

Original

Resistencia a carbapenemes por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

A. Sánchez, S. Salso, E. Culebras y J.J. Picazo

Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid

RESUMEN

La resistencia a los carbapenemes en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* ha aumentado considerablemente en los últimos años. *P. aeruginosa* posee diferentes mecanismos de resistencia a estos fármacos. Los más frecuentes son la sobreexpresión de bombas de expulsión activa y la disminución de la expresión de porinas de membrana OprD. No obstante, la aparición de metaloenzimas que pueden hidrolizar carbapenemes está cobrando cada vez más importancia. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de metalobeta-lactamasas en *P. aeruginosa* aislados de muestras clínicas, y para ello se seleccionaron 133 cepas con una CMI ≥ 4 mg/l para imipenem, meropenem o ambos. Se estudió la sensibilidad a diferentes antimicrobianos, siendo la tobramicina (26,3%) y la colistina (17,3%) los que presentaron un menor porcentaje de resistencias. Para evaluar la presencia de carbapenemasas se utilizaron dos métodos diferentes: la técnica del E-test® imipenem/imipenem + EDTA y la de difusión disco-placa, utilizando también EDTA como inhibidor de las carbapenemasas. Cuatro de las 133 cepas dieron positivo con las dos técnicas, y en ellas se detectaron genes tipo VIM.

Palabras clave: Carbapenemes - Metaloenzimas - *Pseudomonas aeruginosa* - Resistencias

Carbapenem resistance determined by metalloenzymes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

Carbapenem resistance in clinical isolates of *P. aeruginosa* has risen notably in recent years. *P. aeruginosa* has different mechanisms for carbapenem resistance, such as decreased levels of OprD or overexpression of the MexAB-OprM efflux system. Also, the emergence of metallo-beta-lactamases (MBL)-producing bacteria is becoming a severe therapeutic problem. The aim of this study was to determine MBL presence in clinical isolates of *P. aeruginosa*: 133 with MIC ≥ 4 mg/l for imipenem and/or meropenem were selected. We studied the sensitivity to different antibiotics in these strains. Tobramycin (26.3%) and colistin (17.3%) were the most active antibiotics. To determine the presence of MBL, we used the E-test® with imipenem/imipenem plus EDTA and disk-agar diffusion, also using EDTA as an MBL inhibitor. As a result of the screening test to evaluate the presence of MBL, we obtained four out of 133 strains as probable producers of metalloenzyme. These four strains were positive for the VIM-like gene as determined by a polymerase chain reaction method.

Key words: Carbapenems - Metalloenzymes - *Pseudomonas aeruginosa* - Resistance

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas de la terapéutica actual. Una de las especies bacterianas que más preocupa en este aspecto es *Pseudomonas aeruginosa* (1), pues presenta diversos mecanismos de resistencia, así como una elevada capacidad para adquirir nuevas formas de resistencia, bien por mutaciones o mediante adquisición de nuevos genes. Además, *P. aeruginosa* es causa frecuente de infección, principalmente nosocomial. El número de cepas multirresistentes ha experimentado un notable aumento en los últimos años, y ello ha hecho que se rescaten antibióticos, como la colistina, que se dejaron de utilizar hace años por problemas de toxicidad, ya que en muchas ocasiones constituyen la única opción de tratamiento (2).

Los carbapenemes, imipenem y meropenem, son antibióticos con un amplio espectro de actividad, pero ya se han descrito resistencias, principalmente en bacilos gramnegativos no fermentadores, pero también entre las enterobacterias (3, 4).

La reducción de porinas OprD y la sobreexpresión de bombas de expulsión activa MexAB-OprM son los más frecuentes mecanismos de resistencia a los carbapenemes, pero no los únicos (5, 6). Por el momento las carbapenemasas no están muy extendidas, pero constituyen un mecanismo de resistencia importante debido a que están localizadas en elementos móviles, los integrones de clase I, y tienen una transmisión horizontal. Habitualmente estos integrones contienen también casetes de resistencia a los aminoglucósidos.

Las carbapenemasas son metaloenzimas (7, 8) que pueden hidrolizar a todos los betalactámicos excepto el aztreonam. Según la clasificación de Ambler (7) se pueden estructurar en tres grupos: clase A (grupo 2f de Bush-Jacoby-Medeiros) (9), dependientes de serina e inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico, inducibles, no transferibles; clase B (grupo 3 de Bush-Jacoby-Medeiros), dependientes de zinc, inhibidas por EDTA, inducibles o asociadas a plásmidos conjugativos; y clase C, oxacilinasas.

La primera metaloenzima de tipo VIM (clase B) de la cual se tiene constancia se detectó en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* en Verona (Italia) en 1997 (10). Se la denominó VIM-1. Posteriormente se identificaron variantes de esta primera VIM en Marsella (Francia), Grecia (11), Corea, Turquía, Portugal (12), Japón (13) y diferentes países de América del Sur (14). En España se describieron por primera vez en el Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau de Barcelona (15), en un estudio realizado entre 1996 y 2001; fue una metalobetalactamasa de tipo VIM-2 y estaba codificada por un integrón de clase I en un plásmido.

En cuanto a la prevalencia de *P. aeruginosa* portadoras de genes de metaloenzimas de tipo VIM (16), se habla del 20% en cepas procedentes de pacientes hospitalizados (17). Las dificultades en su detección, así como la localización de estos genes en elementos móviles tales como los integrones, facilitan la expansión de estos elementos de resistencia, lo que supone un importante reto a la terapéutica antimicrobiana actual. Por este motivo nos planteamos el estudio de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes en nuestro hospital, con el fin de estudiar su patrón de sensibilidad antibiótica y la presencia de genes tipo VIM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de cepas y estudio de la sensibilidad

Seleccionamos las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas que fueran resistentes a imipenem, meropenem o ambos por los sistemas automatizados Vitek® 2 (Hinton bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) y Wider® (Dade Behring Microscan, West Sacramento, EE.UU.). También seleccionamos las cepas con CMI = 4. El periodo de selección de cepas fue de agosto de 2003 a agosto de 2004. En total se seleccionaron 133 cepas. Se incluyeron cepas de un mismo paciente cuando presentaron diferente patrón de sensibilidad antibiótica.

En todas estas cepas estudiamos la sensibilidad a betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y carbapenemes mediante los sistemas automatizados (Vitek® 2), y a aztreonam, colistina y fosfomicina mediante *E-test*® (AB Biodisk, Solna, Suecia), siguiendo los criterios establecidos por el NCCLS (18).

Valoración de la presencia de metalobetalactamasas

Utilizamos dos técnicas para evaluar la presencia de metaloenzimas:

- *E-test*® de imipenem (IP)/imipenem + EDTA (IPI) (19) en una placa de agar Mueller-Hinton (bioMérieux) inoculada con una dilución de 0,5 en la escala de McFarland. Incubamos a 37 °C durante 24 horas. Se considera la presencia de metalobetalactamasas cuando CMI IP/CMI IPI ≥ 8. Consideramos CMI IP/CMI IPI ≥ 5 debido a experiencias previas en nuestro hospital.
- Difusión en disco. Colocamos dos discos de imipenem (10 µg) y dos de meropenem (10 µg) (Mast Diagnosis –

Masta Group Ltd., Merseyside, Reino Unido) en una placa de agar Mueller-Hinton inoculada con una dilución de cada cepa de 0,5 en la escala de McFarland. Añadimos 10 µl de EDTA 0,5 M sobre uno de los discos de imipenem, otro de meropenem y un disco vacío que servía de control de la nula actividad del EDTA en el crecimiento de las cepas. Incubamos a 37 °C durante 24 horas (20).

Empleamos una segunda difusión en disco colocando dos discos de ceftazidima (30 µg) separados una distancia de 4 cm. Entre ellos, a 1-2,5 cm de uno de los discos, colocamos un disco con una carga de 10 µl de EDTA 0,5 M. Incubamos 24 horas a 37 °C (21).

Obtención del DNA

Para la extracción del DNA recurrimos a una técnica comercial, las columnas *Ultra Clean microbial genomic DNA isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc., CA, EE.UU.).

Reacción en cadena de la polimerasa

Utilizamos los iniciadores descritos por Nordmann y Poirel (7) para determinar si las metaloenzimas eran de tipo VIM:

- VIM-B: 5' - atg gtg ttt ggt cgc ata tc - 3'
- VIM-F: 5' - tgg gcc att cag cca gat c - 3'

Las condiciones de la PCR consistieron (22) en un ciclo de cinco minutos a 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, de 40 segundos a 52 °C y de 50 segundos a 72 °C, y finalmente seis minutos a 72 °C. La PCR se llevó a cabo en el termociclador *Perkin-Elmes Cetus 9600* (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Purificación del producto de la PCR

Cuando como resultado de la PCR se obtuvieron varios fragmentos, recurrimos a purificar el fragmento del tamaño adecuado de agarosa de bajo punto de fusión mediante extracción con disolventes (23). Con el DNA purificado obtenido repetimos la PCR en las mismas condiciones descritas.

RESULTADOS

Selección de cepas y estudio de sensibilidad

De las 133 cepas seleccionadas, 109 (82%) fueron resistentes a ambos carbapenemes, 23 (17,3%) fueron resistentes sólo al imipenem y una (0,75%) fue resistente sólo al meropenem. Entre las 109 resistentes a ambos carbapenemes, la CMI de imipenem fue mayor que la de meropenem en 50 (45,8%) cepas, 53 (39,8%) tuvieron la misma CMI para ambos, y seis (5,4%) presentaron una CMI de imipenem menor que la de meropenem.

Los porcentajes de sensibilidad de las 133 cepas a diversos antibióticos se presentan en la Tabla 1, donde puede verse que los antibióticos más activos frente a estas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes fueron los aminoglucósidos, especialmente la tobramicina, y la colistina. El punto de corte elegido para la colistina fue de 4 mg/l (24).

Cincuenta y dos cepas (39%) fueron resistentes a alguno de los aminoglucósidos probados: 34 (25,5%) fueron resistentes a la gentamicina y la tobramicina, 17 (12,7%) sólo a la gentamicina (manteniendo la sensibilidad a la tobramicina) y una sola cepa (0,75%) fue resistente a la tobramicina y sensible a la gentamicina.

El antibiótico betalactámico más activo *in vitro* frente a estas cepas resistentes a los carbapenemes fue la asociación piperacilina-tazobactam (58,6%). De las 67 cepas resistentes

Tabla 1. Valores de sensibilidad de *P. aeruginosa* a diferentes antibióticos.

Antibiótico	Nº cepas sensibles	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	% cepas sensibles	Rango
Piperacilina	67	64	128	50,3	4-128
Piperacilina-tazobactam	78	64	128	58,6	4-128
Ceftazidima	55	16	32	50,3	1-64
Cefepima	66	8	32	49,6	1-64
Aztreonam	70	8	64	52,6	0,25-256
Ciprofloxacino	45	2	4	33,8	0,24-4
Levofloxacino	55	4	8	41,3	0,25-4
Gentamicina	82	4	16	61,6	1-16
Tobramicina	98	1	16	73,7	1-16
Colistina	110	4	8	82,7	0,5-16

tes a la piperacilina, 14 (21,2%) se hacen sensibles con la introducción del inhibidor de betalactamasas tazobactam.

En cuanto al aztreonam, mantiene su actividad frente al 52,6% de las cepas.

Valoración de la presencia de metalobetalactamasas

Como resultado de la búsqueda de metaloenzimas con las tiras de *E-test*[®] se hallaron cuatro cepas posibles productoras de metalobetalactamasas. Los cocientes CMI IP/ CMI IPI para las cuatro cepas fueron de 5,3. En las pruebas

de difusión disco-placa también se observó claramente la presencia de metalobetalactamasas en estas cuatro cepas, como puede verse en la Fig. 1.

Las CMI de estos cuatro aislamientos probables portadores de metaloenzimas para imipenem y meropenem fueron, respectivamente, 4-4, 4-4, 8-8 y 16-2 mg/l. Las cuatro cepas fueron sensibles a todos los betalactámicos probados, así como al aztreonam y las quinolonas. Con respecto a los aminoglucósidos, dos cepas fueron resistentes a la gentamicina y una a la tobramicina, manteniendo la sensibilidad a la gentamicina. Tres de las cuatro fueron resistentes a la colistina.

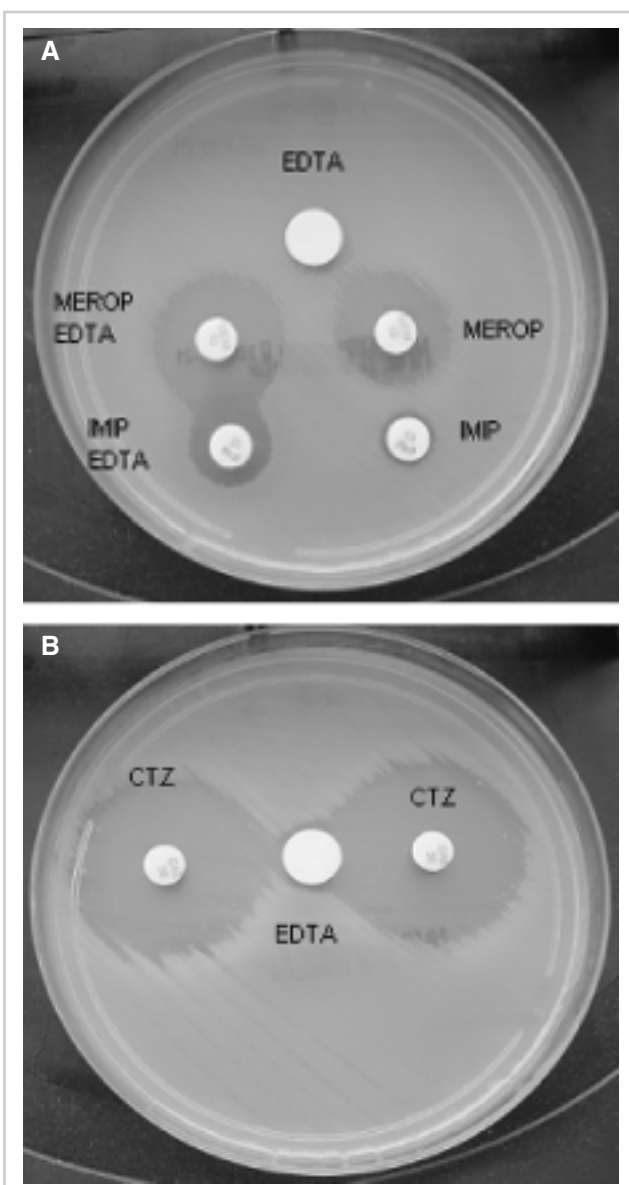


Figura 1. Efecto sinérgico del EDTA y los carbapenemes (A) o ceftazidima (B) en cepas de *P. aeruginosa* portadoras de metaloenzimas.

Reacción en cadena de la polimerasa

Las cuatro cepas probables portadoras de metalobetalactamasas amplificaron con los iniciadores descritos por Nordmann y Poirel para detectar genes tipo VIM. Como resultado de esta PCR se obtuvieron cuatro amplificados de 676 pb. Para la estimación del tamaño de las bandas obtenidas se emplearon marcadores de peso molecular de rango 100-1000 (Bio-Rab Laboratories).

DISCUSIÓN

P. aeruginosa es un importante patógeno por ser causa frecuente de infecciones, especialmente nosocomiales, así como por presentar una elevada resistencia intrínseca a los antibióticos y una gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, ya sea por mutaciones o por la adquisición de nuevos genes.

El estudio de sensibilidad que llevamos a cabo mostró que los antibióticos más activos frente a *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes fueron la tobramicina y la colistina.

El aztreonam, que no se ve afectado por la acción de las metaloenzimas, es el único también cuya actividad *in vitro* refleja su actividad *in vivo*. Por lo tanto, es el único betalactámico que, a dosis altas, resulta eficaz en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* productoras de metaloenzimas tipo VIM (25). El aztreonam mantiene su eficacia frente al 52,6% de las cepas resistentes a los carbapenemes.

El estudio de los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* es importante para una buena aproximación terapéutica, ya que no siempre se expresan fenotípicamente. En este caso, dos de las cuatro cepas portadoras de metalobetalactamasas tuvieron una CMI = 4 para ambos carbapenemes, dentro de los límites de sensibilidad establecidos por el NCCLS. Existe la posibilidad de que, *in vivo*, el tra-

tamiento con betalactámicos o carbapenemes suponga un fracaso terapéutico.

Las tiras de *E-test*® empleadas para la detección de metalobetalactamasas se basan en una disminución de la CMI de imipenem en presencia de EDTA, de al menos ocho veces. En nuestras cuatro cepas esta disminución fue de 5,3. Cabe la posibilidad de que la expresión de varios mecanismos de resistencia enmascare la presencia de la metaloenzima, disminuyendo la sensibilidad de la prueba.

A la vista de estos resultados, la incidencia de metaloenzimas de tipo VIM en *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes desde agosto de 2002 a agosto de 2003, en nuestro hospital, fue del 3%. Esta incidencia es bastante diferente a las que se hallan en otros hospitales europeos, ya que se habla de incidencias del 1% al 20% del total de *P. aeruginosa*, y hasta del 70% entre las *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes (16, 17). Probablemente estemos infravalorando la presencia de metaloenzimas.

BIBLIOGRAFÍA

- Livermore, D.M. *Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: Our worst nightmare?* Clin Infect Dis 2002; 34: 634-640.
- Stein, A., Raoult, D. *Colistin: An antimicrobial for the 21st century?* Clin Infect Dis 2002; 35: 901-902.
- Galani, I., Souli, M., Chryssouli, Z., Katsala, D., Giamarellou, H. *First identification of an Escherichia coli clinical isolate producing both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase IBC-1.* Clin Microbiol Infect 2004; 10: 757-760.
- Soulica, E.V., Neonakis, I.K., Gikas, A.I., Tselentis, Y.J. *Spread of bla(VIM-1)-producing E. coli in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene.* Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 167-172.
- Pai, H., Kim, J., Kim, J., Lee, J., Choe, K., Gotoh, N. *Carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 480-484.
- Vila, J., Marco, F. *Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores.* Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 20: 304-312.
- Nordmann, P., Poirer, L. *Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes.* Clin Microbiol Infect 2002; 65: 321-331.
- Livermore, D.M. *The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy.* Curr Opin Investig Drugs 2002; 3: 218-224.
- Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A. *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.* Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-1233.
- Laurettil, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A. *Cloning and characterization of bla-VIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1584-1590.
- Pournaras, S., Tsakris, A., Maniati, M., Tzouveleki, L.S., Maniatis, A.N. *Novel variant (VIM-4) in a clinical strain of Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 4026-4036.
- Cardoso, O., Leitao, R., Figueiredo, A. *Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from Portugal.* Microb Drug Resist 2002; 8: 93-97.
- Yatsuyagani, J., Saito, S., Harata, S. *Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene blaVIM-2 in Pseudomonas aeruginosa clinical strains isolated in Japan.* Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 626-628.
- Mendes, R.E., Castanheira, M., García, P. *First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.* Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1433-1434.
- Prats, G., Miró, E., Mirelis, B., Poirer, L., Bellais, S., Nordmann, P. *First isolation of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa in Spain.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 932-933.
- Luzzarro, F., Endimiani, A., Docquier, J.D. *Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa.* Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 131-135.
- Lagatolla, C., Tonin, E.A., Monti-Bragadin, C. *Endemic carbapenem resistant P. aeruginosa acquired metallo-beta-lactamase determinants in European Hospital.* Emerg Infect Dis 2004; 10: 535-538.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.* Document M100-S14, Wayne, PA 2004; 24: 1.
- Walsh, T.R., Bolmstrom, A., Qvarnstrom, A., Gales, A. *Evaluation of a new E-test for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing.* J Clin Microbiol 2002; 40: 2755-2759.
- Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K. *Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds.* J Clin Microbiol 2000; 38: 40-43.
- Lee, K., Lim, Y.S., Yong, J. *Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol 2003; 41: 4623-4629.
- Yan, J.Y., Hsueh, P., Ko, W. *Metallo-beta-lactamases in clinical Pseudomonas isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2224-2228.
- Sambrook, J. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York 2001.
- Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). *Recomendaciones de grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma.* Rev Esp Quimioterap 2000; 13: 73-86.
- Bellais, S., Mimoz, O., Lèotard, S. *Efficacy of betalactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase-producing strain of Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2032-2034.