

R. 17.683

Dpto. Microbiología

T.O.
C/129

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
 BIBLIOTECA
 Nº de expediente 36
 Nº de libro 94
 Fecha de ingreso
 Clasificación

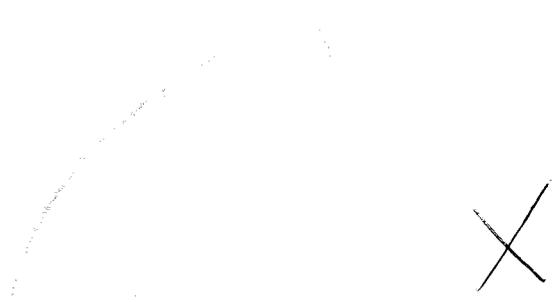
Alena de la Torre

TESIS DOCTORAL

MEDICINA



TITULO: EFECTO DE LAS SUB-CMI DE ANTIBIOTICOS SOBRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.



FRANCISCO CAMPA VALERA

AÑO 1991

INDICE

INTRODUCCION.....	pag 2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	pág 10
MATERIAL Y METODO.....	pág 16
MATERIAL.....	pág 17
METODO.....	pág 22
RESULTADOS.....	pág 34
DISCUSION.....	pág 70
CONCLUSIONES.....	pág 91
BIBLIOGRAFIA.....	pág 94

INTRODUCCION

Las primeras noticias que mencionan la actividad o naturaleza de *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) se refieren a su capacidad para colorear el pus de las heridas, haciéndolo verde-azulado (Sedillot,1850). Luke en 1862 asoció este hecho con infección al hallar bacilos en este material, pero no fue hasta 1882 cuando se aisló y bautizó esta bacteria por Gessard, recibiendo el nombre entonces, con el que se le conoce en alguna ocasión todavía, de *Bacillus pyocyaneus*, en atención al pigmento azulado que produce ,soluble en agua y cloroformo, con cierta actividad antimicrobiana ,denominado piocianina. Charrin en 1889 demostró su patogenicidad en animales y Osler en 1925 reconoció a *Pseudomonas aeruginosa* como patógeno secundario en humanos (1,2). Desde entonces el reconocimiento como patógeno de *P.aeruginosa* ha sido lento.

P.aeruginosa es un bacilo gram negativo móvil, aerobio estricto, de necesidades nutritivas simples, de ahí su capacidad para multiplicarse en cualquier medio humedo, con incluso minimas cantidades de compuestos orgánicos, que contamina incluso con cierta facilidad gotas oftálmicas,soluciones de todo tipo incluidas las antisépticas, jabones, equipos de anestesia y reanimación, ..etc,ligado de modo importante a entidades como infecciones nosocomiales, donde tiene un relevante papel e infecciones en sujetos inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas y sanos con amplia destrucción de su superficie cutánea(quemados) o que utilizan drogas por via intravenosa (3,4,5,6,7).

Un aspecto particularmente notable de la relevancia de *P.aeruginosa* en el ámbito médico viene determinado por su resistencia a los antibióticos, resistencia natural o adquirida - muy importante - determinada por la presión antibiótica ambiental. Hasta 1963, polimixina B y colistina eran los únicos tratamientos de elección en infecciones causadas por esta bacteria(8,9). La aparición este mismo año de gentamicina supuso un importante avance en su tratamiento. Los años siguientes vieron aparecer la primera penicilina específicamente antipseudomonal: la carbenicilina(10). Desde entonces no ha dejado de crecer el arsenal antibiótico contra esta bacteria: aminoglucosidos como tobramicina, sisomicina o amikacina; betalactámicos como azlocilina, piperacilina, cefatizidima, imipenem...etc(11,12,13). Sin embargo, a pesar de los considerables avances realizados, *P.aeruginosa* sigue siendo un germen difícil de tratar y de gran impacto en ambientes hospitalarios, asociado a una alta mortalidad(14).

De los mecanismos básicos de resistencia a antibióticos de *P.aeruginosa*: impermeabilidad de membrana, mutación del punto diana, alteración del antibiótico por enzimas..etc, es precisamente este último mecanismo el que más trascendencia clínica tiene y se halla particularmente ligado a unas determinadas enzimas inactivantes: las beta-lactamasas, que hidrolizan el anillo betalactámico de estos antibióticos. En los últimos años la influencia de los nuevos betalactámicos se ha acompañado del descubrimiento de un gran número de nuevas betalactamasas.

Pseudomonas aeruginosa es uno de los mejores ejemplos de resistencia a betalactámicos mediante la producción de esta enzima, que en muchos casos son inducibles por los propios antibióticos usados (15, 16, 17).

Desde 1940 en que Abraham y Chain descubrieron la primera de estas enzimas (18) -antes incluso del extendido uso que se hizo de la penicilina-, la importancia de estas proteínas ha crecido enormemente por su relación indisoluble a la ineffectividad o fracaso de los agentes antimicrobianos en el

tratamiento de infecciones potencialmente mortales. Hoy en día y tras casi cincuenta años de estudios de estas enzimas podemos todavía observar como a pesar de ir introduciendo en el arsenal terapéutico nuevas moléculas, se han ido descubriendo paralelamente nuevas betalactamasas capaces de destruir la actividad de tales agentes. (19).

Richmond y Sykes en 1973 (20) y posteriormente Sykes y Matthew en 1976 (21) propusieron una clasificación de estas enzimas, que incluía entre otros criterios el punto isoelectrico (p.I) que fue ampliamente aceptada. Sin embargo desde entonces se han ido descubriendo nuevas beta-lactamasas y se han replanteado antiguas clasificaciones. (22, 23, 24 y 25).

En otro sentido, es muy importante plantear la clasificación de las beta-lactamasas atendiendo a su origen genético, por cuanto que la resistencia de *Ps.aeruginosa*, así como la de otras bacterias, está estrechamente unida a la capacidad, inducida o no, de producir esta enzima. El material genético bacteriano, por ello, cromosoma, plásmidos, transposones, tiene un papel relevante directo no solo en la transmisibilidad de la resistencia bacteriana, sino en el fracaso de los regímenes terapéuticos empleados. De hecho, prácticamente todas las cepas de *P.aeruginosa* poseen una betalactamasa cromosómica que pertenece a la clase I de la clasificación de Richmond-Sykes (20). Bajo condiciones normales esta enzima se expresa a un nivel basal bajo, pero puede ser inducida con determinados antibióticos y producirse en grandes cantidades. Se han descrito también mutantes de *P.aeruginosa* parcial o totalmente desreprimidos que no producen o producen pequeñas cantidades de betalactamasa, e incluso mutantes que expresan moderados niveles de enzima de modo constitutivo. (26, 27).

Si a esto añadimos que penicilinas y cefalosporinas de primera generacion pueden comportarse como inductores de las enzimas de la clase I a concentraciones subinhibitorias y que las cepas de *P.aeruginosa* pueden adquirir plásmidos que medien betalactamasas constitutivas que inactivan antibioticos como carbenicilina o penicilinas antipseudomonas y cefalosporinas, podemos comprender que el problemas clínico y terapéutico de las betalactamasas sea de primer orden.

Así pues, las beta-lactamasas que podemos encontrar en *P.aeruginosa* son de la clase I (la cefalosporinasa inducible que se puede encontrar practicamente en todas las cepas) y además las que pertenecen a las llamadas clase IIIa-enzimas mediadas por plásmidos que se pueden encontrar también en otras bacterias entericas y, por último las de la clase V, la mayoría enzimas plasmidicas del tipo OXA 1,2 y 3 (20,27). Esta clasificación se corresponde con la de los grupos 1 y 2 establecido por Bush recientemente(23,24 y 25) ((Confer tablas I-1 e I-2).

Desde la perspectiva de su p.I, podemos establecer como las beta-lactamasas de la clase I tienen un rango entre 7,2 a 8,15. La clase IIIa, TEM-1 y TEM-2 poseen pI ácidos con valores que oscilan entre 5,25 a 5,6. Por su parte la clase V, en concreto la Vd tiene también un p.I ácido, siendo fácilmente distinguible de la IIIa por la especificidad de sustrato. Las enzimas que pertenecen a la clase Ve tienen un valor de pI neutro.

Con relación a la clase V hay que destacar que muchas de las beta-lactamasas de este tipo son mediadas por plásmidos. Las clases Vd y Ve parecen estar estrechamente relacionadas a la familia de *P.aeruginosa*. En este sentido, se pueden distinguir de otras clases de enzimas de la Clase V por su rápida hidrólisis de la carbenicilina. Justamente lo contrario que ocurre con cloxacilina y oxacilina.

Pseudomonas aeruginosa, pues, presenta una problemática muy particular por las especiales características que se reúnen en su caso:

-Resistencia marcada de *P.aeruginosa* a beta-lactámicos, incluso a los más recientes, debido en una gran proporción a la producción de beta-lactamasas.

-Codificación de estas enzimas por un gran número de plásmidos, que son transmisibles y por el cromosoma de la bacteria.

-Expresión inducible del enzima, de tal forma que la cantidad de beta-lactamasa se relaciona con la del antibiótico presente (20, 21).

-Alta mortalidad de las infecciones causadas por esta bacteria, sobre todo en pacientes con disminución de defensas, debido al fracaso del tratamiento antibiótico.

Estas condiciones hacen que en muchas ocasiones dosis insuficientes produzcan concentraciones tisulares por debajo de la concentración mínima inhibitoria correspondiente (Sub-CMI) que induzcan la producción de estas enzimas con los consiguientes perjuicios clínicos y personales. (26,28).

Nuestro estudio " Efecto de las Sub-CMI de antibióticos frente a *P. aeruginosa* " va dirigido a conocer qué antibióticos de los usados más extensamente contra esta bacteria son responsables de la inducción de beta-lactamasas, así como el tipo de enzima producido, en cepas aisladas en el Departamento de Microbiología de pacientes atendidos en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

TABLA I-1. ESQUEMA GENERAL DE CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS BACTERIANAS.

GRUPO	SUBTITULO	SUBSTRATOS PREFERIDOS	ENZIMAS REPRESENTATIVOS.
1	CEP-N	CEFALOSPORINAS	ENZ. CROMOSOMICAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
2a	PEN-Y	PENICILINAS	PENICILINASAS DE GRAM POSITIVOS
2b	BDS-Y	CEFALOSPORINAS Y PENICILINAS	TEM-1 Y TEM-2
2b'	EBS-Y	CEFALOSPORINAS PENICILINAS Y CEFOTAXIMA	TEM-3 Y TEM-5
2c	CAR-Y	PENICILINAS Y CARBENICLINA	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	CLX-Y	PENICILINAS CLOXACILINA	OXA-1, PSE-2
2e	CEP-Y	CEFALOSPORINAS	PROTEUS VULGARIS
3	MET-N	VARIABLE	B. CEREUS II P. MALTOPHILA L1
4.	PEN-N	PENICILINAS	P. CEPACIA

Adaptado de Bush, K. 1989 (23).

TABLA I-2
 CLASIFICACION DE LAS BETALACTAMASAS DE P.AERUGINOSA

CLASE	CARACTERES GENERALES	P. ISOELECTRICO	SUBSTRATO
Id	Cromosomica inducible	alcalino	Cefalosporinas
IIIa	Plasmidica (TEM-1, TEM-2)	acido	Penicilinas Cefalosporinas
Vd	Plasmidica (PSE)	acido	Penicilinas Carbenicilina
Ve	Plasmidica (PSE)	Neutro	Penicilinas Carbenicilina+

Basado en la clasificación de Richmond y Sykes, 1973(20) y el trabajo de Furth, 1979(26).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

P.aeruginosa es una bacteria de gran importancia clínica por la frecuencia de su aislamiento y las graves infecciones que produce, en especial, en centros hospitalarios (28,29, 30,31 32).

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por *Ps.aeruginosa* incluyen:

-Endocarditis:

Tanto de válvulas cardíacas naturales -en adictos a drogas por vía parenteral tiene una relevancia de primer rango-(33), como protésicas.

-Infecciones del tracto respiratorio:

Ocurren casi exclusivamente en pacientes que tienen comprometidas sus defensas, en especial pacientes neutropénicos tras quimioterapia antineoplásica. En estos casos la afección neumónica es de una gravedad extrema con éxitus a los 3-4 días del comienzo de los síntomas.

Los pacientes con fibrosis quística se infectan con gran constancia por *P.aeruginosa*, que juega un papel estelar en la progresión y agravamiento de las lesiones pulmonares (34).

-Bacteriemia y Sepsis

Es el cuarto germen productor en frecuencia de bacteriemias

hospitalarias (Tras *E. coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*) (35). Ocurre en pacientes en las edades extremas de la vida, hospitalizados, a menudo con carácter yatrogénico, reflejando esta frecuencia el potencial invasivo de esta bacteria en enfermos inmunocomprometidos. Son muy típicas determinadas lesiones cutáneas producidas por la bacteria en estos casos (ectima gangrenoso) (36).

Otras afecciones de relevancia que pueden producir son:

- Sistema nervioso, como abscesos y meningitis en pacientes inmunocomprometidos o tras traumatismos craneoencefálicos.
- Infecciones óticas, como la otitis externa maligna.
- Infecciones del globo ocular, implicándosele incluso en la oftalmia neonatorum (37).
- Infecciones óseas y articulares, en pacientes debilitados con factores de riesgo.
- Infecciones del tracto urinario, habitualmente adquiridas en ambientes hospitalarios y a menudo yatrogenicas (38).
- Afecciones gastrointestinales. De particular importancia es la sustitución de la flora habitual por *P. aeruginosa*, sirviendo el tracto gastrointestinal en este caso como reservorio bacteriano (39).
- Piel y tejidos blandos. De modo primario o por metástasis de un foco infectivo. Causa desde el renombrado ectima gangrenoso hasta infecciones gravísimas en quemados, donde monoterapias con antibióticos activos contra *Pseudomonas* pueden incluso estar contraindicadas debido al rápido desarrollo de resistencias (40). *P. aeruginosa* produce también el Síndrome de la Uña verde y el Síndrome del Pie tropical Sumergido (41, 42).

Sí tiene un particular interés la resistencia o insensibilidad de *P. aeruginosa* a antibióticos. Betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda e incluso de terminados agentes de tercera generación pueden no ser adecuadas para el tratamiento de infecciones causadas por este germen. Antibióticos como los aminoglicósidos, que clásicamente se usaban para su tratamiento se han visto cuestionados debido a la aparición cada vez más frecuentes de resistencias (43, 44, 45). Así, tal dimensión tenía este tema que una de las preocupaciones esenciales de la antibioterapia ha sido crear antibióticos con marca

da actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* : carbenicilina, azlocilina, piperacilina, ticarcilina, cefsulodina, cefoperazona y sobre todo ceftazidima(46).
Ultimamente se han incorporado al arsenal terapeutico imipenen y ciprofloxacina(47 y 48).

A pesar de todo *P.aeruginosa* sigue manteniendo su protagonismo y dado lo renuente que resulta este microorganismo y la frecuencia con que asienta en enfermos con disminucion de sus defensas, hace que en numerosas ocasiones sea necesario una combinacion de antibioticos para su tratamiento.(44).

El objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento de cepas de *Ps.aeruginosa* frente a un determinado numero de antibioticos y conocer la capacidad de inducir la produccion enzimatica de beta-lactamasa mediante concentraciones subinhibitorias de antibioticos, pues son concentraciones que tratamientos incorrectos o insuficientes pueden llegar a alcanzarse con facilidad en el foco infectivo. De este modo podremos conocer no sólo determinadas características biológicas de esta bacteria expresadas únicamente cuando se ponen en contacto con agentes antimicrobianos, como es el caso de las betalactamasas inducibles, intentando incluso establecer condiciones similares a las del organismo mediante el estudio de este fenómeno en plasma humano, sino la posible repercusión clínica de tratamientos incorrectos.

Se planteo el estudio de 33 cepas aisladas en el Departamento de Microbiología de muestras clínicas recibidas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

Para llevar a cabo el objetivo anteriormente propuesto se estudio el comportamiento de *P.aeruginosa* frente a los siguientes agentes antimicrobianos, usados de modo especial en el tratamiento de infecciones producidas por esta bacteria: seis beta lactamicos: azlocilina, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, moxalactam e imipenem, y dos aminoglicosidos: gentamicina y sisomicina.

En este sentido se plantearon los siguientes trabajos:

-Determinacion de la CMI de los antibioticos anteriormente expuestos frente a las cepas de *P.aeruginosa*.

-Determinacion de la produccion de betalactamasa.

-Determinación de la actividad de betalactamasa.

-Determinacion cuantitativa de la actividad enzimatica del extracto celular de las cepas.

-Determinación del espectro de actividades antibioticas de las betalactamasas de las cepas de *P.aeruginosa*.

-Determinacion de la capacidad de induccion a la produccion de betalactamasa de las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de los antibioticos mencionados.

-Estudio de los patrones de punto Isoelectrico de las betalactamasas de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, tanto espontáneamente, como sometidas a inducción.

-Determinacion de la capacidad de inducción en líquidos orgánicos humanos, en concreto y ya que las cepas procedentes de aislamientos de hemocultivos de pacientes, utilizaremos plasma.

Nuestro estudio puede tener la importancia de apreciar de modo mas concreto el comportamiento de *Ps.aeruginosa* frente a antibioticos usados ampliamente en el tratamiento de las graves infecciones producidas por esta bacteria, ya que, en muchas ocasiones la administracion de dosis inadecuadas, que producen las Sub-CMI en tejidos humanos pueden producir un efecto contrario al deseado y esperado al administrar los antimicrobianos.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL

CEPAS BACTERIANAS

Treinta y tres aislamientos clínicos de *P.aeruginosa* procedentes de hemocultivos de pacientes ingresados en el Hospital Universitario Virgen Macarena fueron incluidos en el estudio.

Su identificación se realizó mediante los métodos habituales (49 y 50). Los caracteres mínimos de identificación de cepas de *Ps.aeruginosa* incluyen :

- Movilidad positiva
- Medio OFGlucosa abierto ácido positivo
- Medio OF maltosa ácido negativo
- Indofenol oxidasa positivo
- Pioverdina positivo o negativo
- L-arginina dihidrolasa positivo
- Crecimiento a 42 grados centígrados positivo.

ANTIBIOTICOS

Los antibióticos en forma de polvo valorados usados en el estudio fueron suministrados por las siguientes casas comerciales:

- AZLOCILINA: Bayer
- CEFOPERAZONA: Pfizer
- CEFOTAXIMA: Hoescht
- CEFOXITINA: Merck Sharp & Dohme
- CEFTAZIDIMA: Glaxo
- GENTAMICINA: Schering
- IMIPENEM : Merck Sharp & Dhome
- MOXALACTAM: Lilly
- SISOMICINA: Schering

DISCOS DE ANTIBIOTICOS

- AZLOCILINA
- AMICACINA

- AZTREONAM
- CARBENICILINA
- CEFOPERAZONA
- CEFOTAXIMA
- CEFOXITINA
- CEFTAZIDIMA
- CEFTIZOXIMA
- CEFTRIAXONA
- GENTAMICINA
- IMIPENEM
- MOXALACTAM
- NETILMICINA
- PIPERACILINA
- SISOMICINA
- TICARCILINA
- TICARCILINA/A.CLAVULANICO
- TOBRAMICINA

La casa suministradora fue DIFCO.

MEDIO DE PRUEBA DE OXIDACION FERMENTACION
MEDIO BASAL OF

Composicion

- Peptona:digerido pancreatico de caseina:2 grs
- ClNa:5 grs
- Fosfato dipotasico:0,30 grs
- Azul de Bromotimol:0,03 grs
- Agar:3grs
- Agua destilada:1 litro
- pH final 7,1

Preparacion

- Dispensar 3 o 4 ml por tubo de ensayo de 13 por 100mm.Autoclavar a 121 grados Centígrados durante 15 minutos.

- Enfriar y añadir solución de glucosa o maltosa 10% en agua destilada para una concentración final de 1%.
- Dispensar asepticamente.
- Inocular-punzar-livianamente dos tubos de medio de un cultivo joven de un pico de agar. Cubrir uno de los tubos con una capa de unos 5 mm de vaselina derretida esteril o aceite de parafina esteril.
- Incubar 3 o 4 dias.
- Lectura: Formación de ácido unicamente en el tubo abierto con glucosa.-
- Interpretación: Utilización oxidativa de la glucosa.

MEDIO PARA LA DETERMINACION DE LA CMI

El medio empleado para la determinación de la CMI fue de MUELLER-HINTON.

Su composición es:

- Infusión de carne.....300 grs
- Ácidos casamino.....17,5 grs
- Almidón.....1,5 grs
- Ágar.....17 grs

Disolver 38 grs de este producto en un litro de agua destilada calentando hasta ebullición. Llevar a pH 7. Esterilizar en autoclave a 121 grados centígrados y a 1,5 atmósferas de presión.

-Se dispensa a 45 grados centígrados.

Para el inóculo se utilizó caldo Mueller-Hinton.

La incubación se hizo a 37°C.

NITROCEFÍN (Glaxo 87/312)

(Cefalosporina cromogénica)

Suministrado por Oxoid.

Nitrocefín liofilizado (1 mgr) más fluido de rehidratación (1,9 ml de Buffer fosfato 0,1 M y 0,1 de Dimetilsulfóxido)

Preparación: Para reconstituir el nitrocefín liofilizado se añade 2 ml del vial de rehidratación. Se conserva a 4 grados centígrados. Se preserva de la luz con papel de aluminio.

CENTRIFUGA

Utilizamos las siguientes:

-Biofuge A (Heraeus).

-IEC Clinical Centrifugate. Damon IEC Division.

ESPECTROFOTOMETRO

- Spéctronic 20. Bausch & Lomb.

SONICADOR

-Sonifier (cell disruptor W-350)

Heat Systems Ultrasonic, Inc. (Ultrasonic Devices).

ISOELECTROENFOQUE

-Phastsystem (Pharmacia) con Immunotransfer acoplado. (51).

-Placas de Isoelectroenfoco con gradiente de pH de 3 a 9.

METODO

Tras someter a las cepas al procedimiento standard de identificacion(49 y 50) se procede a la determinacion de la CMI.

DETERMINACION DE LA CMI POR EL METODO DE DILUCION EN AGAR

La sensibilidad antibiotica de estas cepas la realizamos mediante la determinacion de la CMI(Concentracion Minima Inhibitoria) de cada uno de los antibioticos por el Método de Dilucion en Agar (52,53 y 54) utilizando el Replicador de Steer(55) que nos permite determinar la sensibilidad de modo simultaneo a 36 microorganismos y emplear un rango variable de diluciones.

Se define la CMI como la mas baja concentracion de antibiotico que inhibe el crecimiento bacteriano.Se expresa en ugr/ml (56).

ANTIBIOTICOS

Las concentraciones de antibioticos que utilizamos fueron:

Azlocilina, Cefoperazona, Cefotaxima, Ceftazidima, Moxalactam:
1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 ugrs/ml.

Imipenec: 1, 2, 4, 16 , 32 y 64ugrs/ml.

Sisomicina y Gentamicina: 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ugrs/ml.

PREPARACION DE LAS PLACAS

Tras rotular las diferentes placas Petri esteriles indicando el nombre del antibiotico correspondiente y la concentracion especifica, se añade en 1 ml con pipeta semiautomatica la cantidad de antibiotico necesario, previamente diluido en agua, para que al añadir 18 ml de Mueller Hinton fundente a una temperatura de 45 grados centigrados se obtenga en la placa la concentracion por ml deseada.

Se hace girar la placa para que se mezcle uniformemente medio de cultivo y antibiotico y se dejan enfriar a temperatura ambiente hasta su total solidificacion sobre una superficie homogeneamente horizontal para alcanzar igual nivel en toda la placa.

Antes de inocular las placas es preciso asegurarse que estan totalmente secas para lo cual se mantienen en estufa a 35 grados centigrados durante 10-20 minutos.

PREPARACION Y MEDICION DEL INOCULO

Se toman 4-5 colonias de un cultivo de 18 horas y se inoculan en 5 ml de caldo Mueller-Hinton que se incuban durante 2 a 3 horas hasta alcanzar una turbidez igual al numero 1 de la Escala de Mc Farland que equivale a 10^7-8 ufc (Unidades Formadoras de Colonias). La medicion se efectua en un espectrofotometro a una longitud de onda de 460 nm, diluyendo posteriormente el inoculo hasta obtener 10^5 ufc. A continuacion se procede al llenado con pipeta Pasteur de los pocillos del Replicador Steer y a la inoculacion multiple de las placas.

Para control de calidad del Método utilizamos 3 cepas de referencia o patrón que son : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922 y *Estafilococo aureus* ATCC 25923.

De igual manera , para controlar la viabilidad e inalterabilidad de las cepas bacterianas a lo largo del proceso inoculamos al principio, medio y final del mismo, tres placas de Mueller-Hinton exentas de antibiotico.

Tras absorberse el inoculo se incuban en estufa a 35 grados centigrados durante 18 h.

LECTURA DE RESULTADOS

La CMI vendrá determinada por la menor concentración del antibiotico que inhiba el crecimiento bacteriano.

DETECCION DE LA PRODUCCION DE BETALACTAMASA.

Utilizamos el método de la Cefalosporina Cromogénica o Nitrocefín.(57). Este es uno de los métodos más sensibles y específicos para la detección de betalactamasas—incluso podría ser que estuviéramos detectando peniciloilación de las proteínas, sin liberación de peniciloato—. Es simple de utilizar y da una respuesta prácticamente inmediata. Este substrato cromogénico es altamente sensible frente a todas las betalactamasas con excepción de la betalactamasa tipo I de *Bacillus cereus*.

En un tubo conteniendo 1 ml de solución salina estéril,agregar unas colonias del cultivo de *P.aeruginosa* a estudiar (2 ó 3).A continuación añadimos 0,05 ml de Nitrocefín a la concentración que hemos especificado anteriormente. La lectura puede hacerse a los 10 minutos aproximadamente. Se preserva entretanto de la luz pero en caso de negatividad puede dejarse incluso hasta dos o tres horas para detectar los bajos productores de beta-lactamasa.

Se utilizan testigos negativo y positivo(*E.coli* ATCC 25922 y *Estafilococo aureus* ATCC 6538P,respectivamente).

Lectura de los resultados:

Los organismos que produzcan betalactamasas produzcan en el tubo una coloración rojiza, mientras que los negativos permanecieran amarillos. Esto se debe a que la hidrólisis del nitrocefin por la acción de la betalactamasa de la bacteria existente en el medio conlleva igualmente un cambio en la absorción de la longitud de onda, con el consiguiente cambio de coloración. El anillo intacto presenta un pico de absorción en 386 nm, mientras que el roto en 482 nm, la longitud de onda a la que verificaremos nuestras experiencias.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL EXTRACTO CELULAR DE LAS CEPAS.

Seguimos el método descrito por Vecoli et al y O,Callaghan et al (58 y 59).

Las células bacterianas se hicieron crecer en caldo TSB (Trypticase soy broth, BBL Microbiology systems), para ser inoculadas posteriormente en caldo Mueller-Hinton que se incubó durante 18 horas a una temperatura de 37 grados centígrados para a continuación ser sometidas a centrifugación a 5000 g, durante 30 minutos a cuatro grados centígrados. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el material sedimentado en agua destilada (7,5 ml) para a continuación someterlo a desintegración ultrasonica con el sonicador Sonifier (Cell Disruptor W-350. Heat System Ultrasonic, Inc). Las células son mantenidas a cuatro

grados centígrados mientras se sonicán a una amplitud de 6 nm, durante dos minutos, dos veces cada muestra (60,61). Las preparaciones entretanto se mantienen en agua helada.

Los extractos celulares son sometidos de nuevo a centrifugación a 11.000 g durante 30 minutos, desechándose a continuación el sedimento y pasando a someter a la muestra a un estudio espectrofotométrico.

Se añade a la muestra estudio 0,1 ml de nitrocephin y se mide el grado de hidrólisis de esta sustancia en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb) a 482 nm.

Se calcula el número de micromoles de sustrato hidrolizado por minuto por ml de enzima existente, multiplicando el cambio en la densidad óptica por los micromoles de sustrato en el tubo problema por la dilución enzimática y dividiéndolo por la densidad óptica del sustrato al inicio de la reacción por el tiempo (62).

$$R = \frac{CDO \times N \times DE}{DO1 \times T}$$

R: Micromoles de sustrato hidrolizado/min/ml enzima

COD: Cambio en la densidad óptica

N: Micromoles de sustrato en el tubo

DO1: Densidad óptica del sustrato intacto

T: Tiempo

Se usa un control sin antibiótico, repitiéndose tres veces cada experimento.

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE BETALACTAMASA (SPOT-TEST)

En este caso, 1 ml de la solución del extracto crudo de betalactamasas de *P.aeruginosa*, tal como se ha especificado anteriormente, se vierte sobre un disco con nitrocefín, siete veces más concentrado que para la determinación habitual de las cepas productoras de betalactamasa. Se mide mediante reloj el número de segundos que tarda en variar de color el nitrocefín.



INDUCCION DE LA PRODUCCION DE BETALACTAMASA

Las células bacterianas se hicieron crecer en caldo TSB (BBL Microbiology Systems) para ser inoculadas posteriormente en caldo Mueller-Hinton durante unas 18 h a una temperatura de 37 grados centígrados, añadiéndose concentraciones subinhibitorias de los antibióticos a probar, en concreto, la cuarta dilución de la CMI, para a continuación ser sometidas a una centrifugación de 6000 g, durante 45 minutos a cuatro grados centígrados.

Tras ello se desecha el sobrenadante, siendo las bacterias lavadas con Buffer fosfato 0,1 M a pH 7.0 (27,63) y sometidas a desintegración ultrasonica con el sonicador Sonifier (Cell Disruptor W-350, Heat System Ultrasonic, Inc). Las células son mantenidas a cuatro grados centígrados mientras se sonicán a una amplitud de 6 nm, durante dos minutos, dos veces cada muestra. Las preparaciones entretanto se mantienen en agua helada.

Los extractos celulares son sometidos de nuevo a centrifugación a 11.000 g durante 30 minutos, desechándose a continuación el sedimento y pasando a someter a las muestras a un estudio espectrofotométrico.

Se añade a la muestra estudio 0,1 ml de nitrocefina y se mide el grado de hidrólisis de esta sustancia en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb) a una densidad óptica de 482 nm.

Se calcula el número de micromoles de sustrato hidrolizado por minuto por ml de enzima existente, multiplicando el cambio en la densidad óptica por los micromoles de sustrato en el tubo problema por la dilución enzimática existente y dividiéndolo por la densidad óptica del sustrato al inicio de la reacción por el tiempo (62) (Véase fórmula anterior).

Se usa un control sin antibiótico, repitiéndose tres veces cada experimento.

PRUEBA DE DIFUSION DE DISCO

Esta prueba pretende poner de manifiesto la capacidad inductiva de los antibióticos problema. Es un test de antagonismo antibiótico.

Utilizamos como inductores Azlocilina, Cefoxitina e Imipenem, siguiendo el método modificado de CC y WE Sanders (64).

Las bacterias se hicieron crecer en TSB para posteriormente ser inoculadas en agar Mueller Hinton a una concentración de 5.10^5 cfu/ml, usando un asa estéril y de modo homogéneo en la superficie de las placas.

Discos estériles, impregnados con antibióticos se dispusieron en las placas de Mueller Hinton con el inóculo, a una distancia de 5- a 10 mm de la zona de inhibición esperada.

Las concentraciones de antibióticos usadas en los discos fueron:

- Azlocilina: 75 ugr.
- Cefotaxima: 30 ugr.
- Ceftazidima: 30 ugr.
- Cefoxitina: 30 ugr.
- Imipenem: 10 ug
- Gentamicina: 10 ugr
- Sisomicina: 10 ugr

Las cepas que se sometieron a esta prueba fueron las números 3, 13, 22 y 25.

Se considero positiva la prueba cuando el radio de la zona truncada adyacente al disco probado se redujo en 2-4 mm.
Se considero negativa la prueba cuando esta zona estuvo ausente.
Se considero ambigua si en la zona aparecia un halo debil de inhibición menor de esos 2 mm. (27).

Los discos presentaron en las placas la siguiente distribución:

Placa 1

Central (C): Cefoxitina, Perifericos (P): Cefotaxima y Azlocilina

Placa 2

C: Cefoxitina, P: Ceftazidima, Sisomicina y Gentamicina.

Placa N.3

C: Imipenem; P: Cefotaxima y Azlocilina

Placa N.4. C:Imipenem; P:Ceftazidima, Sisomicina y Gentamicina

Placa N.5.

C:Azlocilina; P:Cefotaxima e Imipenem

Placa N.6.

C:Azlocilina, P:ceftazidima, sisomicina y Gentamicina.

Esta distribucion se repite para las cepas problema 3, 13 22 y 25.

Ademas se hizo otra distribucion de antibioticos inductores y posiblemente inducidos, que fue la siguiente:

Placa 1.a.

C(o inductor). Imipenem

P(o posiblemente inducidos):Azlocilina, ceftazidima y cefotaxima

Placa 2.b.

C:Cefoxitina

P:Azlocilina, ceftazidima y cefotaxima

Placa 3c

C:Azlocilina

P:Ceftazidima, cefotaxima e Imipenem

Placa 4d.

C:Cefoperazona

P:Azlocilina, Ceftazidima y cefotaxima

Placa 5e

C:Cefoperazona

P:Gentamicina, Sisomicina e Imipenem

Placa 6f

C:Cefoxitina

P:Cefoperazona e Imipenem

Esta distribucion se repitio para las cepas problema 3, 13 y 25.

ISOELECTROENFOQUE

Las betalactamasas de las cepas problema HU3, HU13, HU 22 y HU 25 fueron identificadas mediante tecnicas de isoelectroenfoque,

con sistema Phast(58,65). Utilizamos geles de poliacrilamida con rango de pH de 3 a 9 (PhastGel IEF 3-9), que contienen anfolitos Pharmalyte-r-.

Utilizando este sistema la muestra problema que hacemos correr en el gel de poliacrilamida debe contener al menos de 1 a 20 ng de proteína /ul.

Este método de Isoelectroenfoque contiene tres pasos:

- Paso previo al isoelectroenfoque
- Aplicación de la muestra
- Paso de isoelectroenfoque propiamente

En el paso primero se conforma el gradiente de pH por el aparato. En este primer estadio colocamos la muestra sobre el gel con un aplicador estéril en una posición media entre cátodo y ánodo sabiendo que dependiendo de su punto de pH emigrarán las proteínas en un sentido o en otro.

En el paso segundo se empiezan a hacer correr las muestras en el gel a 15 Vh. Pero en primera instancia utilizamos voltajes pequeños(200 V), al objeto de evitar bandas erróneas causadas por contaminantes o proteínas pobremente solubles.

En el paso tercero las proteínas emigran a sus puntos isoeléctricos correspondientes. En este paso una alarma preprogramada al inicio del método sonará indicándonos el final del isoelectroenfoque, tal como se programó, pero se mantendrá el campo eléctrico que evita el "fenómeno de zona" -la difusión de proteínas en el gel con la pérdida consiguiente de sus p.I reales al detenerse la corriente eléctrica-.

PASOS OPTIMIZADOS DEL METODO PARA IEF 3-9.PROGRAMACION

Muestra aplicada-aplicación- , 1.2. 0Vh
 Muestra aplicada -por encima- , 1.3. 0Vh
 Alarma Extra para sonar a , 1.1. 73 Vh

Sep 1.1.	2000 V	2,5 mA	3,5 W	15 grados C.	75 Vh
Sep 1.2.	200 V	2,5 mA	3,5 W	15 grados C.	15 Vh
Sep 1.3.	2000 V	2,5 mA	3.5 W	15 grados C.	410 Vh

Este proceso toma aproximadamente 500 Vh o unos treinta minutos. El paso previo al Isoelectroenfoco tarda unos diez minutos.

VISUALIZACION DE LAS BANDAS DE BETALACTAMASAS

Utilizamos como revelador una solución de nitrocefín a una concentración de 1 mM(27).

INDUCCION DE BETALACTAMASA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS(PLASMA)

Utilizamos para esta experiencia las cepas HU3, HU13 y HU 25. Los antibióticos fueron Azlocilina e Imipenem.

El plasma fue suministrado por el Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen Macarena.

Las células bacterianas se hicieron crecer en caldo TSB, para ser inoculadas posteriormente en plasma estéril primero, para determinar la producción basal de betalactamasas y con concentraciones subinhibitorias para conocer el comportamiento de las cepas en este fluido biológico. El plasma fue inicialmente inactivado mediante calentamiento a 56 grados Centígrados durante 1 hora.

Se hicieron crecer las muestras a 37 grados durante 18 horas para a continuación ser sometidas a centrifugación y sonicación tal como se ha descrito previamente en el apartado Inducción de la Producción de Betalactamasa.

De igual modo se someten a las muestras problemas a un estudio espectrofotométrico, previa interacción con la sustancia reveladora nitrocefín.

El experimento se realizo con un control sin antibiotico y repitiendose tres veces tal como se ha descrito previamente en el apartado Induccion de la Produccion de Betalactamasa.

De igual modo se someten a las muestras problemas a un estudio espectrofotometrico, previa interaccion con la sustancia reveladora nitrocefin.

El experimento se realizo con un control sin antibiotico y repitiendose tres veces.

ESPECTRO DE SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE P.AERUGINOSA

Se utilizó el método de disco placa(66,67) para el estudio del espectro de sensibilidades de las cepas problema. Se probaron los siguientes antibioticos:

- AZTREONAM
- AMIKACINA
- CARBENICILINA
- CEFOTAXIMA
- CEFTAZIDIMA
- CEFTIZOXIME
- CEFTRIAXONA
- NETILMICINA
- PIPERACILINA
- TICARCILINA
- TICARCILINA/A.CLAVULANICO
- TOBRAMICINA

Se midio mediante regla la zona de inhibición resultante en mm.

ANALISIS ESTADISTICO

El coeficiente de Pearson se uso para comparar la produccion de betalactamasa con y sin induccion por antibiotico.



RESULTADOS

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE BETALACTAMASA, ACTIVIDAD DE
BETALACTAMASA , SENSIBILIDAD Y ESPECTRO DE SENSIBILIDAD.

PRODUCCION DE BETALACTAMASA

El estudio de la actividad enzimatica de las 33 cepas de *P.aeruginosa* puso de manifiesto la existencia de 6 cepas capaces de producir espontáneamente betalactamasa.

Estas cepas fueron denominadas según el ordinal correspondiente a su estudio y fueron las cepas sobre las que se centraron las pruebas ulteriores.

Diferenciamos cepas hiperproductoras de betalactamasa y cepas con bajo nivel de produccion de betalactamasa dependiendo de si el reactivo nitrocefin cambiaba de color en menos de cinco minutos.

En este sentido cuatro cepas eran hiperproductoras de betalactamasas:

Cepas 3, 13, 22 y 25

Eran cepas con bajo nivel de produccion de betalactamasas:

Cepas 6 y 7

El estudio de producción espontánea de betalactamasa en todas las demas cepas fue negativo, por lo que centramos específicamente el trabajo en las cuatro cepas que consideramos son hiperproductoras de betalactamasas.

La tabla número 1 recoge los resultados de producción espontánea de betalactamasa y la actividad de betalactamasa de las cepas hiperproductoras en segundos(Spot-test).

tabla N.1. PRODUCCION DE BETALACTAMASA Y SPOT-TEST

CEPA	1	betalactamasa	negativa	
CEPA	2	betalactamasa	negativa	
CEPA	3	betalactamasa	+++	7 segundos
CEPA	4	betalactamasa	negativa	
CEPA	5	betalactamasa	negativa	
CEPA	6	betalactamasa	+	
CEPA	7	betalactamasa	+	
CEPA	8	betalactamasa	negativa	
CEPA	9	betalactamasa	negativa	
CEPA	10	betalactamasa	negativa	
CEPA	11	betalactamasa	negativa	
CEPA	12	betalactamasa	negativa	
CEPA	13	betalactamasa	+++	5 segundos
CEPA	14	betalactamasa	negativa	
CEPA	15	betalactamasa	negativa	
CEPA	16	betalactamasa	negativa	
CEPA	17	betalactamasa	negativa	
CEPA	18	betalactamasa	negativa	
CEPA	19	betalactamasa	negativa	
CEPA	20	betalactamasa	negativa	
CEPA	21	betalactamasa	negativa	
CEPA	22	betalactamasa	+++	1 segundo
CEPA	23	betalactamasa	negativa	
CEPA	24	betalactamasa	negativa	
CEPA	25	betalactamasa	+++	2 segundos
CEPA	26	betalactamasa	negativa	
CEPA	27	betalactamasa	negativa	
CEPA	28	betalactamasa	negativa	
CEPA	29	betalactamasa	negativa	
CEPA	30	betalactamasa	negativa	
CEPA	31	betalactamasa	negativa	
CEPA	32	betalactamasa	negativa	
CEPA	33	betalactamasa	negativa	

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS

AZLOCILINA

Azlocilina mostró una actividad intermedia frente a las 33 cepas. El 67% de las cepas de *P.aeruginosa* estudiadas se inhibieron a una concentración de 4 ug/ml, pero la CMI 90 estaba situada en una concentración notablemente mas alta: 256 ugr/ml. (Confer Tabla n.2)

Con relacion a las cepas que producian betalactamasa, las hiperproductoras 3, 13, 22 y 25 mostraron una CMI igual o mayor de 256, mientras que las que producian betalactamasa de modo débil ,cepas 6 y 7 presentaron sensibilidades de 128 y 64 respectivamente. (Vease Tabla N.3)

CEFOPERAZONA

Cefoperazona mostro una actividad similar al antibiotico anteriormente descrito, azlocilina. El 64% de las cepas de *P.aeruginosa* estudiadas se inhibieron a una concentración de 4 ugr/ml, pero la CMI90 estaba situada en 128 ugr/ml.(Tabla n.2)

Las cepas productoras de beta-lactamasa mostraron una sensibilidad irregular frente a cefoperazona: las cepas hiperproductoras presentaron concentraciones de inhibicion desde 32 ugr/ml a 256 ugr/ml. Las débilmente productoras de 32 y 128 ugr/ml.(Tabla n.3.)

CEFOTAXIMA

La mayor parte de las cepas se inhibieron con concentraciones de cefotaxima que oscilaron entre 16 y 32 ugrs/ml. La CMI90 de estas bacterias se situo en 32 ugrs/ml.(Tabla N.2)

Las cepas productoras de betalactamasas presentaron una sensibilidad irregular frente a cefotaxima que oscilaba desde 4 ugr/ml para la cepa HU6 hasta mayor de 256 para la cepa HU22. (Tabla N.3)

CEFTAZIDIMA

Fue un antibiotico muy activo frente a las cepas de *Ps.aeruginosa* estudiadas. Su CMI 50 esta situada entre 2 y 4 ugr/ml, siendo su CMI90 de 4 ugr/ml. El 100% de las cepas se inhibieron a una concentracion de 16 ugr/ml.

Las cepas productoras de betalactamasas tuvieron una sensibilidad que oscilo entre 0,5 ugr/ml (cepas HU6,13) hasta 16 ug/ml (cepa HU22).

IMIPENEM

Tienamicina inhibe el 100% de las cepas de *P.aeruginosa* con 8 ugr/ml. Su CMI 50 esta situada entre 1 y 2 ugr/ml.

La actividad sobre las cepas productoras de betalactamasa fue buena : todas las cepas se inhibieron con 2 ugr/ml.

MOXALACTAM

Moxalactam tuvo una actividad parecida a Cefotaxima. El 90% de las cepas estudiadas se inhibieron a una concentracion de 32 ugr/ml de moxalactam.

La actividad de este antibiotico en las cepas productoras de betalactamasa sigue un patron parecido también al de la cefotaxima. La cepa mas sensible en este caso fue la HU13 y la mas resistente la HU7 con 256 ugr/ml de CMI.

Tabla n.2

ACTIVIDADES DE OCHO ANTIBIOTICOS ESTUDIADOS FRETE 33
 AISLAMIENTOS CLINICOS DE P.AERUGINOSA,

ANTIBIOTICO	% DE CEPAS INHIBIDAS (CMI)ugr/ml								
	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Azlocilina	-	-	67	67	76	76	82	88	91
Cefoperazona	-	-	64	64	70	79	79	97	100
Cefotaxima	-	-	24	24	79	91	94	97	97
Ceftazidima	21	84	94	97	100				
Imipenem	9	67	94	100					
Moxalactam	-	-	21	21	76	91	94	94	100
Gentamicina	-	6	33	64	76	79			
Sisomicina	3	33	55	67	70	73			

TABLA n.3
 CMI DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA (ugr/ml)

CEPAS	AZ	CPZ	CTX	CZD	MOX	THI	GN	SS
HU 3	/256	256	16	2	16	2	/32	/32
HU 6	128	32	4	0,5	4	2	/32	/32
HU 7	64	128	64	8	256	1	8	4
HU 13	256	32	4	0,5	4	2	/32	/32
HU 22	/256	128	/256	16	64	8	/32	/32
HU 25	/256	32	32	1	32	0,5	/32	/32

GENTAMICINA

Este aminoglicosido mostro una actividad escasa frente a las cepas de *P.aeruginosa* estudiadas. La CMI 50 estaba situada entre 4-8 ugr/ml, pero la CMI90 no se alcanza a la mayor de las concentraciones utilizadas.

En cuanto a las cepas productoras de betalactamasa todas mantuvieron CMI por encima de las concentraciones usadas.

SISOMICINA

Tiene un espectro de actividad similar a la gentamicina. La CMI50 se alcanza con CMI de 4ugr/ml, pero la CMI90 no se alcanza ni con la mayor de las concnetraciones utilizadas:32 ugr/ml.

Las cepas productoras de betalactamasa tuvieron CMI por encima de las concentraciones maximas de sisomicina.

ESPECTRO DE SENSIBILIDAD

Aparece recogido en la tabla n.4.

TABLA n.4.ESPECTRO DE SENSIBILIDADES DE CEPAS DE P.AERUGINOSA
DIAMETRO DE ZONA

CEPA	CB	TIC	TIM	PIP	CTX	ZOX	CAZ	CRO	ATM	AN	NN	NET
HU3	06 ---	06 --	06 --	06 --	19	13	25	06 --	25	18	06 --	06 --
	22	22	24	26				19			20	16
HU13	06	06	14*	12*	21*	17*	28	21*	26	22	11	06
HU22	15	13	10	16	06	06	12	06	15	19	20	16
HU25	06	06	13*	06 -- 14	22*	15*	29*	19*	27	21	11	06

--: Indica zonas de crecimiento nuevo o doble.(Existen, por tanto dos diámetros de inhibición)

* : Indica colonias dispersas dentro de la zona

Usamos las siguientes abreviaturas:

ATM:aztreonam

CAZ:ceftazidima

TIM:Ticarcilina/a.

AN :amicacina

CRO:ceftriaxona

clavulánico.

CB:carbenicilina

NET :netilmicina

NN:tobramicina.

CTX:Cefotaxima

PIP :piperacilina

ZOX:Ceftizoxima

TIC:ticarcilina

CUANTIFICACION DE LA PRODUCCION DE BETALACATAMASA EN CEPAS DE P.AERUGINOSA.

Cuatro cepas fueron elegidas para los estudios de induccion de produccion de betalactamasas. Se seleccionaron por su capacidad para producir una gran cantidad de enzima que podia ser facil y rapidamente detectada por el metodo de la cefalosporina cromogenica o nitrocefina. Fueron las cepas denominadas: HU3, HU13, HU22 y HU 25.

Los resultados de la produccion de betalactamasa basal se muestran a continuacion en la tabla n.5. Esta produccion fue similar en las cuatro cepas estudiadas presentando un rango entre 0,05 y 0,08 ug de nitrocefina hidrolizada/min/ml de enzima. La cepa que presento una mayor produccion de betalactamasa fue la HU22 y la que menos la cepa HU3.

TABLA n.5.
Produccion de betalactamasa de cuatro cepas de P.aeruginosa

cepa	Produccion de enzima(umol Nitrocefina hidrolizada/min/ml de enzima)
HU3	0,05
HU13	0,06
HU22	0,08
HU25	0,07

ESTUDIO DE LOS VALORES DE PUNTO ISOELECTRICO DE LAS BETALACTAMASAS PRODUCIDAS POR LAS CUATRO CEPAS DE P.AERUGINOSA.

La tabla N.4 muestra el punto isoelectrico de las betalactamasas producidas por las cepas de P.aeruginosa.

Tres de las cepas, HU3, HU22 y HU25 tienen betalactamasas con una banda principal de pI aproximado de 7,7. En las cepas HU3 y HU 22 la banda de pI 7,7 tiene asociada una fuerte banda accesoria de pH aproximado de 7,13 y algunas bandas accesorias débiles entre 7,5 a 7,8.

Ademas de esta banda supuestamente cromosomica (pI 7,7), la cepa HU3 tambien produce una betalactamasa TEM-2 (pI 5,6) y la cepa HU25 produce una betalactamasa TEM-1(p.I 5,4). La cepa HU13 difiere de las cepas HU 3,22 y 25 en que tiene una betalactamasa de pI 7,85 y también produce una betalactamasa TEM-1.

TABLA n.6.VALORES DE PI DE BETALACTAMASAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE P.AERUGINOSA

CEPA	VALORES DE PI		
HU 3	5.6(TEM-2)	7.13	7.7
HU13	5.4(TEM-1)		7.85
HU22		7.13	7.7.
HU25	5.4(TEM-1)		7.7.

Véase figura n.1

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE BETALACTAMASA DE CUATRO CEPAS DE P.AERUGINOSA TRAS INDUCCION CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE OCHO AGENTES ANTIMICROBIANOS. (Tabla n.7)

AZLOCILINA

La producción de betalactamasa se incremento en todas las cepas con un rango que variaba entre 5 y 10 veces mas. La cepa que mostró una producción de betalactamasa mas importante fue la cepa HU25 con una concentración de enzima de 0.7 ug N/ml/min , pero hay que tener presente que su producción basal enzimática era algo mayor que la de la cepa HU13 que también proporcionalmente presenta una producción inducida de enzima 10 veces mayor que la basal.

Por su parte la cepa HU22 fue la que mostro una producción inducida de betalactamasa menor, aunque fue cinco veces superior a su producción basal: 0,4 ugr/N/min/ml.

En conjunto la azlocilina en relacion a las cepas estudiadas es un inductor fuerte de la producción enzimática de betalactamasa, siendo esta variación estadísticamente significativa (Coeficiente de Pearson).

Consideramos un inductor como fuerte cuando la diferencia entre la producción basal de betalactamasa y la inducida es al menos diez veces superior.

CEFOPERAZONA

La producción enzimática inducida de betalactamasa con relacion a cefoperazona es menor que con azlocilina.

La cantidad de enzima producida varia entre 0.02 a 0.06-cepas HU3 y 25 y 13, respectivamente). Existe pues una diferencia de comportamiento con relacion a cefoperazona en el estudio inductivo. HU 3 y HU25 muestran un patron similar con un incremento en la producción de x4 y x3 , que es estadísticamente significativo; sin embargo HU13 y HU22 producen con este antibiotico una cantidad de enzima muy parecida a la que produce basalmente.

CEFOTAXIMA

La producción enzimática con cefotaxima es muy similar a la obtenida en condiciones basales con las cepas. Presenta un rango entre 0.1 la que más (HU 25) y 0,07 la que menos (HU22), que como puede observarse en la tabla n.5 con respecto a su producción basal es incluso 0.01 punto menor.

En conjunto el estudio usando cefotaxima como inductor no muestra una variación estadísticamente significativa.

CEFTAZIDIMA

El estudio con ceftazidima muestra un patrón muy similar al expresado con cefotaxima. La producción inducida de betalactamasa presenta un rango muy similar a la producción basal de enzima por las cepas (0.06 a 0.1) que no es estadísticamente significativa tampoco.

En conjunto, por tanto la producción de enzima inducido con concentraciones subinhibitorias es similar a la basal.

IMIPENEM

Imipenem mostro una producción enzimática con un rango entre x5 y x15 veces la producción basal.

Las cepas HU13 y HU25 mostraron una producción enzimática inducida notablemente superior a la de las otras dos cepas, que también aumento, aunque en la cepa HU22 fue de menor cuantía-tan solo x5).

La producción enzimática con Imipenem oscilo entre 0.92 para HU 13 a 0.4 para HU22. El estudio estadístico evidentemente mostro una gran diferencia significativa.

De todos los antibióticos utilizados la mayor diferencia entre producción basal e inducida correspondio a Imipenem.

MOXALACTAM

Moxalactam muestra una producción enzimática muy similar entre todas las cepas, alrededor de 0.1 ug N/min/ml enzima. Presenta un patrón parecido a cefotaxima y ceftazidima, o sea, con relación a la producción basal de las cepas no existe una diferencia estadísticamente significativa, siendo su producción muy similar a la basal.

GENTAMICINA

La producción enzimática inducida fue muy similar a la existente de modo basal. La cantidad de enzima varió entre 1.00 y 0.07—cepas HU25 y HU3, siguiendo un patrón muy similar al establecido en condiciones basales, en que esas mismas cepas fueron las que tuvieron la mayor y menor producción basal de enzima.

El estudio estadístico no mostró variación significativa alguna, como era previsible.

SISOMICINA

Mostró un patrón inductivo muy similar al de su compañero estructural, gentamicina. Presentó unos niveles de producción enzimática entre 0.1 y 0.05. A pesar de que la producción enzimática de la cepa HU13 en condiciones de inducción es casi el doble que en condiciones basales las otras cepas mostraron un patrón muy parecido al de la producción basal y el estudio estadístico no mostró diferencias significativas.

TABLA n.7.PRODUCCION DE BETALACTAMASA POR CUATRO CEPAS DE P.AERUGINOSA TRAS INDUCCION CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE 8 AGENTES ANTIMICROBIANOS.

CEPA		AZ	CFP	CFT	CFZ	MOX	THI
HU 3	I	0.3	0.2	0.08	0.06	0.07	0.35
B:0,05							
HU13	I	0.6	0.06	0.09	0.08	0.1	0.92
B:0,06							
HU22		0.4	0.1	0.07	0.1	0.1	0.4
B:0,08							
HU25		0.7	0.2	0.1	0.1	0.1	0.80
B:0,07							
		GN	SS				
HU3		0.07	0.05				
B:0,05							
HU13		0.06	0.1				
B:0,06							
HU22		0.1	0.05				
B:0,08							
HU25		0.09	0.08				
B:0,07							

B:Producción basal de betalactamasa
I:Producción inducida de betalactamasa

PRUEBA DE DIFUSION DE DISCO

Cepa HU3

Inducción con Cefoxitina, Imipenem y Azlocilina.

Placa n.1 y 2. Figura n.2.

(Cefoxitina/Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina)

Utilizamos como inductor Cefoxitina.

Consideramos como positiva la induccion, al verificarse una inhibicion o corte del halo de inhibición de los antibioticos expuestos al inductor mencionado.

Por tanto es positiva la inducción en el caso de Cefotaxima, Azlocilina, en la primera placa y de Ceftazidima en la segunda. No asi de Sisomicina ni de Gentamicina.

Placas 3 y 4. Figura n.3.

(Imipenem/Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina)

Utilizamos como inductor Imipenem.

Se produce una zona de corte suave, que consideramos positivo débil en el caso de la Azlocilina. La induccion es negativa para cefotaxima, ceftazidima, sisomicina y gentamicina.

Placas 5 y 6. Figura n.4

(Azlocilina /Cefotaxima, Imipenem, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Azlocilina.

No se produce induccion detectable en ninguno de los antibioticos estudiados : cefotaxima, imipenem, ceftazidima, sisomicina o gentamicina.

Cepa HU13

Induccion con Cefoxitina, Imipenem y Azlocilina.

Placas 1 y 2. Figura n.5

(Cefoxitina/Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Cefoxitina.

Se produce induccion detectable en el caso de cefotaxima y de ceftazidima y no es observada en el caso de azlocilina, sisomicina y gentamicina.

Placas 3 y 4. Figura n.6

(Imipenem/ Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina)

Utilizamos como inductor Imipenem.

En el caso de esta cepa no se produce induccion detectable para cefotaxima, azlocilina, sisomicina o gentamicina; si para ceftazidima.

Placas 5 y 6. Figura n.7.

(Azlocilina / Cefotaxima, Imipenem, Ceftazidima ,Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Azlocilina.

Solo en el caso de cefotaxima , es posible comprobar el fenomeno inductivo. Tanto en el caso de imipenem, como en el de gentamicina o sisomicina no se produce.

Cepa HU 22.

Induccion con Cefoxitina, Imipenem y Azlocilina).

Placas 1 y 2. Figura n.8.

(Cefoxitina/ Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Cefoxitina.

No se produce induccion con ninguno de los antibioticos probados:

Azlocilina, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina o sisomicina.

Placas 3 y 4. Figura n.9.

(Imipenem/ Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Imipenem.

No se produce induccion detectable con ninguno de los antibioticos probados: cefotaxima, azlocilina, ceftazidima, gentamicina o sisomicina.

Placas 5 y 6. Figura n.10.

(Azlocilina / Imipenem, Cefotaxima, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Azlocilina.

En este caso tampoco pudimos demostrar induccion con ninguno de los anttbioticos que se usaron: imipenem, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina y sisomicina.

Cepa HU25

Inducción con Cefoxitina, Imipenem y Azlocilina.



Placas 1 y 2 . Figura n.11.

(Cefoxitina / Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Cefoxitina.

Existe una positividad en la induccion para cefotaxima y ceftazidima. Tanto azlocilina, que se muestra resistente, como gentamicina y sisomicina no producen resultados positivos.

Placas 3 y 4. Figuras 11 , 12.

(Imipenem / Cefotaxima, Azlocilina, Ceftazidima ,Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor a Imipenem.

Solo ceftazidima presenta un corte en la inhibicion y es por tanto considerado positivo. Todos los demas antibioticos probados son negativos: cefotaxima, azlocilina, gentamicina y sisomicina.

Placas 5 y 6. Figura n.12.

(Azlocilina / Imipenem, Cefotaxima, Ceftazidima, Gentamicina y Sisomicina).

Utilizamos como inductor Azlocilina.

Solamente podemos establecer que se produce induccion en el caso de cefotaxima. En todos los demas antibioticos no se produce induccion: imipenem, ceftazidima, gentamicina o sisomicina.

Cepa HU3

Inducción con Imipenem ,Cefoxitina, Azlocilina y Cefoperazona.

Placas a1 y b2.

Utilizamos como inductor Imipenem en la 1 y cefoxitina en la 2.

(Imipenem/ Azlocilina,Ceftazidima,Cefotaxima) (Cefoxitina/
Azlocilina, Ceftazidima,Cefotaxima).

Figura n.13.

Imipenem solo produce induccion en azlocilina; ceftazidima y cefotaxima dan resultados negativos.

Cefoxitina induce a los tres antibioticos probados: azlocilina, ceftazidima y cefotaxima.

Placas 3c y 4d.

Utilizamos como inductores a azlocilina en la placa 3 y a cefoperazona en la placa 4.

(Azlocilina/ Ceftazidima, Cefotaxima, Imipenem) (Cefoperazona/ Azlocilina, Ceftazidima y Cefotaxima)

Figura n.14.

Ni azlocilina ni cefoperazona consideramos producen resultado positivo inductivo en los antibioticos probados: ceftazidima, cefotaxima e imipenem uno y azlocilina, ceftazidima y cefotaxima , el otro.

Placas 5e y 6f.

Utilizamos como inductores a cefoperazona en la placa 5 y a cefoxitina en la placa 6.

(Cefoperazona/ Gentamicina, Sisomicina e Imipenem) (Cefoxitina/ Cefoperazona, Imipenem).

Figura n.15.

Cefoperazona no produce induccion ni en gentamicina, sisomicina o imipenem.

Cefoxitina, por su parte, si que la produce en cefoperazona, pero no en imipenem.

Cepa HU13

Inducción con Imipenem, Cefoxitina, Azlocilina y Cefoperazona.

Placas a1 y b2.

Utilizamos como inductor Imipenem en la 1 y cefoxitina en la 2.

(Imipenem/ Azlocilina, Ceftazidima, Cefotaxima) (Cefoxitina/ Azlocilina, Ceftazidima , Cefotaxima).

Figura n.16.

Imipenem produce induccion en ceftazidima unicamente, siendo negativa la prueba para azlocilina y cefotaxima, mientras que cefoxitina produce induccion e ceftazidima y cefotaxima. Es negativa la prueba para azlocilina.

Placas 3c y 4d.

Utilizamos como inductor azlocilina para la placa 3 y cefoperazona para la placa 4.

(Azlocilina/Ceftazidima, Cefotaxima, Imipenem) (Cefoperazona/Azlocilina, Ceftazidima, Cefotaxima).

Figura n.17.

Solo es capaz de inducir azlocilina con relacion a cefotaxima. Cefoperazona no induce en ninguno de los antibioticos prrobados.

Placas 5e y 6f.

Utilizamos como inductores cefoperazona en la placa 5 y cefoxitina en la 6.

(Cefoperazona/Gentamicina, Sisomicina e Imipenem) (Cefoxitina/Cefoperazona, Imipenem).

Figura n. 18.

No hay induccion en ninguno de los antibioticos probados.

Cepa HU25.

Inducción con Imipenem, Cefoxitina, Azlocilina y Cefoperazona.

Placas 1a y 2b.

Utilizamos como inductores imipenem en la placa 1 y cefoxitina en la 2.

(Imipenem/Azlocilina, Ceftazidima y Cefotaxima) (Cefoxitina/Azlocilina, Ceftazidima y Cefotaxima)

Figura n.19.

Imipenem produce induccion en ceftazidima, pero no en azlocilina o cefotaxima.

Cefoxitina, por su parte es capaz de inducir en el caso de ceftazidima y cefotaxima. Azlocilina es resistente.

Placas 3c y 4d.

Utilizamos como inductor azlocilina en la placa 3 y cefoperazona en la placa 4.

(Azlocilina/Ceftazidima, Cefotaxima e Imipenem)
(Cefoperazona/Azlocilina, Ceftazidima, Cefotaxima).

Figura n.20.

Azlocilina produce induccion en el caso de cefotaxima y no en el caso de ceftazidima o imipenem; mientras que cefoperazona no produce induccion visible en ninguno de los antibioticos probados.

Placas 5e y 6f.

Utilizamos como inductor cefoperazona y cefoxitina, en las placas 5 y 6 respectivamente.

(Cefoperazona/Gentamicina, Sisomicina e Imipenem) (Cefoxitina/Cefoperazona e Imipenem).

Figura n.21.

Ninguno de los dos antibioticos son capaces de provocar induccion en los antimicrobianos usados: gentamicina, sisomicina e imipenem por un lado y cefoperazona e imipenem, por otro.

INDUCCION DE BETALACTAMASAS EN FLUIDOS CORPORALES (PLASMA)

Se estudiaron dos antibioticos: azlocilina e imipenem, por ser los que habian mostrado capacidad inductiva previa. Se utilizaron los cultivos de HU3, HU13, HU 22 y HU 25.

HU3

Se comprobó como en plasma la produccion de betalactamasa aumentaba con respecto a la produccion basal, pero este resultado tanto con azlocilina, como con imipenem no era superior al encontrado induciendo sin plasma. Las concentraciones encontradas fueron de 0.20 y 0.28 para azlocilina e imipenem respectivamente.

HU13

La producción de betalactamasa con esta cepa en fluidos corporales, bajo condiciones de concentraciones subinhibitorias de antibioticos fueron similares a las que se producian con fluidos no corporales, pero es de destacar una producción algo menor que la encontrada en ellos: 0.75 y 0.8 . Esta diferencia no mostró un caracter significativo.

HU22

La cepa HU22 mostro un comportamiento similar con fluidos corporales e incluso podemos decir que se registro una menor actividad enzimatica 0.36 y 0.2 fueron la producción enzimatica con azlocilina e imipenem.

HU25

La producción enzimatica en HU25 fue superior a la encontrada en condiciones basales, pero no lo fue con respecto a fluidos no corporales. 0.5 y 0.5 fueron los resultados encontrados en las experiencias realizadas. (Vease tabla n.8)

Tabla n.8. PRODUCCION DE BETALACTAMASA BAJO CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS EN PLASMA HUMANO.

		AZLOCILINA	IMIPENEM
HU3	IP	0.20	0.28
B: 0,05			
	I	0,3	0,35
HU13	IP	0.75	0.8
B: 0,06			
	I	0,6	0,92
HU22	IP	0.36	0.2
B: 0,08			
	I	0,4	0,4
HU25	IP	0.5	0.5
B: 0,07			
	I	0,7	0,8

B: Producción basal de betalactamasa

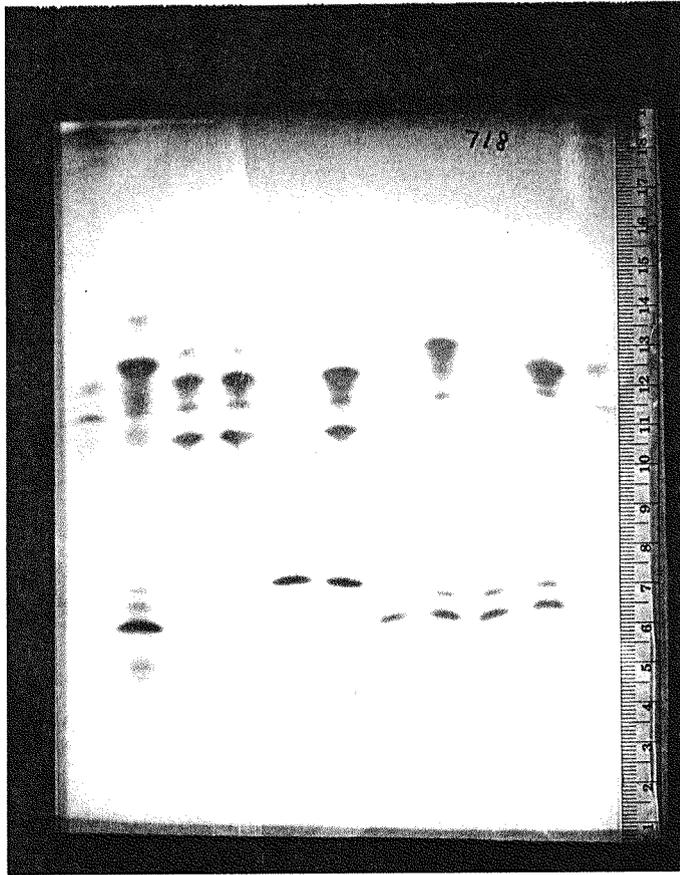
I: Producción inducida en fluidos no biológicos de betalactamasa

IP: Producción inducida en fluidos biológicos (plasma) de betalactamasa.

FIGURA 1. PATRON DE P. ISOELECTRICO DE EXTRACTOS DE CUATRO CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

- 1 Y 11. MIOGLOBINA Y CITOCROMO C
2. E. COLI 1368 pBW101
3. P. AERUGINOSA HU 22
4. P. AERUGINOSA HU 22 , TRATADA CON CEFOXITINA (25 ugr/ml)
5. P. AERUGINOSA HU 3
6. P. AERUGINOSA HU 3 , TRATADA CON CEFOXITINA (25 ugr/ml)
7. P. AERUGINOSA HU 13
8. P. AERUGINOSA HU 13, TRATADA CON CEFOXITINA (25 ugr/ml)
9. P. AERUGINOSA HU 25
10. P. AERUGINOSA HU 25, TRATADA CON CEFOXITINA (25 ugr/ml).

FIGURAS



- 10,0

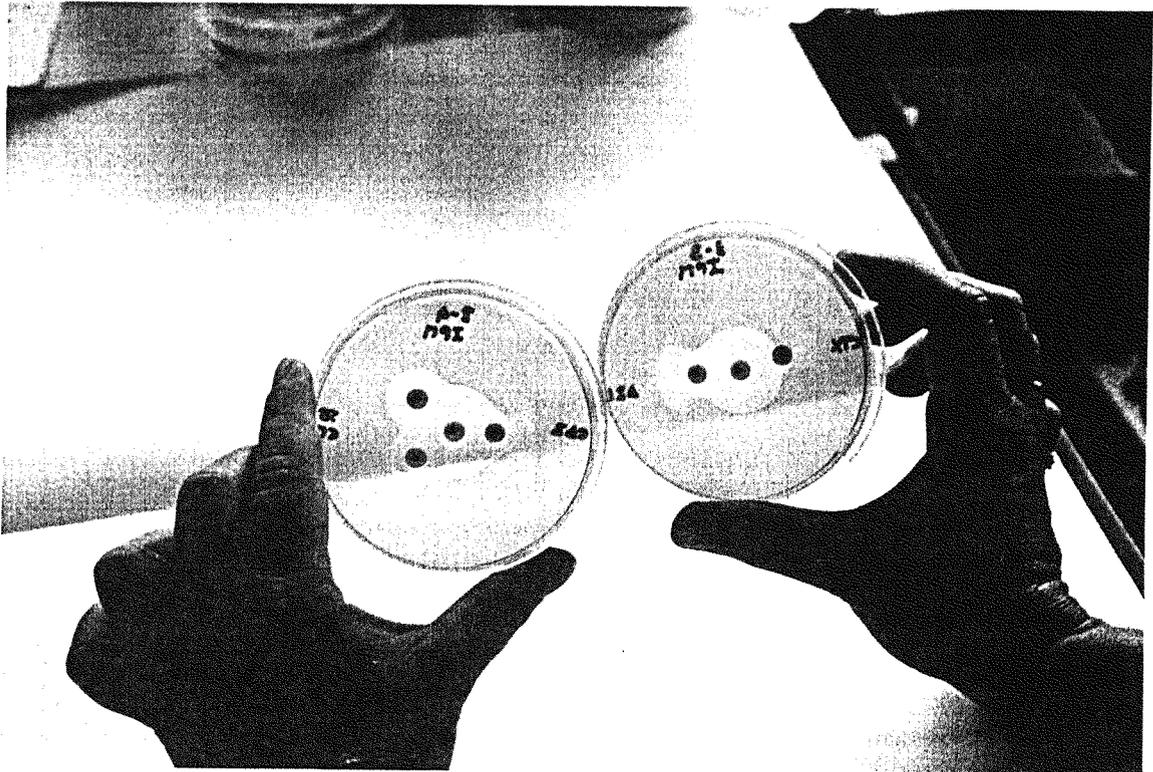
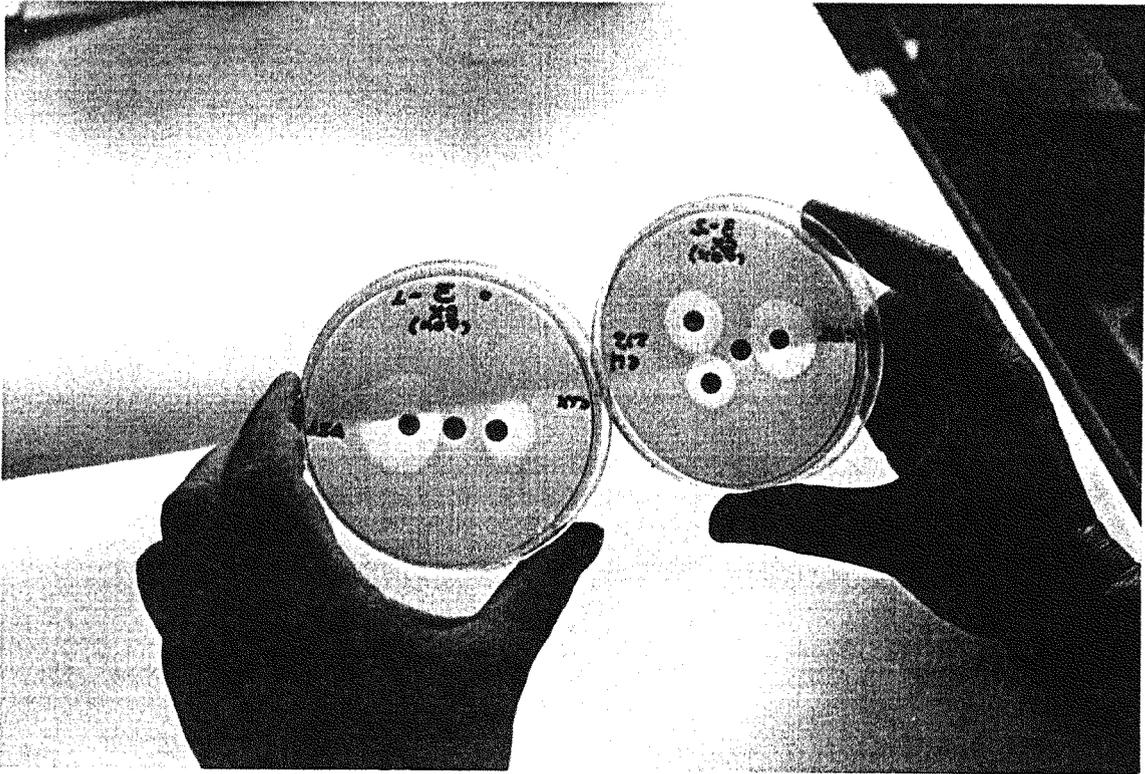
- 8,0

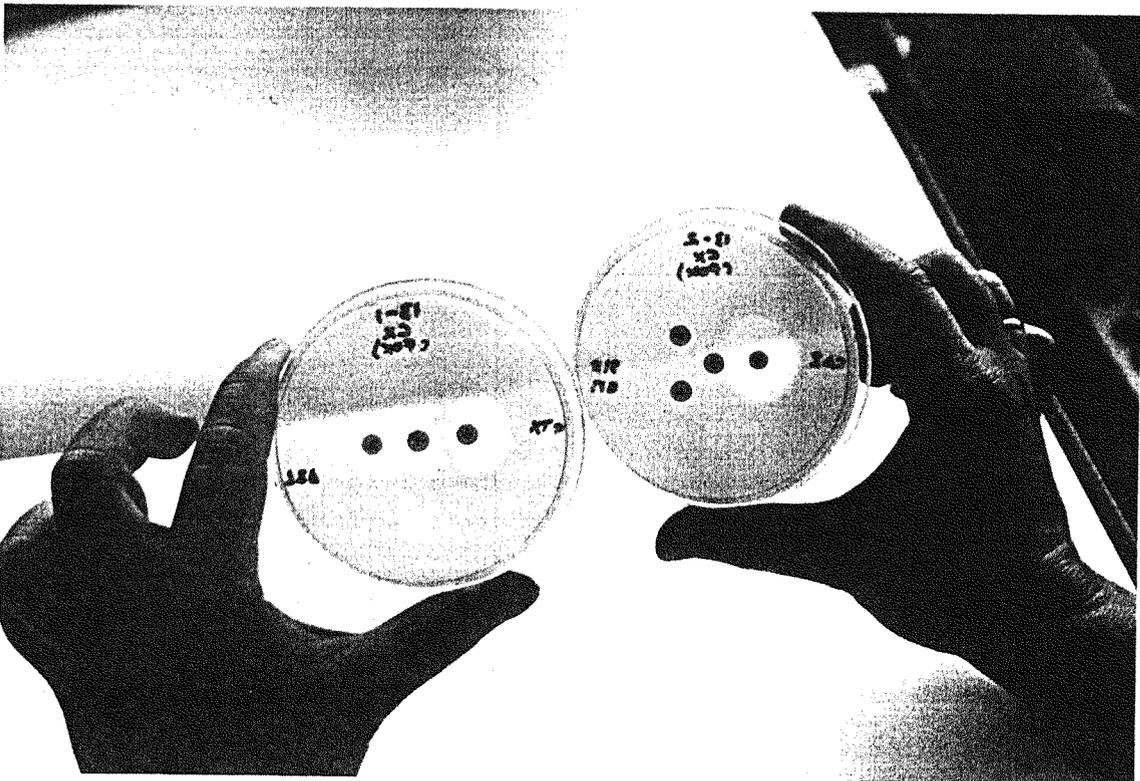
- 7,4

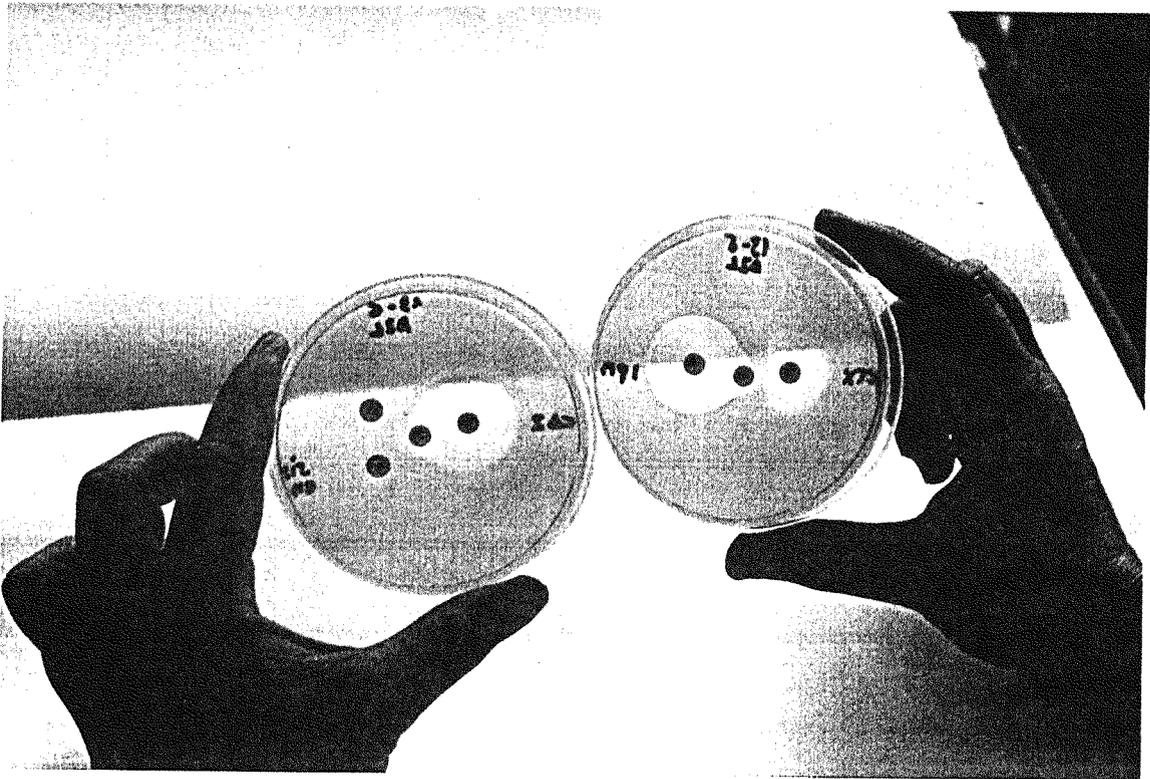
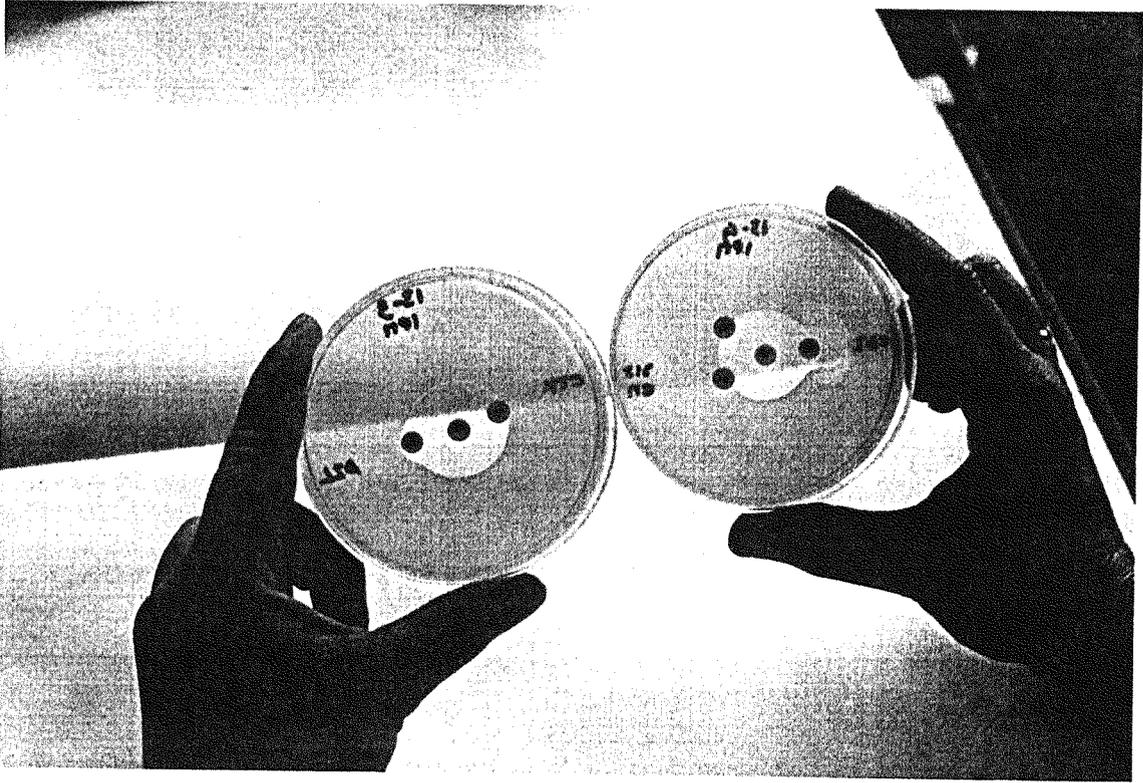
- 5,6

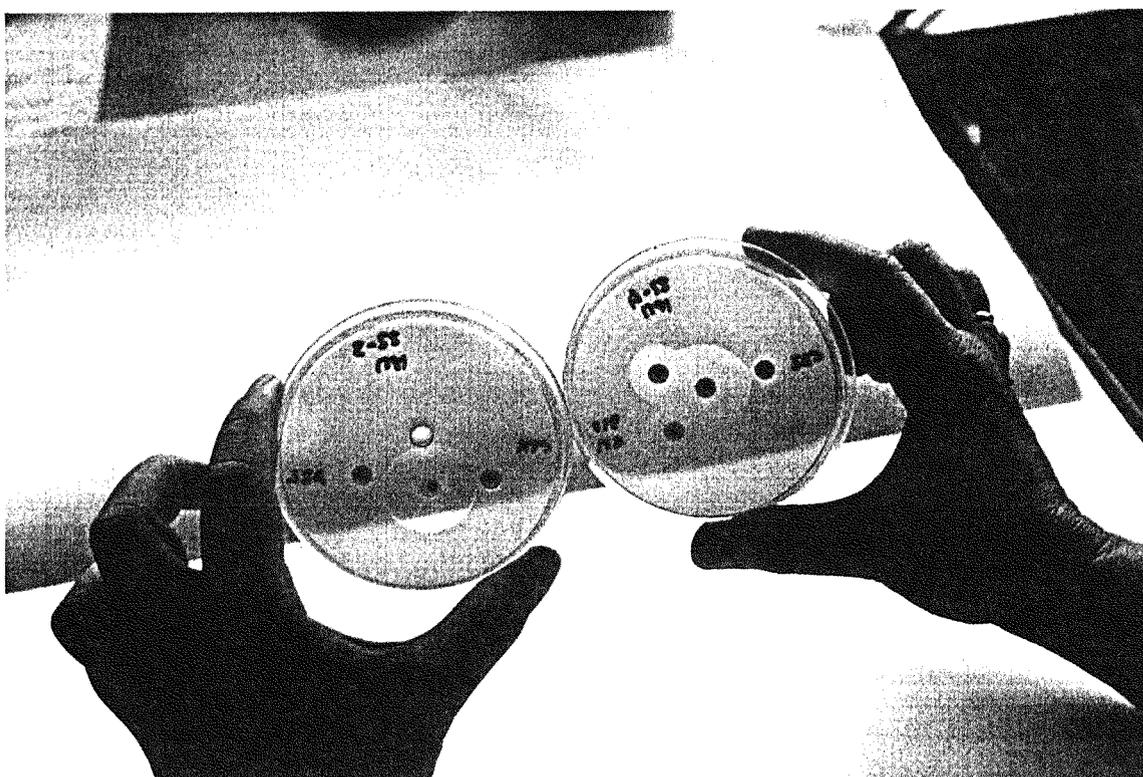
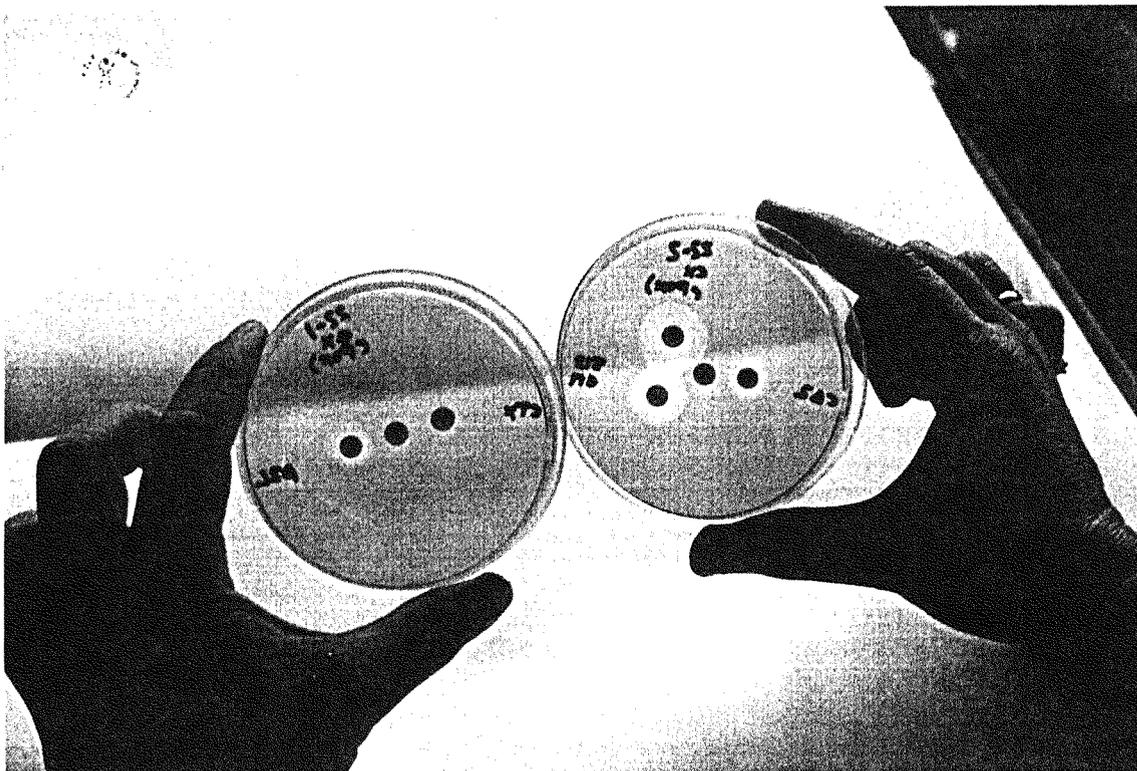
- 5,4

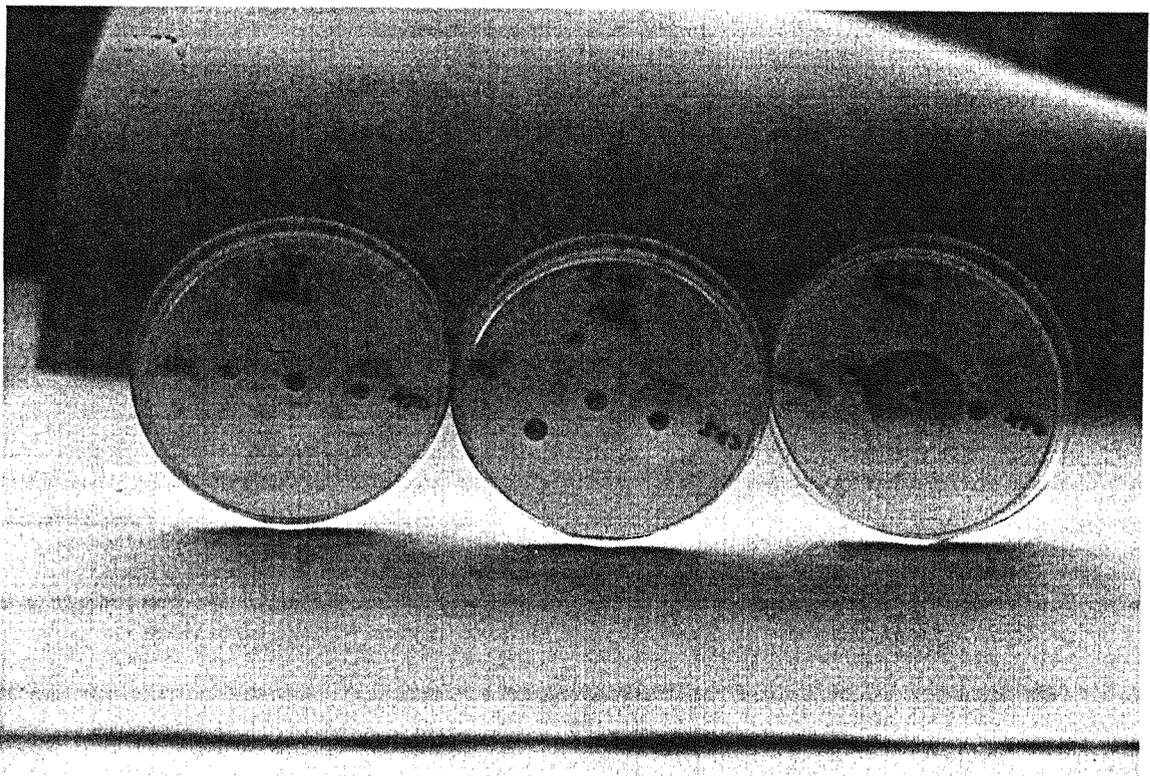
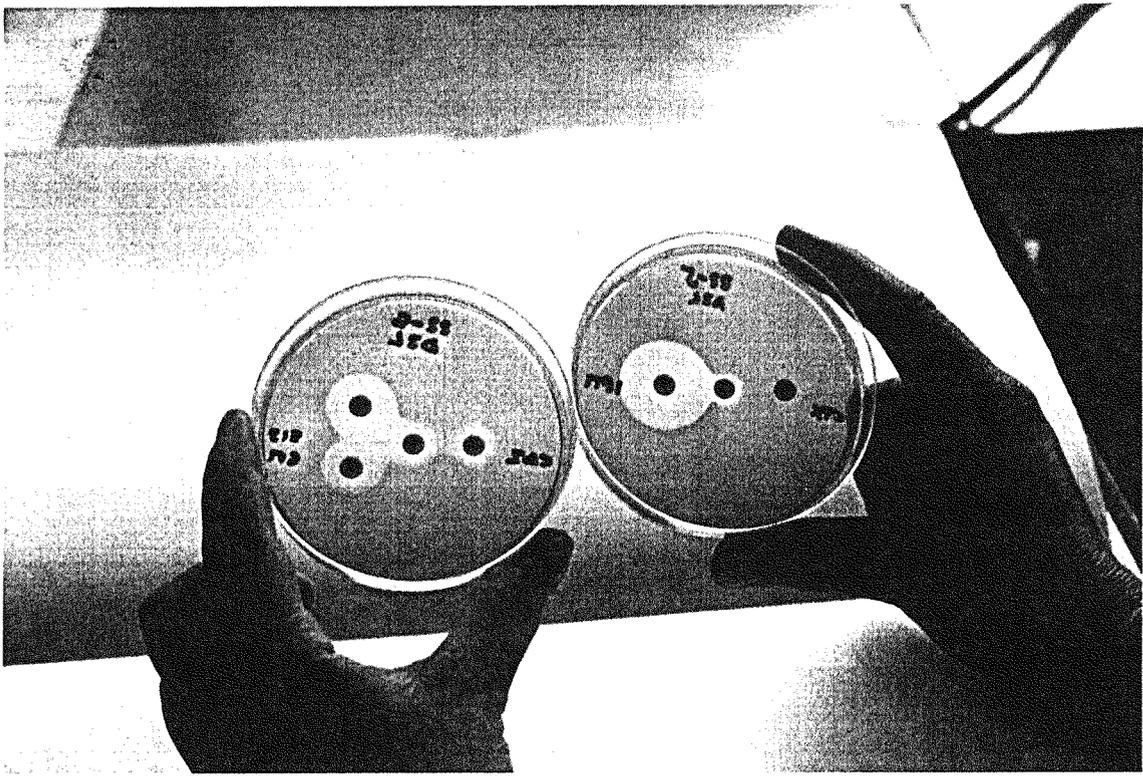
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

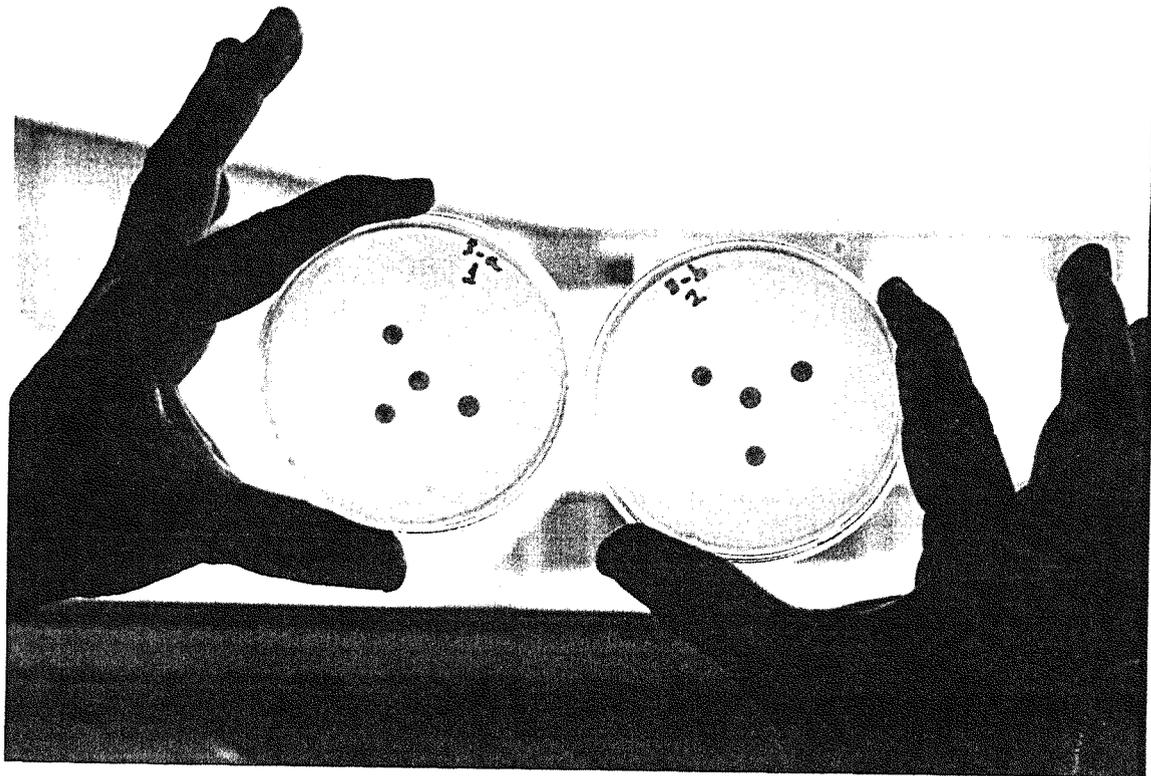
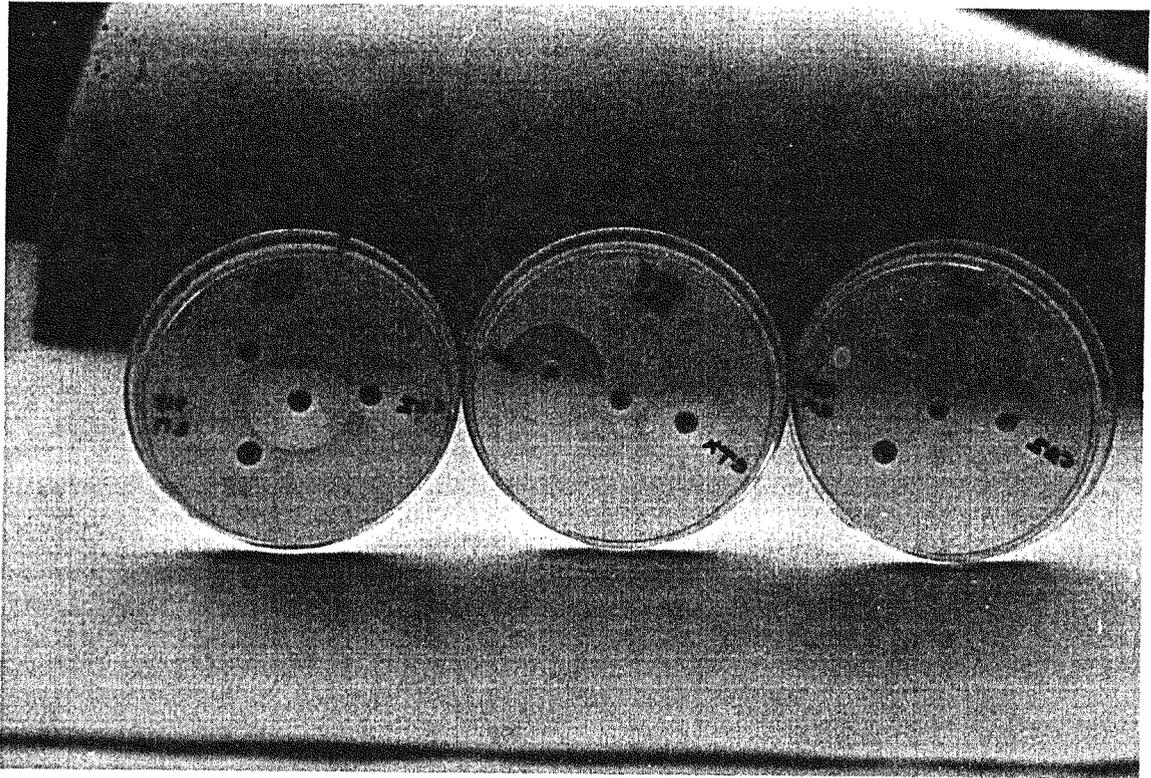


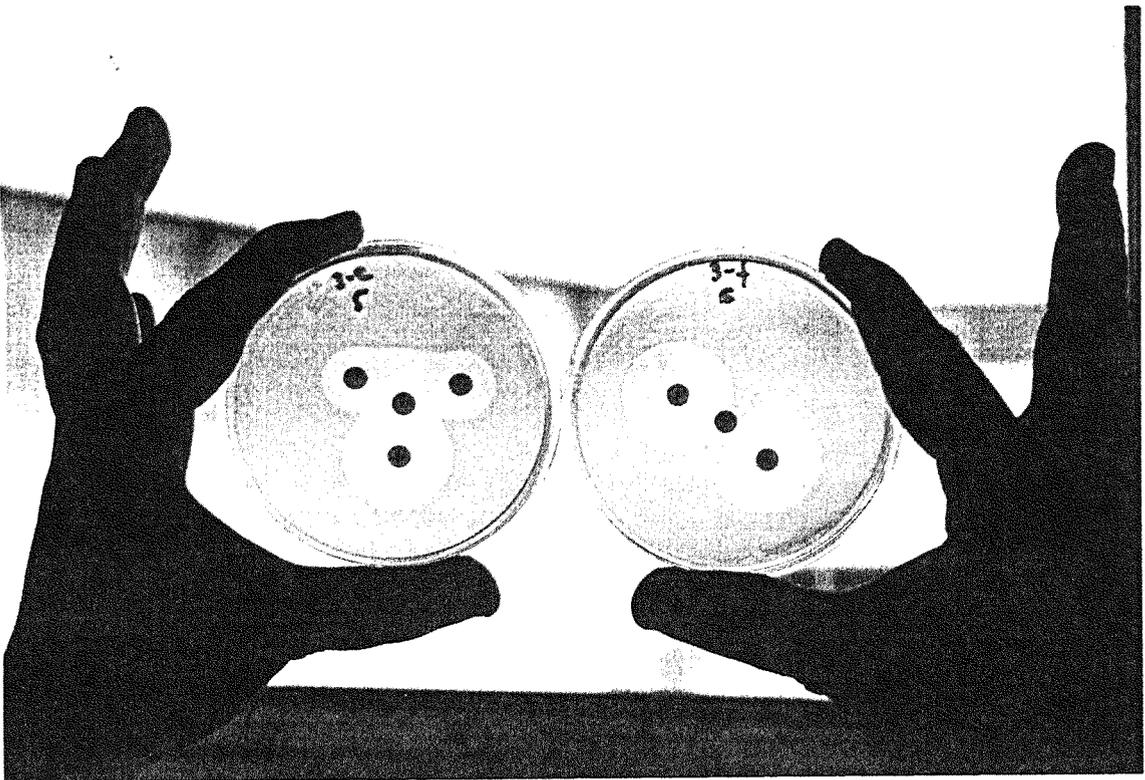
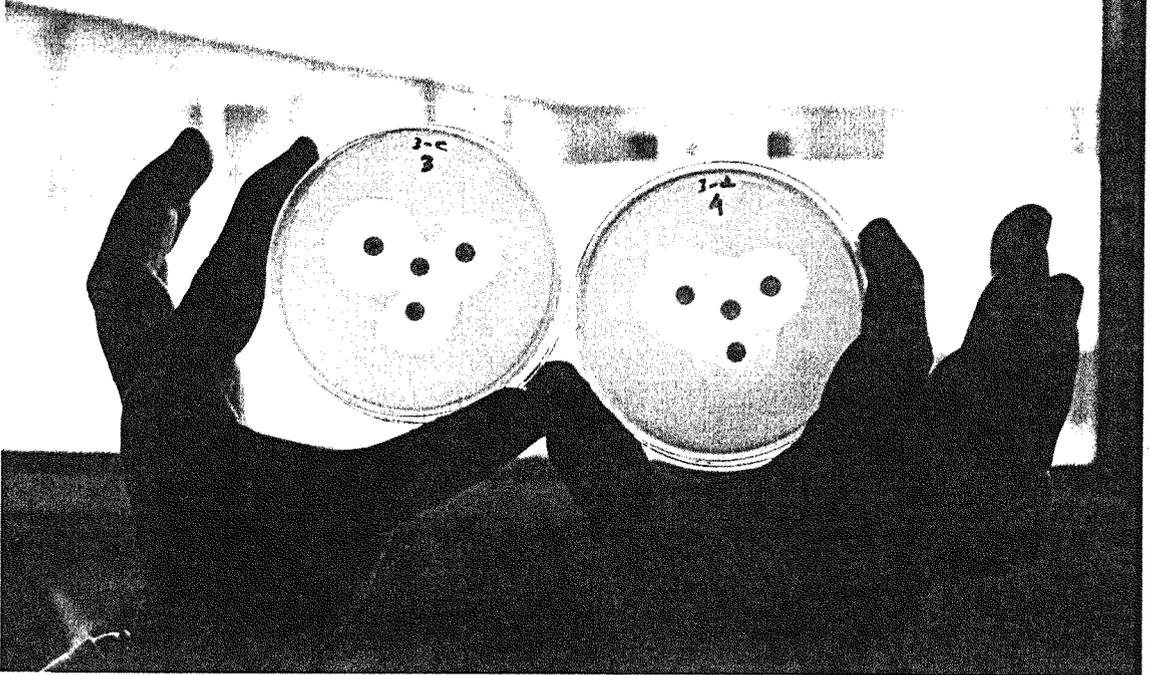


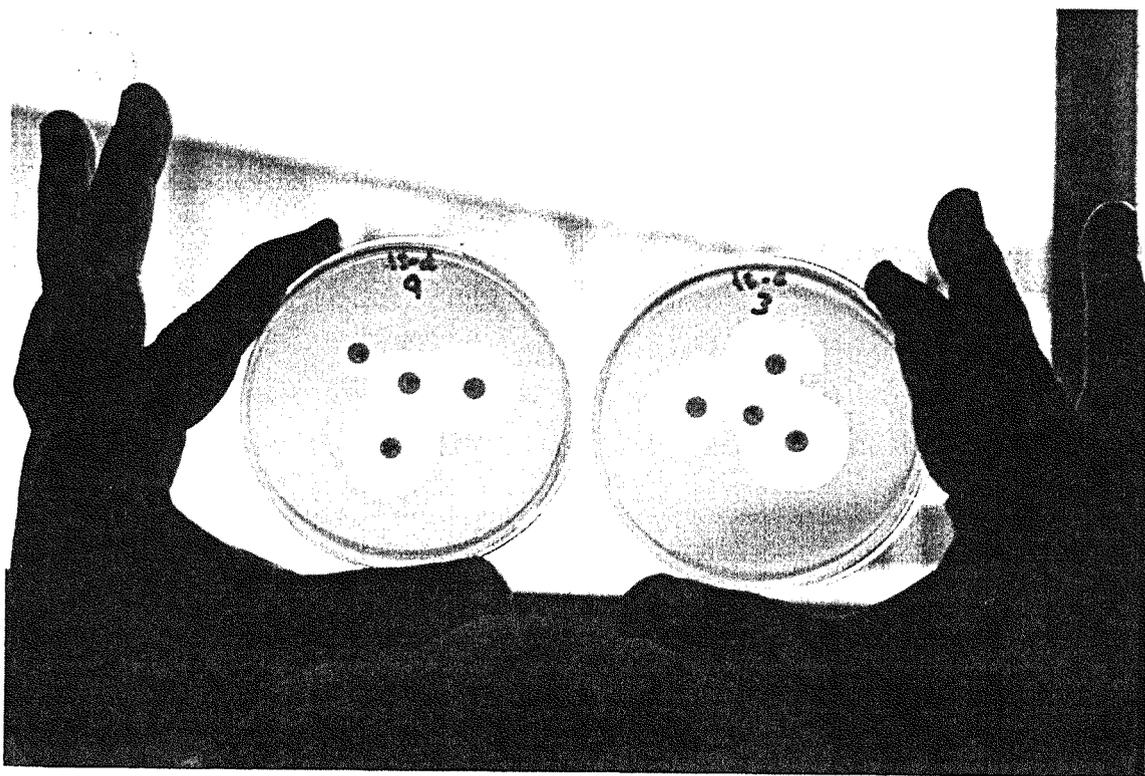
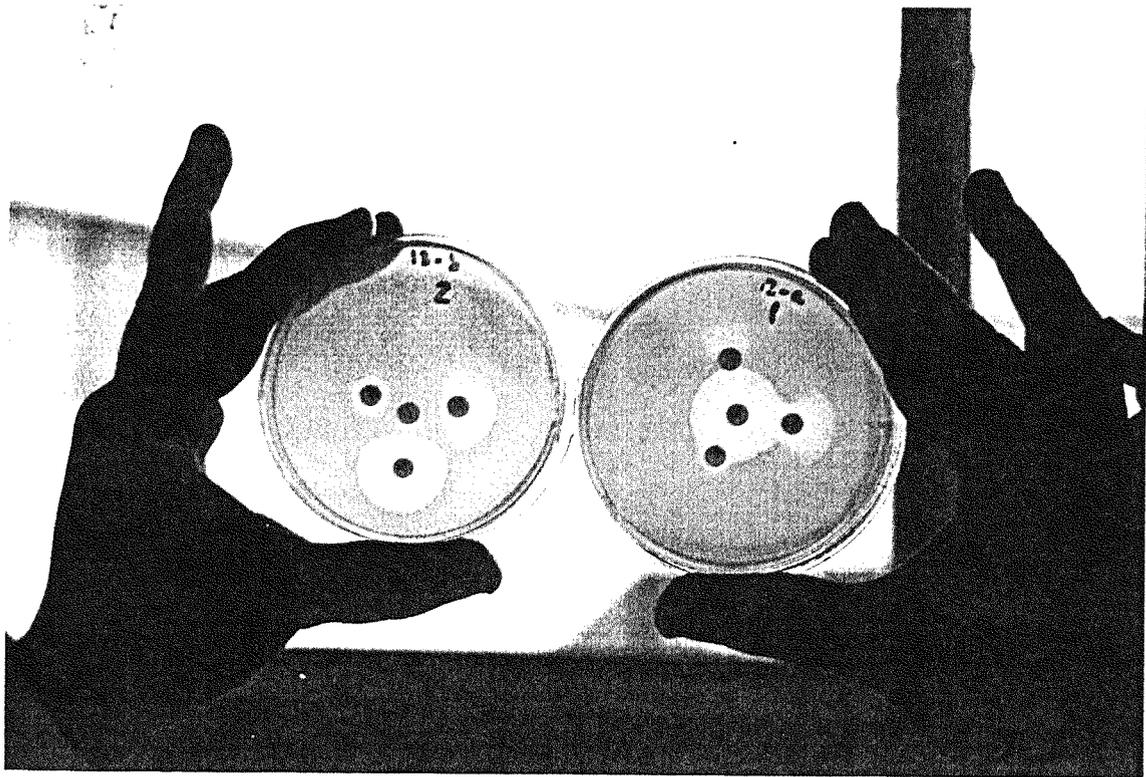


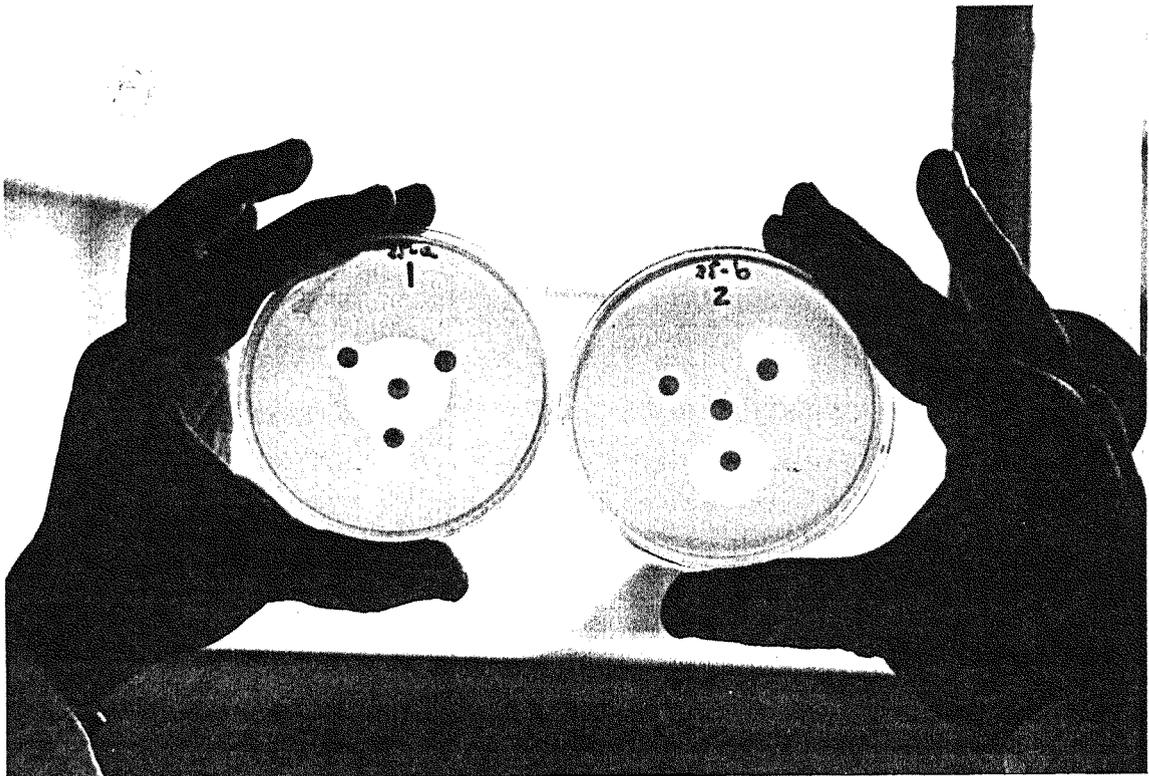
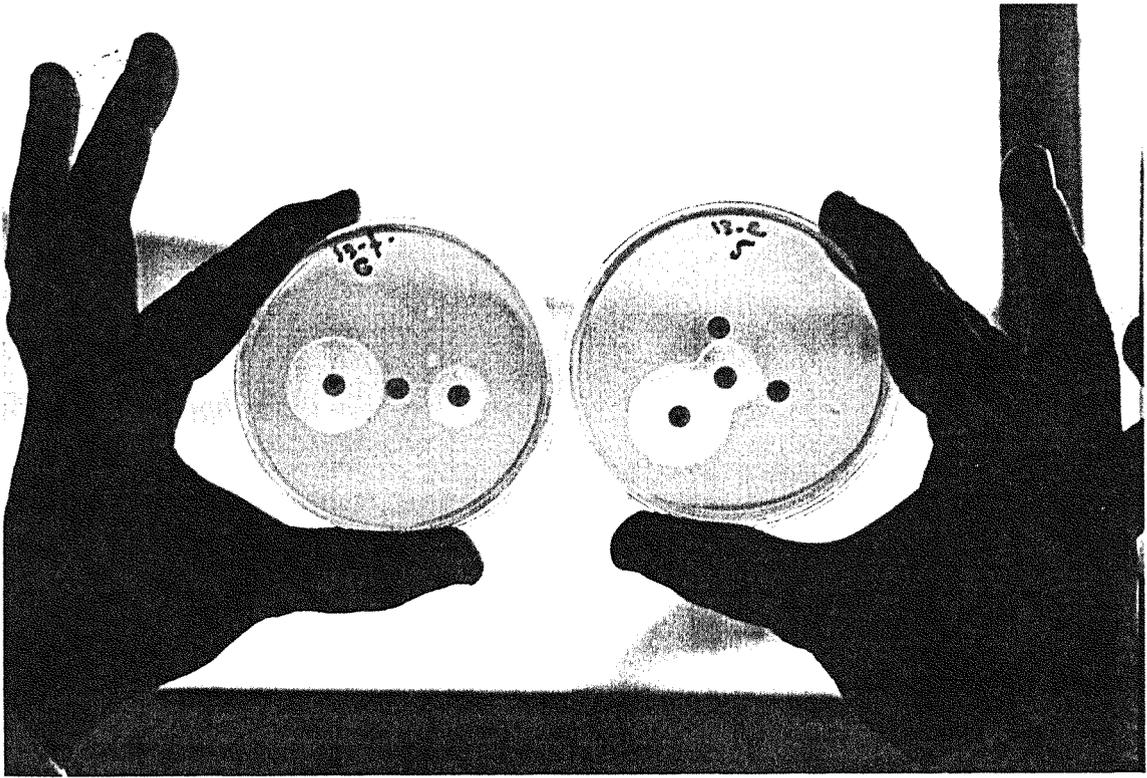


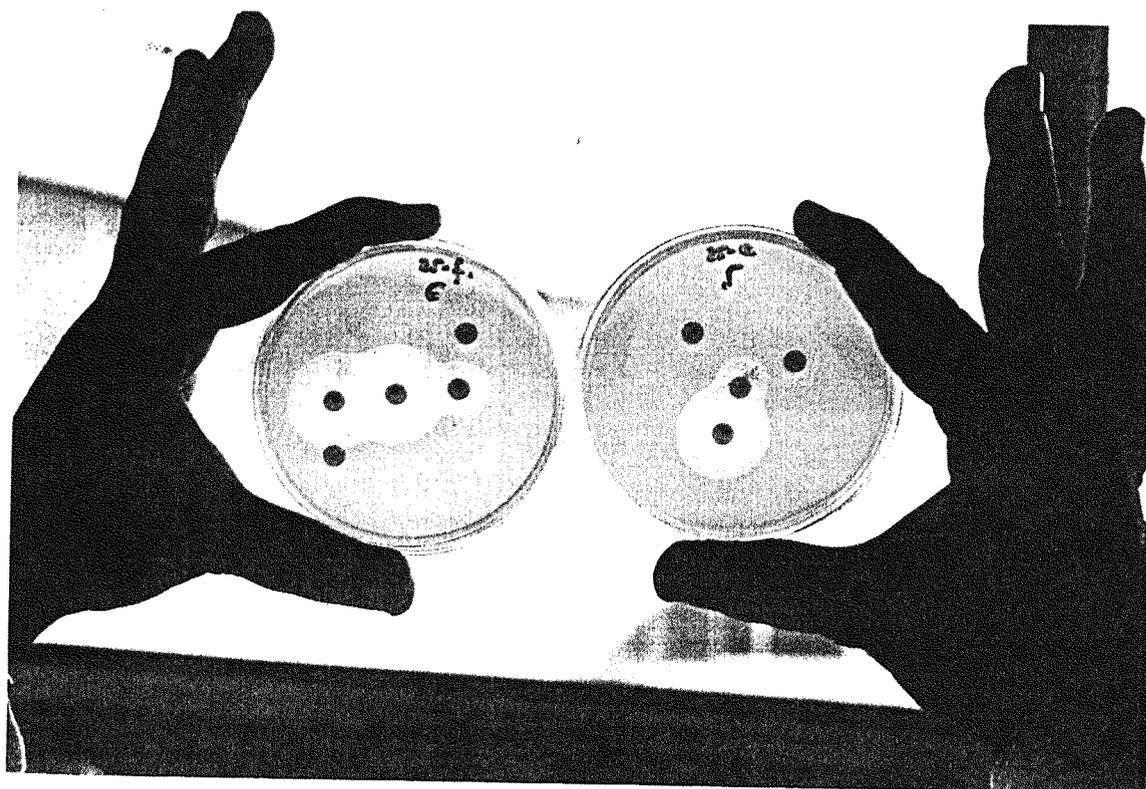
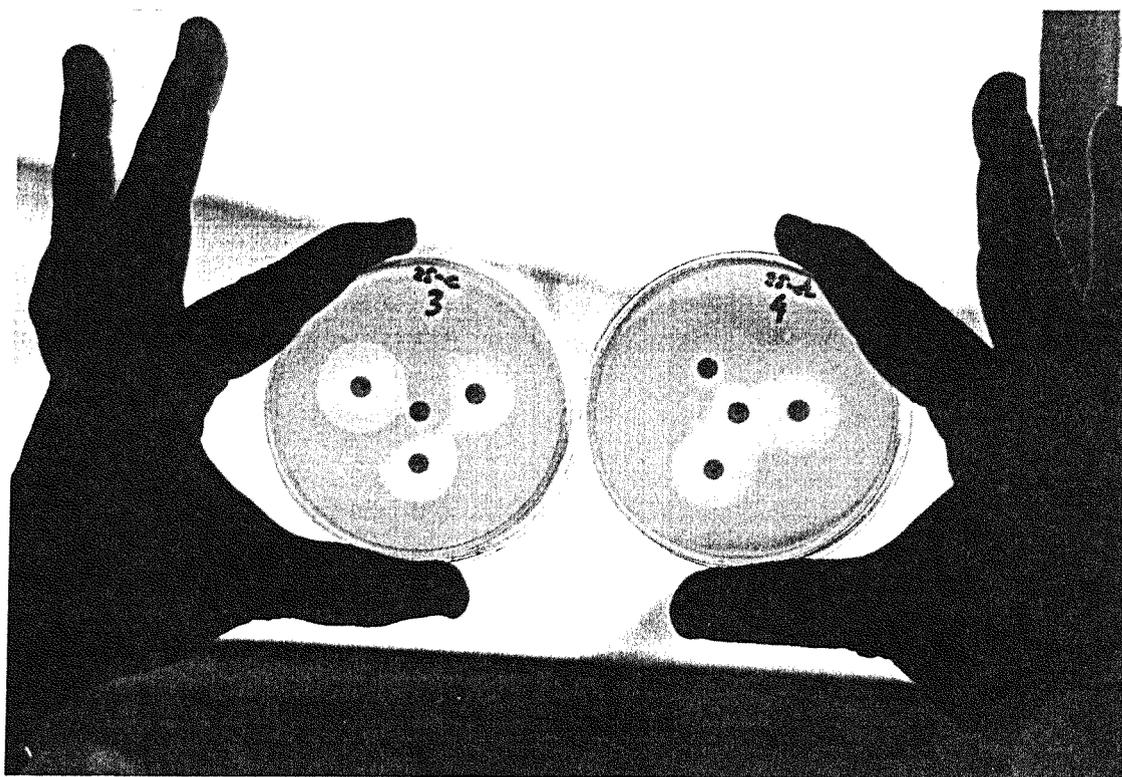












DISCUSION

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de gran trascendencia clínica. Produce infecciones de una elevada mortalidad y es temido en ambientes hospitalarios y extrahospitalarios por cuanto su presencia traduce en muchos casos una alteración de las condiciones habituales de salud del huésped. Si a ello unimos su resistencia a sobrevivir en ambientes hostiles, incluidos aquellos donde la potencia antibiótica se deja sentir, como son los hospitales y su enorme capacidad de utilizar los mecanismos de resistencia que tiene como organismo vivo, hacen que sea un enemigo temible y especialmente difícil de vencer cuando protagoniza un cuadro infeccioso. (38,44 y 68)

Nuestro estudio ha evaluado el comportamiento de 33 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena, comprobando su sensibilidad antibiótica, su capacidad de producción de betalactamasas, su respuesta a la exposición de concentraciones subinhibitorias de antibióticos, en particular a los que se conocen como posibles inductores de producción de betalactamasa y la verificación de si tal respuesta es equiparable a la que puede existir en fluidos biológicos, en concreto plasma.

PRODUCCION DE BETALACTAMASAS. ACTIVIDAD DE BETALACTAMASAS.

Aproximadamente un 20% de las cepas estudiadas producían una cantidad significativa de betalactamasa. Cuatro de ellas, extrapolando, un 12% , producían una considerable cantidad de betalactamasa fácilmente detectable con el método de nitrocefín, propuesto por Medeiros et al (1985) (69) . Una de

ellas, la HU 22, extremadamente potente si nos basamos en el método semicuantitativo que se ha utilizado para comprobar la potencia enzimática de betalactamasa de las cepas (Spot-Test). Un estudio multicéntrico realizado en 10 Hospitales en Francia por Philippon et al (1984) (70) mostraba un porcentaje de cepas productoras de betalactamasa notablemente superior al nuestro, rondando en algunos casos en 90%, como en el caso del Hospital de Lyon.

No obstante y a pesar de la diferencia de resultados, si tenemos presente que todas las nuestras cepas fueron aisladas de hemocultivos podemos establecer que un porcentaje notablemente significativo de esta especie productor de betalactamasa puede complicar la evolución de enfermos tratados con betalactámicos.

SENSIBILIDAD BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS

De los antibióticos estudiados los más activos fueron Imipenem y Cefatzidima con CMI₉₀ entre 2 y 4 ugr/ml. Es conocida la actividad intensa de estos dos antimicrobianos contra cepas de *P.aeruginosa*, actividad basada en muchas ocasiones en la alta estabilidad de estos antimicrobianos a las betalactamasas de esta bacteria (71, 72 y 73).

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores, como Wiedmann et al (1985) (74), aunque cabe reflejar que la sensibilidad de las bacterias estudiadas por nosotros con relación, en concreto a cefatzidima es superior a la registrada por ellos, mientras que la sensibilidad a gentamicina de las 441 cepas estudiadas es superior a la encontrada por nosotros: la CMI₉₀ esta situada a una concentración mayor de 32 ug/ml, mientras que estos autores la cifran en 16 ug/ml. Con relación a Moxalactam existe también una ligera discrepancia, aunque dentro de la tónica general de concordancia. Nuestra CMI₉₀ se obtiene con concentraciones de 32 ug /ml, mientras que estos autores la cifran en mayor de 32 ugr/ml. Todas estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Esta actividad in vitro del ceftazidima tiene una buena correlacion in vivo en los estudios publicados(75 y 76)

Imipenem, el otro agente más activo de los estudiados tiene una actividad muy similar a ceftazidima, alcanzandose el 100% de inhibiciones con una concentracion de 16 ugr/ml. Estos resultados son similares a los encontrados en la bibliografia: Bauerfeind (1981)(77), Lynch et al(1987)(78) y Livermoore y Yang (1987)(79).

Tanto cefaperazona, como cefotaxima, tienen con respecto a los antibioticos estudiados una actividad intermedia, alcanzandose CMI90 en el caso de cefotaxima con 32 ug/ml. Pero es azlocilina, quien presenta una actividad más débil, alcanzandose CMI90 con 256 ugr/ml.La bibliografia consultada presenta en este sentido unos resultados variables, dependiendo de las cepas de Ps.aeruginosa en cuestion(78,80,81). Un estudio realizado por Perea (1987)(44) mostraba sin embargo como de las 433 cepas de Ps.aeruginosa aisladas en 1984, la CMI50 con relacion a azlocilina era de 4 ug/ml y la CMI90 de 64; resultados que mostraban una actividad muy superior a la encontrada por nosotros en nuestro estudio,aunque las cepas fueron aisladas en el mismo hospital.Sin embargo, con relacion a otros antibioticos, cefoperazona,cefotaxima,ceftazidima, imipenem,moxalactam, los resultados eran solo levemente discrepantes, cuando no muy similares. Solo con relacion a los aminoglicosidos estudiados existe una discrepancia clara. Nuestras cepas eran notablemente más resistentes a tales antibioticos que las estudiadas en el trabajo de Perea y si bien entonces mostraban un perfil de accion diferente, en el nuestro era muy similar, con actividades practicamente iguales. Es destacable igualmente como azlocilina no muestra actividad a bajas concentraciones(menos 4 ug/ml), resultados que concuerdan también con los de este autor(82).

En relacion a las cepas productoras de betalactamasas era esperable encontrar una sensibilidad disminuida con relacion a los betalactamicos utilizados en el estudio. Hay que resaltar igualmente que la actividad de los aminoglicosidos fue

escasa, mostrando todas las cepas, salvo la HU7 unas CMIs superiores a 32 ug/ml, la concentración máxima que se utilizó. Es resaltable con relación a azlocilina que las débilmente productoras de betalactamasas (producción de cambio de coloración con nitrocefina mayor a un minuto), mostraban unas CMIs levemente menores que las que consideramos fuertemente productoras de betalactamasas, según el test usado. Como podemos observar en la tabla N.2. todas las cepas estudiadas: HU3, 13, 22 y 25 mostraron una sensibilidad para azlocilina de 256 o más, o sea, la máxima concentración que se estudió. El patrón de sensibilidades en otros antibióticos varía de unas cepas a otras, no obstante es destacable la gran resistencia que posee la cepa HU22, para incluso los antibióticos de más actividad de los estudiados, imipenem y ceftazidima, con concentraciones de 8 y 16 ug/ml, respectivamente.

Estos resultados coinciden en la variabilidad de la sensibilidad de las cepas con los estudiados por Lynch et al (1987) (78), Livermore y Yang (1989) (79) y Jiménez-Lucho et al (1986) (83) y Buscher et al (1984) (84).

PRODUCCION DE BETALACTAMASA EN CEPAS HIPERPRODUCTORAS

La producción de betalactamasas en las cuatro cepas es muy parecida y probablemente muestre un mismo comportamiento. El rango entre la producción de las cuatro cepas es reducido y llama la atención que la cepa que mayor producción basal de betalactamasa posee es la HU22, justamente la que mostraba un espectro de sensibilidad más bajo para los antibióticos que se han usado. No existe, en ese sentido ninguna asociación entre la sensibilidad y la producción basal de betalactamasas en ninguna otra de las cepas estudiadas.

En este sentido nuestros resultados basales concuerdan con los encontrados por otros autores como Nordstrom y Sykes (1974) (85) y Aronoff y Shlaes (1987) (86).

PRODUCCION DE BETALACTAMASA TRAS INDUCCION CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE OCHO AGENTES ANTIMICROBIANOS.

Es ya conocido que las concentraciones subinhibitorias de antibioticos pueden afectar a las bacterias(87 y 88). En muchas ocasiones las bacterias producen infecciones que son tratadas inadecuadamente con dosis insuficientes. Los niveles alcanzables entonces en el foco de infeccion se situan por debajo de la concentracion minima inhibitoria. Niveles subinhibitorios de antibioticos pueden inducir la produccion de betalactamasa por P.aeruginosa(27,89).

P.aeruginosa posee una betalactamase inducible de manera practicamente constante, que está codificada cromosómicamente. Además puede poseer una amplia variedad de plasmidos que pueden codificar otros tipos de betalactamasa (90,91,92,93 y 94). La primera de estas betalactamasas corresponde con lo que se ha dado en llamar betalactamasa tipo I: la enzima de Sabath y Abraham(1965)(95).

En nuestro trabajo encontramos que practicamente todos los antibioticos betalactamicos inducen la produccion de enzima betalactamasa cuantificada con los métodos antes mencionados.

Tan solo los aminoglicosidos, como era de esperar, no muestran un espectro de actividad superior al basal, si bien tampoco se puede considerar que antibioticos como cefotaxima, ceftazidima o moxalactam muestren un incremento notable. De cualquier modo parece existir una tendencia general a un discreto aumento. Esta tendencia evaluada estadisticamente solo es valorable en dos antibioticos: azlocilina e imipenem con p menor de 0.05.

Aminoglicosidos

Tanto sisomicina como gentamicina no inducen la produccion de betalactamasa. Los niveles de enzima betalactamasa es similar

con relacion a la produccion basal del enzima, lo cual es esperable, atendiendo a la diferente estructura quimica de estas moleculas. El analisis estadistico no muestra alteraciones significativas, como era igualmente esperable.

Cefotaxima, Ceftazidima y Moxalactam

Muestran un patron similar en cuanto a la capacidad inductiva, si bien recordemos que con relacion a su actividad entraban dentro de grupos diferentes. Es destacable que la cepa HU22 es la que muestra un mayor equilibrio con relacion a la produccion inducida de enzima betalactamasa, con valores extremadamente similares a los de la produccion basal. Este hecho unido a la especial sensibilidad de la cepa HU22 nos hacen pensar que el comportamiento de esta bacteria tenga posiblemente unos puntos de referencia diferentes a las de sus homologos HU3, HU13 y HU25. En las otras cepas, aunque existe una tendencia al aumento podemos constatar como el analisis estadistico no muestra alteraciones significativas.

Cefoperazona

Es un caso especial. Tanto la cepa HU3 como HU 25 producen con cefoperazona un ligero aumento en la produccion de beta lactamasa ($\times 4$ y $\times 3$) que es estadisticamente significativo con respecto a la produccion basal, pero HU13 y HU22 no muestran una actividad parecida a la de las otras cepas, por lo que podemos decir que existe una induccion variable. De cualquier modo no hemos observado con relacion a la actividad un patron especial de cefoperazona para las cepas estudiadas, asimilandose mas a antimicrobianos tales como cefotaxima o moxalactam. No obstante con relacion a las cepas que nos ocupan HU3 y HU25 podemos decir que si bien la cepa HU3 presenta la menor sensibilidad con una CMI de 256 ug/ml (su produccion basal es de 0.05 y la inducida cuatro veces mayor), lo cual es un resultado concordante, la cepa HU25 presenta CMI de 32 ug/ml, que es la mas baja para cefoperazona.

Azlocilina

Esta betalactamico antipseudomonas produce en nuestro estudio al utilizar concentraciones subinhibitorias un aumento en la produccion de las betalactamasas de todas las cepas, si bien es particularmente relevante en el caso de de las cepas HU13 y HU25. Curiosamente la cepa HU22 es la que presenta una menor actividad inductiva, punto que se correlaciona con la tonica observada por esta cepa no solo con relación a azlocilina, sino también con otros antibioticos.

Posiblemente esto ilustre el hecho de la baja actividad de azlocilina frente a las cepas de *P.aeruginosa* - es el antibiotico menos activo de todos los empleados en el estudio-, pero con relacion a las cepas que hemos estudiado mas profundamente podemos establecer como existe una correlacion clara entre la baja actividad del antibiotico-tiene CMI's en todas ellas de 256 ugr/ml o más-y esta produccion enzimatica aumentada tras la exposicion a concentraciones subinhibitorias de azlocilina.

Azlocilina no está considerado como un inductor fuerte, segun otros autores, como Livermoore y Yang(1987)(79) o Livermoore(1986)(96).

Nuestros resultados para las cepas estudiadas podemos establecer que induce de 5 a 10 veces la produccion basal de betalactamasas.

El estudio estadistico, evidencio una diferencia significativa con p menor de 0.005.

Imipenem

De los antibioticos probados en el estudio realizado imipenem es sin duda el que producía una mas fuerte induccion en la produccion de betalactamasa en todas las cepas estudiadas, con excepcion probablemente de la HU22, como viene siendo una constante con otros antibioticos utilizados.

Imipenem presenta unas tasas de induccion de hasta 15 veces con respecto a las condiciones basales determinadas. Esta induccion es por lo tanto, particularmente relevante en las cepas HU13 y HU25.

Es notable en otro orden de cosas que imipenem sea tambien, junto a ceftazidima el antibiotico mas activo de los que hayamos estudiado y no existe una clara relacion entre tal produccion de betalactamasa inducida y las CMI's de las cepas estudiadas. Tan solo en el caso de HU22 existe una asociacion. La cepa que produce menos cantidad de betalactamasa inducida es la que tiene curiosamente una mayor CMI para imipenem de todas las cepas estudiadas.

El estudio estadistico de la variacion en la produccion de betalactamasa con y sin antibiotico en el caso de imipenem puso de relevancia una diferencia significativa.

Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Tausk et al(1985)(27), que encuentran como imipenem induce niveles significativos de betalactamasa en *P.aeruginosa*, o Bertram y Young(1984)(97). Evidentemente nuestros datos sugieren que la exposicion de *P.aeruginosa* a niveles subinhibitorios de imipenem pueden resultar en un incremento de la produccion de betalactamasa por las cepas, con el consiguiente posible fracaso del tratamiento in vivo.

No pensamos que sea contradictorio la alta actividad de imipenem en las cepas problema, por cuanto a pesar de tal induccion, el antimicrobiano es, aunque inductor, lo suficientemente estable frente a los betalactamicos inducidos como para actuar frente a *P.aeruginosa*.

La induccion es la activacion transitoria de la sintesis de betalactamasas en respuesta a la adicion de un inductor. La sintesis de betalactamasa comienza de 1 a 20 minutos aproximadamente tras la exposicion de bacteria al antibiotico y concluye cuando todo el ha sido hidrolizado. Evidentemente la cantidad de betalactamasa producida esta en relacion con la concentracion de inductor como con el tiempo de induccion(98). Es evidente por otra parte que bajo unas mismas condiciones las betalactamasas difieren enormemente en sus potenciales de induccion(16,98,99,100, 101).

Livermore(1988)(98) concuerda con nosotros en el caracter de fuerte inductor del imipenem , asi como en el de la cefoxitina, que hemos empleado como referencia de la capacidad inductiva de las cepas (102).

Con respecto a las cefalosporinas de tercera generacion que hemos empleado nuestros resultados concuerdan con los de Lynch et al(1987)(78) y el mismo Livermore(1988)(98), si bien que azlocilina en nuestras cepas es capaz de inducir una fuerte produccion enzimatica de betalactamasa.

En otro orden de cosas, si bien las betalactamasas de *P.aeruginosa* se encuentran en el espacio periplasmico, no siendo difusibles al medio, las posibles modificaciones de la pared bacteriana por efecto de estos agentes antimicrobianos pudieran alterar el espacio periplasmico o causar microalteraciones los suficientemente importantes como para que se liberen al medio tales enzimas(88).

Es interesante resaltar que otros autores, como Drigues et al(1986)(103) hallan como de los antibioticos probados , ceftazidima es el más fuerte inductor, mientras que cefoperazona presentaba un efecto intermedio; detalle que en parte concuerda -en lo referente a cefoperazona con nuestros resultados.No obstante hay que recalcar que el estudio de este autor fue con una sola cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

En nuestro estudio, por tanto, azlocilina no puede encuadrarse junto a antibioticos como las cefalosporinas de tercera generación, detalle en el que no concordamos con Livermore y Yang(1987)(79) y Livermoore(1988)(98), que denomina a antibioticos como cefotaxima, azlocilina y ceftriaxona "inductores débiles -lábilis"(79,98), si bien se establece que la imipenema,por otro lado es un antibiotico ligeramente labil ante las enzimas de *P.aeruginosa*,siendo las CMis de las betalactamasas inducibles para este agente muy similares en el estudio de Livermoore y de Williams(1985)(104) , a las que encontramos nosotros.

En conjunto, aunque parece existir un comportamiento general dependiendo del tipo de antibiótico usado frente a *P.aeruginosa* según los trabajos de los autores consultados, por ejemplo, sabemos que cefoxitina e imipenem son antibióticos inductores potentes de las betalactamasas de clase I, aunque lábiles, y que la mayoría de otros nuevos betalactámicos son débiles inductores de las betalactamasas de la clase I, probablemente la variabilidad natural bacteriana de *P.aeruginosa* sea lo suficientemente amplia y los estudios todavía incompletos como para establecer claramente el comportamiento real de esta bacteria. Además, en muchos casos *P.aeruginosa* posee más de una betalactamasa que hace difícil establecer patrones de respuesta.

DISCUSION SOBRE LA PRUEBA DE DIFUSION DE DISCO

Cepa HU3

Cefoxitina es un fuerte inductor, y causa áreas de corte en las placas en la que existen antibióticos como cefalosporinas, como es el caso de cefotaxima, azlocilina y ceftazidima (Figuras 2 y 3). Evidentemente ni sisomicina ni gentamicina, como aminoglucosidos, fueron hidrolizados por la actividad de betalactamasa existente en la placa N.2. Es notable también la zona de corte sobre cefoperazona.

Imipenem por su parte causa zonas de inhibición en azlocilina, de modo débil, como se puede observar en las figuras n.3 y 13, pero no actúa sobre ceftazidima, cefotaxima y evidentemente tampoco sobre gentamicina o sisomicina. Estos resultados no concuerdan con los de Tausk et al (1985) (27), en los que no solo imipenem induce de modo importante resistencia en antibióticos antipseudomonales, sino que causa en un gran porcentaje áreas de inhibición de tamaño muy superior al encontrado por nosotros.

Azlocilina, por su parte, no indujo zonas de inhibicion con ninguno de los antibioticos probados en la cepa HU3, si bien en la figura n.14 se aprecian areas de corte en el caso de ceftazidima y de cefotaxima que no se muestran en la figura n.4 utilizando los mismos antimicrobianos. Pensamos, por lo tanto, ya que la unica diferencia entre las dos experiencias es la existencia concomitante de imipenem que este agente pudiera ser responsable indirecto de la zona de inhibicion mostrada en la figura n.14.

Cefoperazona.

En ninguno de los casos con los antibioticos probados, azlocilina, ceftazidima, cefotaxima, imipenem, sisomicina o gentamicina se logro comprobar una zona de inhibicion o zona de corte. Vease figura n.15.

Es evidente la notable capacidad inductora de cefoxitina, que en nuestro estudio contrasta con la registrada para imipenem, azlocilina o cefoperazona. Este hecho es conocido e incluso en algunos estudios (Pérez Bacalbao, 1991) (102) se toma a cefoxitina como referencia para conocer el posible papel inductor de otras cefalosporinas. Existe además una concordancia entre los dos métodos usados para comprobar la capacidad inductora de azlocilina e imipenem, en esta cepa, pues la escasa capacidad inductora mostrada con azlocilina en este caso se ve refrendada con la baja producción inducida demostrada en la experiencia de inducción con concentraciones subinhibitorias (Confer tabla N.8)

Cepa HU13.

Cefoxitina

En este caso cefoxitina, a pesar de ser un fuerte inductor, solo consiguio producir zonas de inhibicion en cefotaxima y ceftazidima, como puede observarse en las figuras 5 y 16. Este resultado discrepa del obtenido con relacion a la cepa HU3, por lo que es esperable un diferente comportamiento en cuanto a la produccion de betalactamasas de ambas bacterias.

Imipenem

En este caso imipenem induce zona de inhibición en ceftazidima, como se puede apreciar en las figuras n. 6 y 16 mas claramente. Aquí también existe un diferente comportamiento de las cepas en la producción de betalactamasa.

Azlocilina

Azlocilina es capaz de inducir una zona de inhibición observable en la figura n.7, con relación a cefotaxima. La zona de corte producida en la figura n. 17, donde se utilizaba también imipenem pensamos sea producida por la actividad de este último agente antimicrobiano, y más si tenemos presente que como hemos observado imipenem inducía en esta cepa una zona de corte mostrada anteriormente en las figuras n. 6 y 16.

Cefoperazona

No indujo zona de inhibición con ninguno de los antimicrobianos probados en esta cepa.

Es notable la diferencia de patrones de inducción de las cepas en la prueba de difusión de disco entre las cepas 3 y 13. Aquí sí podemos observar la capacidad de inducción de azlocilina frente a cefotaxima, pero la capacidad de inducción de cefoxitina es menor que la registrada en la cepa anterior y el enfrentamiento entre dos inductores siempre da un resultado negativo (Imipenem-Azlocilina) (Cefoxitina-Azlocilina) (Cefoxitina-Imipenem).



Cepa HU22

Esta cepa, que como antes hemos comentado presentaba un patron particular de comportamiento en relacion a la produccion de betalactamasas, con ninguno de los inductores probados: los fuertes cefoxitina, imipenem y azlocilina y el débil cefoperazona, conseguimos se produzcan zonas de inhibición o de corte. En todos los casos tal fenomeno es negativo como puede apreciarse en las figuras n. 8, 9 y 10.

Si a este hecho unimos que presenta una sensibilidad diferente a de las otras cepas estudiadas y que su produccion basal e inducida en el estudio realizado no variaba significativamente, como lo hacian las otras cepas HU3, HU13 y HU25, podemos pensar que sea una bacteria en la cual no existe una betalactamasa inducible, sino que posiblemente sea constitutiva, y desrreprimida, o sea, la desrrepression estable de la sintesis de beta-lactamasa, aunque confundida a veces con la induccion muestra un carácter totalmente diferente (Livermoore, 1986 y Phillips, 1986) (105 y 106): mientras que en la induccion es una respuesta transitoria fenotipica ante un betalactamico, la desrrepression estable -que puede ser parcial, si el microorganismo tiene cierta capacidad de induccion- el agente biologico produce una hiperproduccion de enzima, con independecia de la presencia o no del antibiotico (98).

Cepa HU25

Cefoxitina

La cefoxitina en esta cepa produce zonas de inhibición en el caso de cefotaxima y ceftazidima, pero no en el caso de azlocilina, a la que existe resistencia. Es notable como las

tres cepas se comportan de manera diferente con relacion a la capacidad inductiva por parte de cefoxitina.

En la cepa donde más induccion se observa por parte de cefoxitina es la HU3, seguida de la HU 25 y por ultimo la HU 13, en la que solo aparecen zonas de corte frente a cefotaxima. Este antibiotico, en otro orden de cosas es el antibiotico que con más facilidad pone en marcha su respuesta frente a la capacidad inductiva de cefoxitina en las cepas estudiadas.

Imipenem

Por su parte imipenem solo consigue zona de inhibición con relacion a ceftazidima y no con relacion a cefotaxima y azlocilina.

Es notable como imipenem en las cepas estudiadas HU13 y HU 25 consigue producir zonas de inhibicion con la ceftazidima, resultados evidentemente discordantes con los encontrados por Tausk et al en su trabajo (1985)(27).

Azlocilina

Aqui azlocilina produce zona de inhibicion con relacion tambien con cefotaxima, como ocurría con la cepa HU13. Es resaltable no solamente la produccion basal similar de ambas cepas, sino el similar comportamiento que poseen con relacion a su capacidad inductiva de betalactamasas frente a determinados agentes antimicrobianos. El resultado supuestamente positivo para ceftazidima pensamos, como en anteriores casos, que esta matizado por la actuacion del imipenem, que como hemos comprobado posee un efecto inductor con relacion a ceftazidima.

Cefoperazona

Tampoco aquí cefoperazona fue capaz de mostrar ninguna zona de inhibición o de corte para los antibióticos puestos en contacto con este antibiótico.

La diferencia de comportamiento de las cepas en la prueba de Difusión de Disco, pensamos que pone de manifiesto una diferente expresión del "bagaje" de betalactamasas bacterianas dependiendo del substrato sobre el que tengan que actuar y de las condiciones especiales de la bacteria en el medio. En este sentido es por ello notable la discordancia entre el trabajo de Tausk et al (1985) (27) y el nuestro, por cuanto que a pesar de ser las condiciones muy similares, imipenem en su caso en casi un centenar de cepas producía una zona de inhibición de prácticamente todos los antibióticos probados (moxalactam, cefotaxima, ceftriaxona, cefoperazona, cefsulodin, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina). Posiblemente, por ello, estas diferencias expresen una variabilidad inductiva que depende de la propia naturaleza de las cepas en cuestión, haciendo por ello difícil, ante este diferente comportamiento, establecer conclusiones definitivas.

ESTUDIO DE LOS VALORES DE PUNTO ISOELECTRICO DE LAS BETALACTAMASAS DE P.AERUGINOSA Y ESPECTRO DE ACTIVIDAD.

Desde que Sykes y Matthew recomendaban en 1976 el estudio del punto isoelectrico de las betalactamasas de las bacterias como criterio mayor de identificación (21), se ha hecho obligado tal para poder ahondar en el significado bioquímico y microbiológico de tales enzimas.

La figura n.1 muestra el efecto del crecimiento de las cepas estudiadas Hu3, HU13, HU22 y HU25, en presencia y ausencia de un inductor típico de betalactamasa (cefoxitina), a una concentración de 25 ug/ml. La aparición de nuevas bandas debe, pues, en general, interpretarse como betalactamasas diferentes.

La cepa HU3 muestra sin inducir una banda de punto isoelectrico 5.6, asimilable a lo que conocemos como TEM-2, pero al inducir aparecen dos bandas mas que se situan en los puntos 7.13 y 7.7.

La cepa HU13 muestra, sin inducir una banda situada en el punto isoelectrico 5.4, mientras que al inducir aparecen una nueva banda dieferente a las producidas en la cepa anteriormente nombrada: pI.7.85.

La cepa HU22 muestra dos bandas que se situan en los puntos 7.13 y 7.7., pero tanto con inductor, como sin él, lo que nos permite establecer, como antes comentabamos que estamos frente a una cepa desrreprimida. Esto concuerda con el espectro especial de sensibilidad que presenta, asi como el patron que sigue de comportamiento, y la nula induccion que ha presentado en la prueba de difusion de disco.

La cepa HU25 muestra una banda situada en el p.I 5.4, Al inducir con cefoxitina nos aparece una banda débil situada en el punto 7.7.

Desde un punto de vista de p.I la cepa HU13 difiere de las otras tres en que posee una betalactamasa de pI 7.85, determinada cromosomicamente, además produce una betalactamasa TEM-1. Las otras tres cepas, como se comprueba al inducir, presentan el mismo patron de betalactamasa cromosomica.

Hay que destacar en este mismo sentido que la resistencia de la cepa HU3 a la carbenicilina, ticarcilina y piperacilina, cuando se la compara con la cepa HU22, concuerda con que produce una betalactamasa TEM-2. Sin embargo es interesante resaltar que la cepa HU22 tiene una gran resistencia a cefotaxima, ceftizoxima, ceftazidima, ceftriaxona y aztreonam a pesar del hecho que "parece producir" el mismo tipo de betalactamasa cromosomica. Lo mismo se podria decir de la cepa HU 25, que presenta gran resistencia a carbenicilina, piperacilina y ticarcilina, debido a la producción de una betalactamasa TEM-1, pero presenta más sensibilidad a cefotaxima, ceftizoxima, ceftazidima y ceftriaxona que la cepa HU22.

El patrón de sensibilidades de las cepas HU13 y HU3 y HU25 es parecido y concuerda con la producción de una betalactamasa tipo TEM y una betalactamasa cromosómica de pI 7,85.

La cepa HU22 ha mostrado en las dos técnicas empleadas-semicuantitativa-spot-test y cuantitativa- la mayor actividad de betalactamasa de las cepas estudiadas. El estudio de p.I con inductor incrementó la producción de betalactamasas en las cepas HU3, HU13 y HU 25, pero no en la HU 22. Esto confirma que estamos en presencia de una cepa hiperproductora mutante desreprimida (98,107) y dato que es concordante con la alta resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

La comparación de las bandas de las cepas HU22, HU 3 y HU 25 muestra que poseen la misma betalactamasa cromosómica. La cepa HU 13 tiene una betalactamasa claramente diferente de pI alto.

Así pues y ahondando en estos resultados parece lógico pensar que las cepas HU3,13 y 25, que exhiben unas características similares, al tener dos tipos de betalactamasas, una plasmídica y otra inducible, cromosómica perteneciente, por ello a la clase I de la clasificación de Richmond y Sykes(20) ,presenten también unas características similares en cuanto a su comportamiento con los agentes antimicrobianos. En todas ellas existe un factor común en cuanto a su capacidad de actuar de manera común frente a cefotaxima, lo que induce a pensar que las betalactamasas cromosómicas de estas bacterias son las responsables de las resistencias a cefotaxima, datos concordantes con los presentados por Livermoore (1983)(108).

Las betalactamasas TEM de *P.aeruginosa*, corresponden ,segun esta misma clasificacion a la clase IIIa (20). Nuestros resultados concuerdan en este sentido con los ya especificados por Sykes y Matthew (1976)(21), al encontrar dos subgrupos dentro del grupo TEM, los TEM 1, de punto isoelectrico 5.4 y TEM-2, de punto isoelectrico de 5.6. Hay que especificar que estos plasmidos deben provenir de enterobacterias, como opina Fullbrook et al(1970)(109), siendo transferidos muy frecuentemente a *P.aeruginosa*, como opinan Labia et al (1981)(110), Bryan et al(1972)(111) e Iyobe et al(1974)(112). Es preciso añadir que TEM-1 y TEM-2 están determinados por transposones que pueden integrarse en el cromosoma bacteriano.

Dado que en la mayoría de las bacterias gram negativas resistentes a ampicilina, el plasmido que media la betalactamasa TEM-1 es el mas frecuente(113),no es extraño que en nuestro trabajo encontremos que dos cepas de estas posean una betalactamasa tipo TEM-1. Si partimos de la base de que esta betalactamasa posee una insignificante actividad sobre cefotaxima, ceftazidima o aztreonam, apoyará nuestra idea de que la responsabilidad de la resistencia a cefotaxima, asi como a otras cefalosporinas indicadas en el trabajo estan en las betalactamasas asociada a un pI de 7.85 en el caso de la cepa HU13, o 7.7.en el caso de la HU25. Nuestros resultados no coinciden con los presentados por Sanders et al (1988)(114), en cuanto a la distribucion de las bandas pertenecientes a los puntos isoelectricos, si bien si lo hacen con los mostrados por Matthew y Harris (1976)(115).

INDUCCION DE BETALACTAMASAS EN PLASMA

La ultima parte de nuestro trabajo consistia en conocer si la induccion de esas cepas por los antibioticos que eran capaz de producirla in vitro con caldos de crecimiento bacterianos usuales podia equipararse a la producida en plasma, por lo evidente de su aplicacion a la clinica y porque quizá estabamos minusvalorando la capacidad inductiva de determinados antibioticos, sobre todo al conocer las graves infecciones que causa *P.aeruginosa* (83,116).

También era esperable que efectos subinhibitorios en fluidos biologicos pudieran afectar de algun modo el comportamiento inductivo de los antibioticos sobre las bacterias(117).

Nuestros resultados mostraron que la produccion de enzima betalactamasa bajo concentraciones subinhibitorias de imipenem y azlocilina eran en general inferiores a las encontradas con nutrientes bacterianos comunes.

Tanto azlocilina, como imipenem mostraron unos resultados muy similares. La cepa que produjo una mayor cantidad de enzima fue la HU13, seguida de la HU25. Es notable que aunque con imipenem la induccion era algo superior a azlocilina la similitud entre ambas era notoriamente diferente a la encontrada sin utilizar plasma como medio de crecimiento e induccion. La induccion, sin embargo ,existe y por lo tanto es esperable en condiciones "in vivo" en sujetos que presenten infecciones por *P.aeruginosa* y reciban antibioticos como cefoxitina, imipenem, o en nuestro caso azlocilina. Dado que en este caso existe una similitud bastante consistente con las experiencias realizadas anteriormente, podemos pensar que de nuevo las betalactamasas tipo I(118) determinadas cromosomicamente son las responsables de esta actividad in plasma.

Nuestros resultados coinciden con los presentados por otros autores, como Letendre y Turgeon (1989) (119), en los que se evidencian que la producción enzimática de betalactamasa en fluidos biológicos, como plasma es menor a la que acontece en medio de Mueller-Hinton. No obstante, habría que tener presente al mismo tiempo, como recalca Dalhoff y Cullmann (1984) (120) que puede existir una inducción no específica determinada por esos medios biológicos, como ponen de relieve en su trabajo. Además habría que considerar que sustancias como a. folico, tiamina, o triptofano pueden exhibir una potencia comparable a la cefoxitina (121).

Evidentemente nuestros resultados sugieren que posiblemente exista una sobreestimación de la producción de betalactamasa. De cualquier modo el proceso in vivo es tan sumamente dinámico que probablemente existan otros factores aparte de los enumerados que maten la hidrólisis del antibiótico por la betalactamasa o la propia actividad del este enzima.

CONCLUSIONES

1. Un 20% de las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas fueron productoras de betalactamasas. Un 12% eran fuertemente positivas según los parámetros establecidos en el estudio.

2. La cepa que más actividad betalactamasa presentó fue la HU22, una mutante cromosómica desreprimida altamente resistente a los antibióticos que se probaron.

3. Los antibióticos más activos de los estudiados frente a las 33 cepas fueron Imipenem y Ceftazidima (CMI50: 2 ug/ml y CMI90: 4 ugr/ml), seguidos de Cefotaxima y Moxalactam (CMI50: 16 ugr/ml y CMI90: 32 ugr/ml) y Cefoperazona y Azlocilina (CMI50: 4 ugr/ml y CMI90: 128-256 ugr/ml).

4. Todos los antibióticos betalactámicos estudiados presentaron una cierta capacidad inductora de betalactamasa, pero solo fue estadísticamente significativa en el caso de imipenem, el inductor más potente y azlocilina.

5. Cefoxitina e Imipenem actuaron como inductores de la producción de betalactamasa en todas las cepas, salvo la HU22.

6. Azlocilina actuó como inductor de la producción de betalactamasa en las cepas 13 y 25.

7. No se detectó inducción de betalactamasas por cefoperazona para ninguna de las cepas estudiadas.

8. Las cepas HU3, 22 y 25 mostraron un patrón de p. Isoeléctrico de betalactamasas similar, con betalactamasas cromosómicas inducibles por cefoxitina tipo Id en el caso de HU3 y 25 y no inducible por ser mutante en el caso de HU22.

9 .La cepa HU13 presentó una betalactamasa cromosomica inducible de p.I alto 7, 85 del tipo Id.

10.Las betalactamasas cromosomicas inducibles de nuestro estudio son responsables de la resistencia a cefotaxima.

11.Las cepas HU3,13 y 25 presentan un patrón de sensibilidad antibiotica similar debido a la existencia de betalactamasas inducibles y de betalactamasas plasmidicas tipo TEM(clase IIIa).

12.La inducción de betalactamasa con SUBCMI de Imipenem y Azlocilina en plasma para las cuatro cepas de *P.aeruginosa* estudiadas fue superior a la producción basal de betalactamasa pero inferior a la encontrada en fluidos no biologicos.

BIBLIOGRAFIA

1. Lennete, E.H., Spaulding, E.H., and Tryant, J.P. "Manual of Clinical Microbiology". p.250.2a Ed. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 1974.

2. Doggett, R.G., "Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*" pp.6-7. en *Pseudomonas aeruginosa: Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy*. Academic press. New York. 1979.

3. Sonnenwirth, A.C., "Pseudomonas y Otros Bacilos No Fermentativos" pp 552-553. en Davis, B.D., et al., *Tratado de Microbiologia*. Ed. Salvat. 3a. Ed. Barcelona. 1984

4. Cicmanec, J.F., Holder, I.A., "Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in Normal and Burned Skin Extract: Role of Extracelular Proteases" *Infect. Immun.*;25: 477. 1979.

5. Ianini P.B., Claffey, T., Quintiliani, R., "Bacteremic *Pseudomonas* Pneumonia". *JAMA*. 230:558, 1974.

6. Gifford D.B., Patzakis, M., Ivler D., et al. "Septic Arthritis due to *Pseudomonas*, in heroin addicts". *J. Bone Joint Surg.* 57A:631. 1975.

7. DeJongh C.A., Joshi J.H., Newman, K.A., et al. "Antibiotic Synergism and Response in Gram Negative Bacteriemia in Granulocitopenic Cancer Patients". *Am. J. Med.* 80(Suppl 5c):96. 1986.

8. Benedict, R.G. and Langlykke, A.F.: "Antibiotic Activity of *Bacillus polymyxa*". J. Bact. 54: 24-25. 1947.

9. Koyama, Y., Kurosasa, A., Tsuchiya, A., and Takakuta, K.: "A New Colistin Produced by Spore-Forming Soil Bacteria". J. Antibiotics. 3: 457-458. 1949-50.

10. Acred P., Brown, D.M., Knudsen, E.T., Rolinson, G.N. and Sutherland, R: New semisynthetic penicillin active against *P. pyocyanea*. Nature, 215: 25-30 .1967.

11. Meyer, R.D., Young, L.S and Armstrong, D: Tobramycin (nebramycin factor 6) in vitro activity against *P. aeruginosa*. Appl. Microbiol. 22: 1147-1151 1971 .

12. Stewart, D and Bodey , G.P: Azlocillin: in vitro studies of a new semisynthetic penicillin. Antimicrob. Agents. Chemother. 11: 865-870. 1977

13. Kropp, H., Kahan JS., Kahan FM., Sundelof, J., Darland, G. and Birbaum, J.: Thienamycin. A new beta-lactam antibiotic. II. In vitro and in vivo evaluation. 16th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents. Chemother. , Program and Abstracts, No 228. 1976.

14. Reynolds, H.Y. and Fick R.B. : *P.aeruginosa* pulmonary Infections (Emphasizing Nosocomial Pneumonia and Respiratory Infections in Cystic Fibrosis) pp 71-89. en *Pseudomonas aeruginosa*. Ed.LD.Sabath. Hans Huber Publishers, Berna. 1980.
15. Bush, K.Sykes, R.B.: Interaction of beta-lactam antibiotics with beta-lactamases as a cause for resistance. pp 1-31. En *Antimicrobial Drug Resistance*, Ed. L.E Bryan. Academic Press, Inc. New York. 1984.
16. Nordstrom, K., Sykes, R.: Inductions Kinetics of beta-lactamase biosynthesis in *P.aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 6 : 734-74). 1974.
17. Saino, Y. Kobayashi, F. Inone, M., Mitsuhashi, S.: Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *P.maltophilia*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 22. 564-570. 1982.
18. Abraham, E.P., and Chain E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 146:837. London. 1940.
19. Williams, R.J. Betalactamase resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 3: 754-56. 1990.

20. Richmond ,MH and Sykes RB. The beta-lactamase of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv. Microb. Physiology. 9:31-88. 1973.

21. Sykes, RB and Matthew, M. The beta-lactamases of Gram Negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. J. Antimicrobial. Chemother. 2:115-157. 1976.

22. Bushk, K. Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future. Rev. Infect. Dis. 10:681-690. 1988.

23. Bush, K. Characterization of beta-lactamases. Ant. Agents Chemother. Vol 33, n. 3. 259-263. 1989

24. Bush, K Classification of beta-lactamases: Group 1, 2a, 2b and 2b. Ant. Agents Chemother. Vol 33, n. 3. 264-270. 1989

25. Bush, K Classification of beta-lactamases: Group 2c, 2d, 2e, 3 and 4. Ant. Agents Chemother. Vol 33, n. 3. 271-276. 1989.

26. Furth, A. The beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*. pp: 403-428. En *Beta-lactamases*. Ed. por JM. Hamilton-Miller y JT. Smith. Academic Press. London. 1979.

27. Tausk, F., Evans ME., Patterson, LS., Federspiel, CF and Stratton CW. Imipenem induced resistance to antipseudomonall B-lactams in *P. aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 28. 41-45. 1985.

28. Gallagher, PG; Watanakunadorn, C. *Pseudomonas* bacteriemia in a community teaching hospital, 1980-84. *Rev. Infect. Dis* , 11: 846-852. 1989.

29. Pollack, M . *Pseudomonas aeruginosa* pp: 1673-1691. en : *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Ed. G.L. Mandell, R.G. Douglas Jr y J.E. Bennet. 3 Ed. Churchill Livingstone. New York. 1990.

30. Moore, B; Forman , A. An outbreak of urinary *P. aeruginosa* infection acquired during urological operations. *Lancet.* 2: 929. 1966.

31. Reyes MP; Lerner AM.
Current problems in the treatment of infective endocarditis due to *P.aeruginosa*; a prospective comparative study.
Rev Infec Dis. 5:314. 1983.
32. Bodey GP; Jadeja L; Elting L.
Pseudomonas bacteriemia; retrospective analysis of 410 episodes.
Arch Inter. Med. 145:1621. 1985.
33. Cohen PS, Maguire JH, Weinstein L
Infective endocarditis caused by gramnegative bacteria: a review of the literature, 1945-1977.
Prog. Cardiovasc Dis. 22:205. 1980
34. Reynolds HY, Fick RB
P.aeruginosa pulmonary infections (emphasizing nosocomial pneumonia and respiratory infections in cystic fibrosis) pag:71 y sig.. En: Sabath LD ed. *P.aeruginosa: The Organism, Diseases it causes, and their Treatment.* Hans Hubers Publishers. Berna. 1980.
35. Center for Disease Control Nosocomial Infection
Surveillance 1980-82. En CDC Surveillance Summaries
32:155(N.455). 1983
36. Teplitz C.
Pathogenesis of Pseudomonal vasculitis and septic lesions.
Arch. Pathol. 80:297. 1965

37. Armstrong JH, Zacarias F, Rein MF
Ophthalmia neonatorum: a chart review
Pediatrics.57: 884. 1976

38. Forkner CE
Pseudomonas aeruginosa Infections
Grune & Stratton. New York. 43. 1960

39. Schimpf SC, Moody M, Young VM
Relationship of colonization with P.aeruginosa to development
of Pseudomonal bacteriemia in cancer patients.p.240 y siguientes
En Hobby GL Ed. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American
Society for Microbiology. Washinton DC.1971.

40. Culbertson GR, McManus AT, Conarro FA et al.
Clinical Trial of Imipenem cilastatin in severly burned and
infected patients.
Surg. Gynecol. Obstet.165:25. 1987

41. Hall JH, Callaway JL, Tindall JF et al.
P.aeruginosa in dermatology.
Arch.Dermatol. 97:312.1968

42. Eaglstein NF, Marley WM, Marley NF et al.
Gram-negative bacterial toe web infection: successful treatment
with a new third generation cephalosporin.
J Am Acad Dermatol. 8:225.1983

43. Price KE, Pirsiano TA, De Furia MD, Wright GE
Activity of Amikacin against clinical isolates resistant to one or more aminoglycoside antibiotics.
Antimicrob. Agents. Chemother. 5:143-152. 1974.

44. Simon, C; Stille W y Perea, EJ
Infecciones por bacterias patógenas y oportunistas. Infecciones por *Pseudomonas*, pag 351, en Manual de Terapéutica Antimicrobiana. Salvat. Barcelona. 1987.

45. Giamerellou H, Zissis NF y Bouzos J
In vitro synergistic activities of aminoglycosides and new beta lactams against multidrug resistant *P. aeruginosa*.
Antimicrob. Agents. Chemother. 25:535-536. 1984.

46. Slack, J. PE.
Antipseudomonal beta-lactams.
J. Antimicrob. Chemother. 8:165-170. 1981

47. Kahan JS, Kahan FM, Goegleman R et al.
Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. 1. Discovery, isolation and physical properties.
J. Antibiot. 32:1-12. 1979

48. Norris S. Mandell GL.
The Quinolones: History and overview. pages 1-22. En Andriole VT Ed. The Quinolones. Academic Press. London. 1988

49. Gilardi GL. Characterization of non fermentative nonfastidious gram negative bacteria encountered in medical bacteriology. J. Appl. Bacteriol. 34:623-644. 1971.

50. Gilardi GL
Pseudomonas. pp442-469. En Manual de Microbiologia Clinica. Lennette EH, ed. Panamericana. 4a Ed. Buenos aires. 1987.

51. Matthew, M; Harris A, Marshall J and Ross GW
The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of betalactamases. J. Gen. Microbiol. 88:169-178. 1975.

52. Nogales MC y Perea EJ
Fundamentos del tratamiento antimicrobiano pp 263-306 En : Perea, EJ. Enfermedades Infecciosas. Patogenesis y Diagnostico. Salvat ed. Barcelona. 1983 .

53. Barry AL
Agar dilutions techniques. pp 76-92 En Barry AL ed. The antimicrobial susceptibility test : principles and practises. Philadelphia Lea and Febiger. 1976

54. Washinton II JA., Barry AL. Dilution test procedures. pp410-418
En Lennette EM, Spaulding EH and Truant J. Manual of Clinical
Microbiology. Washington DC. American Society for Microbiology.
1974.

55. Steers E, Foltz EL y Graves G
An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial
susceptibility to antibiotic.
Antibio. Chemother. 9:307-311. 1959.

56. Thrupp LD.
Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. pp 73-113.
En Lorian V ed. Antibiotics in laboratory Medicine. Williams and
Wilkins. Baltimore. 1980.

57. O'Callaghan CH, A Morris, SM Kirby and AH Shingler
Novel Method for detection of beta-lactamases by using a chromo-
genic cephalosporin substrate.
Antimicrob. Agents. Chemother. 1:283-288. 1972.

58. Vecoli, C, Prevost FE, Ververis JJ, Medeiros AA y O'Leary Jr, GP
Comparison of Polyacrylamide and agarose gel Thin-layer
isoelectric focusing for the characterization of
beta-lactamases.
Antimicrob. Agents. Chemother. 24. N. 2: 186-189 1983

59.**.O,Cahllaghan CH,Acred F,Harper FBM,Ryan DM,Kirby SM,Hardine SM:GR 20263 , a new broad-spectrum cephalosporin with antipseudomonal activity.
Antimicrob.Agents.Chemother.17:876-883.1980.

60.Broad DF and Smith JT
Extraction and purification of antibiotic destroying enzymes.pp 93 -94. En Antibiotics:Assesment of Antimicrobial Activity and Resistance.Ed A.Denver Rusell and L.B.Quesnel.Technical Series.N.18. Society for Aplied Bacteriology.Academic Press.London.1983

61.Simpson IN and James M
Comparison of routine techniques for cell breakage and release of betalactamase activity.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy,9.119-123.1982

62.**.Holt,J et al.
Quantification of betalactamase activity
pp 128-131, en Antibiotics:Assesment of Antimicrobial Activity and Resistance. Ed. A.Denver Rusell and L B.Quesnel.
Tecchnical Series n.18.Society for Aplied Bacteriology.
Academic Press.London.1983

63.Bush K and Sykes RB. Methodology for the Study of Beta-lactamse
Antimicrob.Agents.Chemother.30,N 1. 6-10. 1986

64. Sanders CC and WE Sanders Jr.
Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin inducible betalactamases.
Antimicrob. Agenst. Chemother. 15:792-797. 1979.
65. Huovinen, S
Rapid Isoelectric Focusing of Plasmid-Mediated Betalactamases with Pharmacia Phastsystem
Antimicrobial Agents Chemother. Vol 32, n. 11. pp1730-32. 1988
66. Bauer, AW; Kirby WM; Sherris JC y Turck M
Antibiotic Susceptibility Testing by a standardized single disc method.
Am. J. Clin. Path., 45. 493-496. 1966 therapy of *P. aeruginosa*
67. Ericsson HM; y Sherris JC
Antibiotic sensitivity testing. Report of international collaborative Study.
Act. Pathol. Microbiol. Scand., Section B. Suppl 217. 1971.
68. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L
Infections caused by *P. aeruginosa*.
Reviews of Infectious Diseases. 5:279-313. 1983.

69. Medeiros AA, Hare R, Papa E, Adam C, Miller GH
Gram negative bacilli to third generation cephalosporins :
betalactamase characterization and susceptibility to Sc 34343.
J. Antimicrob. Chemother. 15. Suppl C. 119-132. 1985

70. Philippon A, Thabaut A, Meyran M, Nevot P
Distribution des betalactamases constitutives ches
P. aeruginosa. Presse Med. 13, pp772-776. 1984

71. Jones, RN
Review of the in vitro spectrum of activity of imipenem.
Am J Med. 78 Suppl 6A: 22-23. 1985

72. Neu HC.
Carbapenems: Special properties contributing to their activity.
Am. J. Med. 78. Suppl 6A. 33-40. 1985

73. Richards DM and Brogden RN.
Ceftazidime: A review of its antibacterial activity,
pharmacokinetics properties and therapeutic use.
Drugs, 29: 105-61. 1985

74. Wiedemann B, Machka K, Malottke R
Multicenter Study of the Sensivity of *P.aeruginosa* to
antimicrobial agents.
European Journal of Clinical Microbiology. Vol 4. N. 2229-230.

75. Gomez, J ; Moldenhauer, F; Ruiz J et al
Valoracion de la monoterapia con ceftazidima en bacteriemias por
P.aeruginosa. estudio prospectivo.
Medicina Clinica. Vol 93. N. 7: 249-251. 1989.

76. Bragman S, Sage R, Booth L, Noone P
Ceftazidime in the treatment of serious *P.aeruginosa* sepsis.
Scand. J. Infect. Dis. 18: 425-29. 1985

77. Bauerfeind A.
An evaluation of the activity of cephalosporins against
P.aeruginosa.
J. Antimicrob. Chemother. 8. Suppl B. 111-117. 1981

78. Lynch, MJ; Drusano GL and Mobley LT
Emergence of Resistance to Imipenem in *P.aeruginosa*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 31 N. 12. 1892-96. 1987

79. Livermore DM and Yang YJ
Betalactamase Lability and Inducer Power of Newer B-lactam Antibiotics in Relation to their activity against betalactamase inducibility mutants of *P.aeruginosa*.
The Journal of Infectious Diseases.vol 155,n.4 pp 775-782.1987
80. Fung-Tomc J, Huczko E, Pearce M and Kessler RE
Frecuency of in vitro resistance of *P.aeruginosa* to Cefepime, ceftazidime and Cefotaxime.
Ant.Agents.Chemother.6.471-77.1980.
81. Labia R, Morand A, Ben Yaghlane H
Mecanismos de resistance a l'azlocilline chez *P.aeruginosa*.
Presse Méd.13.pp 777-779.1984
82. Perea EJ, Nogales MC, Aznar J, Martin E, Garcia Iglesias MC
Sinergy between cefotaxima, cefsulodin, azlocillin, mezlocillin and aminoglycosides against carbenicillin resistant or sensitive *P.aeruginosa*. J Antimicrob.Chemother. 6. 471-477.1980
83. Jimenez-Lucho VE, Saravolatz LD, Medediros AA and Pohlod D.
Failure of Therapy in *Pseudomonas* Endocarditis: selection of resistant mutants.
The Journal of Infectious Diseases, 154:64-68.1986
84. Büscher KH, Cullman W, Dick W and Wolfgang O.
Imipenem resistance in *P.aeruginosa* resulting from disminished expression of an outer membrane protein.
Ant.Agenst.Chemother.31:703-708.1987.

85. Nordström K and Sykes R
Effects of sublethal concentrations of benzylpenicillin on *P.aeruginosa*. *Ant Agents Chemother.* 6: 741-746. 1974
86. Aronoff SC and Shlaes DM
Factors that influence the evolution of betalactam resistance in betalactamase inducible strains of *Enterobacter cloacae* and *P.aeruginosa*.
The Journal of Infectious Diseases. 155, N.5 936-941. 1987
87. Lorian V.
Effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. pp:343-408, en *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Williams and Wilkins. Baltimore. USA. 1980.
88. Lorian V, Atkinson BA and Amaral L.
Effects of subminimum inhibitory concentration of antibiotics on *P.aeruginosa*; the MIC/MAC ratio, pp 193-205, en *P.aeruginosa, the Organism, Diseases It Causes and Their Treatment.* Ed. LD Sabath. Hans Huber Publishers. Berna. 1980.
89. Godfrey AJ and Bryan LE.
Resistance of *P.aeruginosa* to New betalactamase resistant beta-lactams.
Ant. Agents. Chemother. 26, N.4. 485-488. 1984.

90. Sanders WE, Jr and Sanders CC.
Inducible betalactamases: clinical and epidemiologic implications
for use of newer cephalosporins.
Rev. Infectious Diseases. vol 10.n.4.830-38.1988.

91. Bush, K
Recent development in betalactamase research and their
implications for the future.
Rev. Infect. Dis. vol 10.n.4.681-690.1988

92. Wiedemann B, Kliebe C and Kresken M
The epidemiology of betalactamases
Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 24, suppl B. pp 1-22.1989.

93. Rolinson GN.
Betalactamase induction and resistance to betalactam antibiotics
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 23. pp1-5.1989

94. Bush, K
Excitement in the betalactamase arena
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 24.831-840.1989

95. Sabath L, Jago M, and Abraham EP
Cephalosporinase and Penicillinase activities of a betalactamase
from *Pseudomonas pyocyanea*. Biochem. J., 96:739-752. 1965.

96.Livermore DM
Class I beta-lactamase expression in *P.aeruginosa* and
Cephalosporin resistance.Lancet i pp450-51.1986

97.Bertram MA and Young LS
Imipenem antagonism of the in vitro activity of piperacillin
against *P.aeruginosa*.
Antimicrob.Agents Chemother. 26:272-74.1984

98.Livermore DM
Significado clinico de la induccion y de la desrepression estable
de las betalactamasas de los bacilos gram negativos.
Rev.Esp.Microbiol.Clin.611-619.1988

99.Minami S,Yotsuji A, Inone M,Mitsuhashi S
Induction of Betalactamase by various betalactam antibiotics en
Enterobacter cloacae.
Ant.Agents.Chemother.18:382-85.1980

100.Okonogi K,Kuno M,Higaashide E
Induction of betalactamase in *Proteus vulgaris*.
Journal of General Microbiology.132:143-150.1986

101.Cullmann W and Dick W
Induction Potency of various betalactam derivatives in gram
negative rods.
Chemotherapy, 35; pp 43-53. 1989.

102.Perez Bacalbao,I
Comparación de la capacidad de induccion de betalactamasas cromosomicas de la cefoxitina y otras cefalosporinas.
Microbiologia Clinica, vol 6;n.3.131-34. 1991.

103.Drigues F,Lanau C, Combes T,Roche G y Salhi A
Etude de l'induction de betalactamase chez P.aeruginosa par le cefpiramide et trois autres céphalosporines antipyocyaniques.
Path Biol.34,N.5. 419-423.1986

104.Williams JD
Activity of Imipenem against P.aeruginosa and Bacteroides species.
Review of Infectious Diseases 7 Suppl S417-425.1985

105.Livermore DM
Class I betalactamase expression in P.aeruginosa and cephalosporin resistance.
Lancet 1:450.1986

106.Phillips I
Betalactam induction and desrepression.
Lancet 1:801-806. 1986

107.Livermore DM.
Mechanisms responsible for multiple betalactam resistance following desrepression of betalactamases.
Rev.Infect.Dis.vol 10.n.4.744-45.1988

108.Livermore DM
Kinetics and significacance of the activity of the Sabath and Abrahams betalactamase of *P.aeruginosa* against cefotaxime and cefsulodin.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy,11.169-79. 1983

109.Fullbrook PD, Elson SW & Slocombe B
R Factor mediated betalactamase in *P.aeruginosa*
Nature 226:1054-6.1970

110.Labia R, Guionie M, Barthelemy M
Properties of three carbenicillin-hydrolysing betalactamases(CARB) from *P.aeruginosa*: identification of a new enzyme.Journal of Antimicrobial Chemotherapy 7,49-56.1981



111. Bryan LE, Van Den Elzen HM ,Tzeng JT.
Trasnferable drug resistance in *P.aeruginosa*.
Ant.Agents Chemother.1: 22-29.1972

112. Iyobe S, Hasuda K, Fuse A , Mitsuhashi S
Demostration of R-factors from *P.aeruginosa*.
Ant.Agents.Chemother 5:547-52. 1974.

113. Philippon A, Labia R, Jacoby G
Extended Spectrum betalactamases
Ant.Agents.Chemother. 1131-1136.1989

114. Sanders CC, Gates ML and Sanders WE, Jr
Heterogeneity of Class I betalactamase expression in Clinical
Isolates of *P.aeruginosa*
Ant.Agents.Chemother. 32,N 12.1893-95. 1988

115. Matthew M and Harris MA
Identification of betalactamases by analitical isoelectric
focusing:correlation with bacterial taxonomy.
J.Gen.Microbiol. 94.55-67.1976.

116. Bayer A.S, et al*
Bactericidal Interactions of a betalactam and betalactamase inhibitors in Experimental *P.aeruginosa* endocarditis caused by a constitutive overproducer of type Id betalactamase.
*Ant.Agents.Chemother.*31: 1750-55. 1987

117. Bayer A.S et al.
Role of betalactamase in In vivo Development of ceftazidime resistance in Experimental *P.aeruginosa* endocarditis.
*Ant.Agents.Chemother.*31: 253-258.1987

118. Medeiros, A
Betalactamases.
British Medical Bulletin 40, N.1.18-27.1984

119. Letendre E, Turgeon P
production and Induction of betalactamase during Growth of *P.aeruginosa* in biological fluids.
Ant.Agenst.Chemother. 33, N.5.776-777. 1989

120. Dalhoff, A and Cullmann W
Specificity of Betalactamase induction in *P.aeruginosa*
*Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*14, 349-57.1984

121. Cullmann W, Dick W & Dalhoff A
Unespecific induction of betalactamase in *Enterobacter cloacae*.
Journal of Infectious Disease, 148:765.1983

UNIVERSIDAD DEL SAHARA

FRANCESCO CAMPA VACIYA

Efecto de las subcélulas de antibióticos sobre Pseudomonas aeruginosa

APTO "WM LAUDE"

17

SEPTIEMBRE

91

