	128	8	2	0.25	1
7	512	512	16	16	128	64	16	0.5	1
14	512	512	16	16	128	32	32	16	1
20	512	512	32	32	128	32	1	0.031	1
21	512	512	32	32	256	8	4	0.25	1

FA β N = fenil-arginina- β -naftilamida; #SED = número de sistemas de expulsión detectados. En negritas se indica la disminución de la resistencia en al menos tres veces.

principal agente causal de infecciones en vías respiratorias bajas en pacientes con FQ. Las cepas incluidas en este estudio presentaron el fenómeno de multirresistencia, el cual podría ser explicado por la acción conjunta de mecanismos de resistencia como la producción de β -lactamasas, disminución en la permeabilidad de la membrana y cambios en el sitio blanco.⁵

Se observó un comportamiento distinto en cuanto a la resistencia a ceftazidima y cefepime en cepas de FQ y de IN. Las cepas de FQ (cepas 1-6) fueron resistentes a ceftazidima y sensibles a cefepime, lo que difiere con lo encontrado en otros estudios en los que la CIM para ambos antibióticos en aislamientos provenientes de pacientes con FQ fue de $> 32 \mu$ g/mL.¹¹ En tanto que las cepas provenientes de IN fueron resistentes a ambos antibióticos, lo que concuerda con estudios previos de este tipo de aislamientos.¹²

La resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa* es un problema importante en todo el mundo, con tasas de resistencia alrededor del 20% en Europa y por arriba del 30% en América Latina.^{12,13} En lo que respecta a las cepas de FQ analizadas, en su mayoría fueron sensibles a estos carbapenemes (excepto

la cepa 1 IMP $> 16 \mu$ g/mL). Las cepas aisladas de IN presentaron un perfil diferente, 12 de las 15 cepas de este origen tuvieron una CIM a imipenem $\geq 8 \mu$ g/mL. La resistencia a meropenem puede ser explicada por la sobreexpresión de MexAB-OprM, sin embargo, a la fecha no se ha descrito que el imipenem sea sustrato de alguna bomba de expulsión de *P. aeruginosa*.¹²

La resistencia a los aminoglucósidos fue diferente entre las cepas de FQ y de IN, se observó que las primeras fueron más sensibles a amikacina, gentamicina y tobramicina (excepto la cepa 1), a su vez difirieron de otros reportes en los que los aislados de FQ presentaron una resistencia marcada a amikacina y tobramicina $> 128 \mu$ g/mL.¹⁴

La diferencia más importante entre las cepas de FQ y las cepas de IN fueron los niveles de resistencia a fluoroquinolonas, ya que los aislados de IN fueron resistentes a todas las fluoroquinolonas probadas, mientras que los aislados de FQ variaron de intermedio a sensible. En algunos hospitales se ha reportado una prevalencia superior al 50% de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a fluoroquinolonas; inclusive se ha correlacionado la resistencia a ciprofloxacina con la presencia de mutaciones en *gyrA*, ya que poseen al

menos un cambio en un aminoácido (Asp87 → Asn). Todo lo anterior ha llevado a que algunos países hayan restringido el uso de fluoroquinolonas en cepas de *P. aeruginosa* con CIM a ciprofloxacina $\geq 0.125 \mu\text{g/mL}$.¹⁵

La resistencia a fluoroquinolonas en las cepas de *P. aeruginosa* se produce generalmente por una presión selectiva debida al contacto con el antibiótico. Por lo anterior y debido a que los pacientes con FQ son pediátricos y se tiene la contraindicación en el uso de este tipo de antibióticos, es posible entonces entender la escasa presencia de marcadores de resistencia para las quinolonas en estas cepas.¹⁶ Por el contrario, las cepas de IN las cuales fueron aisladas en hospitales donde la mayoría de los pacientes son adultos, es frecuente que sean tratados con antibióticos de esa familia. Algunas investigaciones revelan que los pacientes infectados con *P. aeruginosa* resistente a fluoroquinolonas tienen estancias hospitalarias más prolongadas y la tasa de mortalidad es tres veces mayor, comparada con los pacientes infectados con cepas sensibles, lo que sugiere que es posible que la resistencia a este grupo de antibióticos esté asociada con el incremento de la virulencia.¹⁵

La producción de BLEE no fue detectada utilizando pruebas E que contenían TZ/TZL ó CT/CTL. La producción de BLEE es un mecanismo común y de fácil detección fenotípica en bacilos Gram negativos fermentadores de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*, aunque no lo es para *P. aeruginosa*.¹⁷ Existen reportes alrededor de todo el mundo, incluyendo algunos países de Latinoamérica, en los que se ha determinado que sólo el 27% de los aislados de *P. aeruginosa* son productores de BLEE que se relaciona con la resistencia a varios antibióticos β -lactámicos.¹⁸

Las MBL son otros de los mecanismos enzimáticos presentes en *P. aeruginosa* y que le confieren resistencia contra antibióticos β -lactámicos, principalmente carbapenemes. Empleando la detección fenotípica, ninguna de las cepas de estudio dio positiva la prueba. La presencia de MBL es uno de los mecanismos mediante los cuales *P. aeruginosa* puede resistir al imipenem. El primer hallazgo de este tipo de enzimas en esta especie ocurrió en Japón en 1999 y desde esa fecha se han reportado en casi todo el mundo; sin embargo en Latinoamérica se describió recientemente en Brasil la presencia de SPM1 en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a IMP.¹⁹

La presencia de β -lactamasas, la forma en la que se transmiten y la ventaja que le confieren a *P.*

aeruginosa para diseminarse, representa un problema de salud, ya que reduce las opciones terapéuticas, por lo que no debe perderse de vista la detección y caracterización de éstas. Así mismo, la impermeabilidad de la membrana en *P. aeruginosa* es debida en parte a la presencia de bombas de eflujo, definidas como complejos enzimáticos que le confieren a las bacterias ventajas para sobrevivir en diferentes ambientes, ya que expulsan compuestos que le pueden resultar tóxicos; ejemplo de éstos son los diferentes antimicrobianos. *P. aeruginosa* posee un gran número de sistemas de excreción, los cuales se encuentran organizados en operones y su sobreexpresión ha sido relacionada con el fenómeno de multirresistencia.²⁰ Se han sintetizado algunos compuestos capaces de inhibir a estos sistemas, a la fecha no se ha encontrado alguno que pueda utilizarse en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*, sin embargo han sido útiles para la detección *in vitro* de sistemas de expulsión, tal es el caso del FA β N.^{21,22} Se realizó la detección fenotípica de bombas de eflujo a las 21 cepas utilizando diferentes antibióticos como sustratos específicos para los cuatro sistemas de importancia clínica: todas las cepas evaluadas disminuyeron la CIM al menos a uno de los sustratos en presencia de FA β N, sugiriendo que existen sistemas de secreción que expulsan a estos antibióticos, lo que contribuye directamente en la multirresistencia.

El 52% de las cepas estudiadas disminuyeron la CIM para carbenicilina en presencia de FA β N, estos resultados son similares a los descritos por Mesaros y cols.¹⁰ (2007), en los que cepas de origen clínico y con sobreexpresión de MexAB disminuyeron la CIM de 128 a 32 $\mu\text{g/mL}$. Es importante destacar que algunas de las cepas como la uno, 17, 18 y 19 presentaron una disminución de la CIM en 10 diluciones, lo que se pudo relacionar con la marcada resistencia a los β -lactámicos.

La CIM a gentamicina disminuyó en el 43% de las cepas evaluadas. MexXY es el único sistema de expulsión en *P. aeruginosa* que se ha relacionado con la expulsión de aminoglucósidos y cuya sobreexpresión fue inducida por la exposición prolongada a estos antibióticos.²³

La bomba de eflujo MexCD-OprJ le confiere a *P. aeruginosa* la resistencia a quinolonas, macrólidos, tetraciclinas y penicilinas, excepto carbenicilina.²⁴ Es importante mencionar que existen reportes que señalan que 61% de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a fluoroquinolonas sobreexpresan un sistema de expulsión.¹⁵

La norfloxacina fue usada para la detección del sistema MexEF-OprN, cuya expresión se ha vinculado con la resistencia cruzada a imipenem, esto por la influencia del regulador MexT sobre la porina OprD, principal entrada de imipenem a *P. aeruginosa*; en las cepas evaluadas se observó resistencia cruzada con este carbapenem y disminución de la CIM a norfloxacina en presencia del inhibidor de la bomba de expulsión.^{5,11}

Como puede observarse, el fenómeno de multirresistencia en *P. aeruginosa* es resultado de la participación de varios mecanismos, sin duda ante el desarrollo de nuevos antibióticos esta bacteria desplegará estrategias para hacerles frente. La prevención de las infecciones nosocomiales y la multirresistencia pueden ser disminuidas con la participación del laboratorio de microbiología realizando la identificación precisa del agente causal, así como de los patrones y mecanismos de resistencia microbiana a los antibióticos; así mismo, es sumamente importante el uso adecuado de los antibióticos, para lo que es necesaria la creación de políticas institucionales para el uso racional de antibióticos, así como la observancia estricta de buenas prácticas de higiene dentro de los nosocomios por parte de todo el personal involucrado en la estancia de los pacientes.

AGRADECIMIENTOS

AAA fue becaria del programa PIFI del IPN y del CONACYT. Este estudio recibió el apoyo económico del Instituto Politécnico Nacional a través del proyecto SIP 20082402.

REFERENCIAS

- Kiewitz C, Tümbler B. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol*. 2000; 182: 3125-35.
- Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*. 2005; 25: 1353-64.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006; 36: 78-91.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 560-78.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanism. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22: 582-610.
- Yoshihara E, Eda S. Diversity in the oligomeric channel structure of the multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*. 2007; 51: 47-52.
- Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19: 382-402.
- CLSI/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S15. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, Philadelphia, USA. 2005.
- CLSI/NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 6th edition. M07-A6. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, Philadelphia, USA. 2005.
- Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, Caceres NE, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 378-86.
- Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 52: 4062-70.
- Giske CG, Buarø L, Sundsfjord A, Wretlind B. Alterations of porins pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resistance*. 2008; 14: 23-30.
- Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Spanakis N, Maniatis AN, Tsakris A. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 66-70.
- Lee YC, Ahn BJ, Jin JS, Kim JU, Lee SH, Song DY, et al. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to all antimicrobial agents, but susceptible to colistin in Daegu Korea. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 358-63.
- Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone susceptible and resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 330-6.
- Pasquali F, Manfreda G. Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Microbiol*. 2007; 119: 304-10.
- Taneja N, Rao P, Arora J, Dogra A. Occurrence of ESBL & Amp-C β -lactamases & susceptibility to newer antimicrobial agents in complicated UTI. *Indian J Med Res*. 2008; 127: 85-8.
- Empel J, Filczak K, Mrówka A, Htyñiewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Warsaw Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 2829-34.
- Doi Y, Oliveira DJ, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 852-6.
- Jo JTH, Brinkman FSL, Hancock REW. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 1101-11.
- Hirakata Y, Kondo A, Hoshino K, Yano H, Arai K, Hirotani A, Kunishima H, Yamamoto, Hatta M, Kitagawa M, Kohno

- S, Kaku M. Efflux pump inhibitors reduce the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34: 343-6.
22. Tohidpour A, Najar-Peerayeh S, Mehrabadi JF, Rezaei-Yazdi H. Determination of the efflux pump-mediated resistance prevalence in *Pseudomonas aeruginosa*, using an efflux pump inhibitor. *Curr Microbiol*. 2009; 59: 352-5.
23. Jeannot K, Sobel ML, Garch FE, Poole K, Plésiat P. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug ribosome interaction. *J Bacteriol*. 2005; 187: 5341-6.
24. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh H, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 2242-6.