

# **Antibióticos: resistencias a los antimicrobianos**

***Novedades del último año en Microbiología Clínica  
2008***

**Dr. Rafael Cantón  
Servicio de Microbiología  
Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid**



**Hospital Ramón y Cajal**



# Novedades, resistencias a los antimicrobianos – 2008

---

## ▪ SARM con sensibilidad disminuida a vancomicina

- aislados VISA / GISA y mecanismo asociado

*Howen et al. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:3755-62*

- pérdida de eficacia clínica de vancomicina en la bacteriemia por SARM con CMI para este antimicrobiano  $\geq 1,5 \mu\text{g/ml}$

*Soriano et al. Clin Infect Dis 2008; 46:193-200*

## ▪ Enterobacteriaceae con carbapenemasas

- emergencia de enterobacterias con carbapenemasa de **clase B** (metalo-beta-lactamasas, MBL) en España

*Tato et al. Clin infect Dis 2007; 45:1171-8*

- emergencia de enterobacterias con carbapenemasas de **clase A** (KPC) en el Reino Unido

*Woodford et al. J Antimicrob Chemother 2008; 62:1261-4*

# SARM con sensibilidad disminuida a vancomicina

---

## Antecedentes

- Alerta de la pérdida de actividad de vancomicina en infección por SARM:

- asociación con cepas VISA y con CMI de vancomicina  $>1 \mu\text{g/ml}$
- posible asociación con el desplazamiento de las CMI (*MIC creep*)

Appelbaum et al. Int J Antimicrob Agents 2007; 30:398-408

Sievert et al. Clin Infect Dis. 2008; 46:668-74

- La vancomicina podría no ser adecuada en el tratamiento ...

- empírico de la infección por SARM
- dirigido en infección por SARM con CMI a vancomicina  $>1 \mu\text{g/ml}$

Mensa et al. Rev Esp Quimioter 2008; 21:234-58

Gudiol et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27:105-15

# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 2008, p. 3755–3762  
0066-4804/08/\$08.00+0 doi:10.1128/AAC.01613-07  
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 52, No. 10

## Genomic Analysis Reveals a Point Mutation in the Two-Component Sensor Gene *graS* That Leads to Intermediate Vancomycin Resistance in Clinical *Staphylococcus aureus*<sup>▽</sup>

Benjamin P. Howden,<sup>1,2\*</sup> Timothy P. Stinear,<sup>1</sup> David L. Allen,<sup>1</sup> Paul D. R. Johnson,<sup>2</sup>  
Peter B. Ward,<sup>3</sup> and John K. Davies<sup>1</sup>

Australian Bacterial Pathogenesis Program, Department of Microbiology, Monash University, Wellington Rd., Clayton, Victoria, Australia,<sup>1</sup> and Infectious Diseases<sup>2</sup> and Microbiology<sup>3</sup> Departments, Austin Health, Heidelberg, Victoria, Australia

## Objetivos

- Comparación de los genomas de dos cepa isogénicas de SARM [sensible (CMI= 1 µg/ml) y con sensibilidad intermedia (CMI= 4 µg/ml)] obtenidas en un paciente tratado 42 días con vancomicina
- Análisis, mediante construcciones alélicas, de las mutaciones observadas en la cepa VISA (*vancomycin intermedidate S. aureus*)

# **SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina**

---

## **Resultados**

- PFGE y *spa*-typing (verificación de la clonalidad)
- Secuenciación de genomas (identificación de mutaciones)
- Búsqueda de mutaciones en genes identificados previamente en pares de cepas VSSA y hVISA/VISA
- Análisis de sensibilidad: microdilución (CLSI) y Etest
- Selección in vitro de cepas VISA a partir del aislado VSSA
- Construcción de mutantes:
  - subcultivos en caldo BHI-vancomicina 7 µg/ml y placas en gradiente
- Análisis de los mutantes:
  - introducción de mutaciones en la cepa VSSA
  - complementación en cepas VISA con mutacione

# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

## Resultados

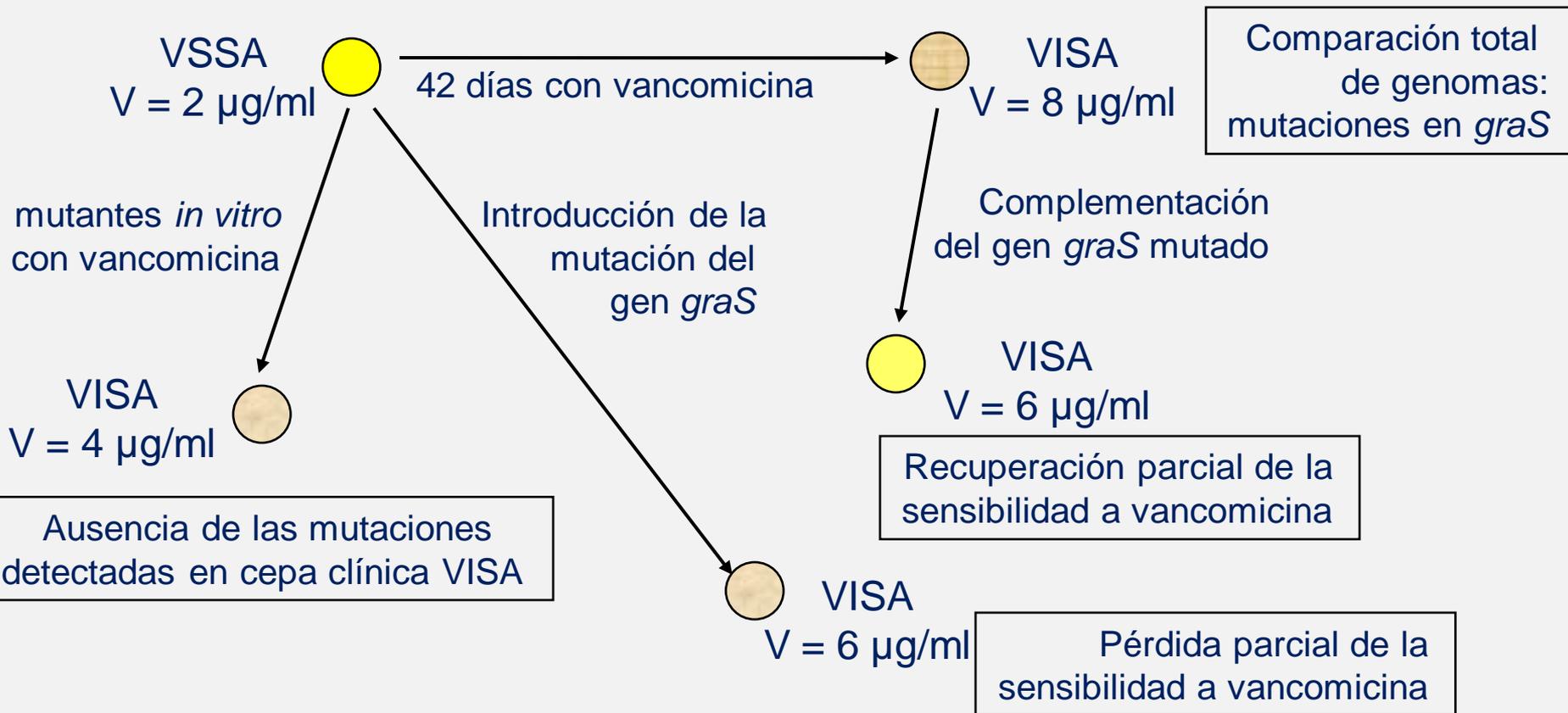
- Mutaciones encontradas (n= 6) en la cepa VISA isogénica

Mutation	Locus (SACOL)	Locus map (SACOL gene identification no.) <sup>a</sup>	Function of locus	Effect of mutation
C to T	SACOL0717		Sensor kinase, homologue of <i>graS</i>	T136I
G to A	SACOL0971		<i>rexA</i> , exonuclease	Synonymous
T to A	SACOL1694		<i>tgt</i> , queuine tRNA-ribosyltransferase	F365Y
C to T	SACOL2314		Sodium/bile acid symporter family protein	P128S; returns to SACOL sequence
G to A	SACOL2600		Hypothetical protein	G268D
C to T	Intergenic		NA <sup>b</sup>	NA

Gen *graS* del operon *graRS* que participa en la regulación de casi 250 genes, incluyendo transportadores ABC

# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

## Resultados (con valores de CMI por Etest)

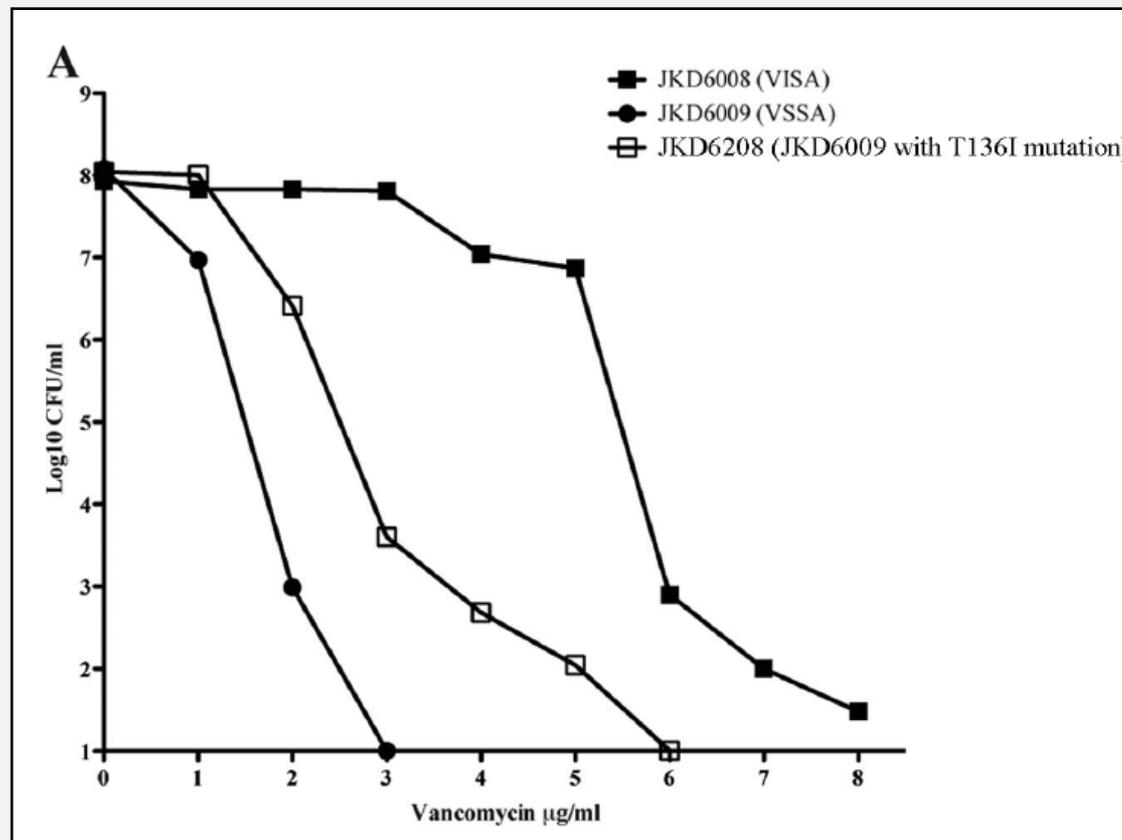


- Ausencia de las mutaciones encontradas en la cepa VISA clínica en otras cepas clínicas hVISA/VISA

# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

## Resultados

- Curvas de PAP (análisis poblacional) en las cepas clínicas VSSA y VISA y la construcción alélica (mutante) a partir de la cepa VSSA



# **SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina**

---

## **Conclusiones**

- La emergencia de cepas VISA se produce durante el tratamiento prolongado con vancomicina y se asocia con fracaso terapéutico
- Las mutaciones en el gen *graS* integrante del operon *graRS* que actúa en la regulación de más de 250 genes induce fenotipos VISA
- Otros genes, diferentes del *graS*, podrían también participar en el fenotipo VISA

# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

## Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia

Clinical Infectious Diseases 2008; 46:193–200

Alex Soriano,<sup>1</sup> Francesc Marco,<sup>2</sup> José A. Martínez,<sup>1</sup> Elena Pisos,<sup>1</sup> Manel Almela,<sup>2</sup> Veselka P. Dimova,<sup>2</sup> Dolores Alamo,<sup>2</sup> Mar Ortega,<sup>1</sup> Josefina Lopez,<sup>1</sup> and Josep Mensa<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Infectious Diseases and <sup>2</sup>Microbiology, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain

### Objetivo

- Evaluar si el incremento en el valor de la CMI de vancomicina en aislados SARM tiene influencia en la mortalidad asociada a la bacteriemia por este microorganismo

# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

## Material y métodos

- Estudio retrospectivo de 414 episodios de bacteriemia por SARM recogidos en el hospital Clínico de Barcelona entre 1991 y 2005
- Selección de un aislado por paciente. Correlación del valor de la CMI de vancomicina por Etest con diferentes variables:
  - edad, administración previa de vancomicina, uso de corticoides, predicción y origen de la bacteriemia, shock y mortalidad
- Diferenciación de 4 grupos:

tratamiento	no. pacientes	CMI
vancomicina*	38	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$
vancomicina*	90	$1,5 \mu\text{g/ml}$
vancomicina*	40	$>2 \mu\text{g/ml}$
inadecuado	246	--

\*tratamiento empírico

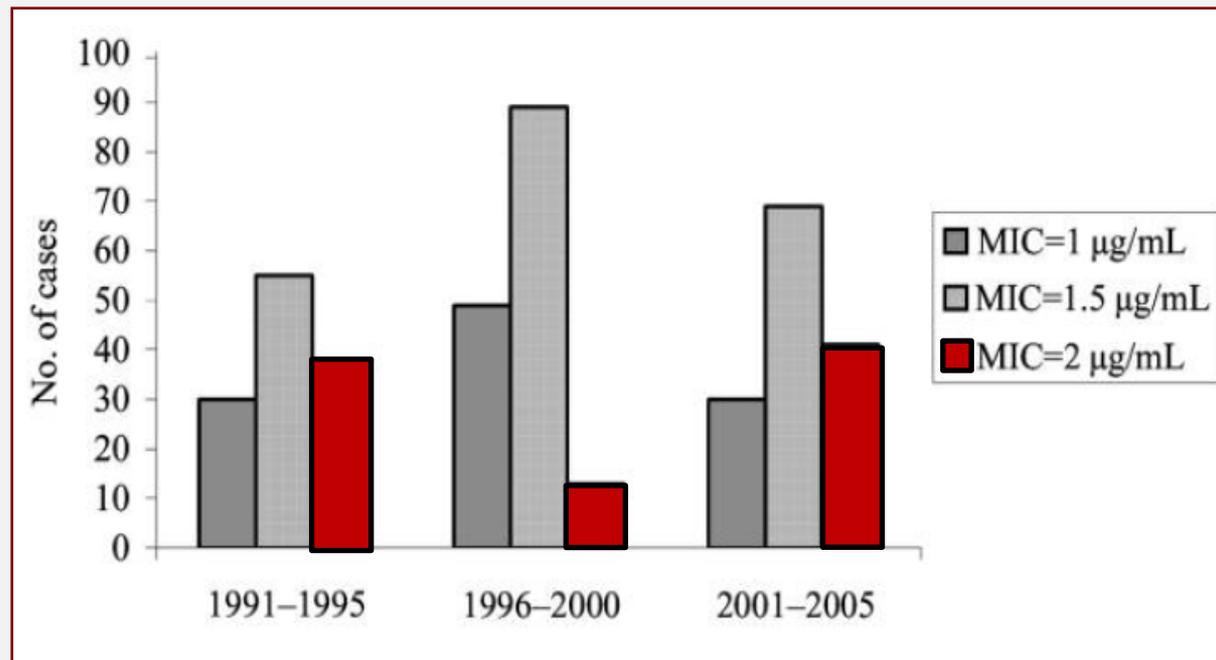
- Análisis univariante y multivariante



# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

## Resultados

- Casos de bacteriemia producidos por SARM (1991-2005) según el valor de la CMI de vancomicina



CMI (µg/ml)	% aislados
1	26,4
1,5	51,4
2	22,3

# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

---

## Resultados

- Ausencia de diferencias entre grupos de pacientes en función del valor de la CMI de vancomicina, incluida la mortalidad
- Mayor % de shock ( $p < 0.007$ ) en la bacteriemia por SARM con CMI menores de vancomicina:
  - 1  $\mu\text{g/ml}$ : 28,4%;                      - 1,5  $\mu\text{g/ml}$ : 19,9%                      - 2  $\mu\text{g/ml}$ : 10,8%
  - análisis univariante      asociación con la CMI de vancomicina
  - análisis multivariante      menor riesgo con CMI mayor de vancomicina
- Cepas con CMI mayores ( $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ) ...
  - engrosamiento de pared y reducción de su carácter autolítico
  - baja liberación de citocinas inflamatorias (a. teicoicos, lipoteicoicos)
  - menor tasa de crecimiento y expresión de genes de virulencia controlados por el operón *agr*



# SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina

## Resultados

- Mayor mortalidad en pacientes con tratamiento empírico:
  - inadecuado
  - vancomicina y aislados con CMI elevadas de vancomicina

Grupo tratamiento	CMI (µg/ml)	OR ( 95% IC )	P
vancomicina	1	1	
vancomicina	1,5	2,86 (0,87-9,35)	0,08
vancomicina	2	6,39 (1,68-24,3)	<0,001
inadecuado	--	3,62 (1,20 -10,9)	<0,001

## Conclusiones



La mortalidad asociada a la bacteriemia por SARM es significativamente más elevada al administrar un tratamiento empírico inadecuado o con vancomicina si el aislado tiene una CMI de vancomicina >1 µg/ml

# Novedades, resistencias a los antimicrobianos – 2008

---

## ▪ SARM con sensibilidad disminuida a vancomicina

- aislados VISA / GISA y mecanismo asociado

*Howen et al. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:3755-62*

- perdida de eficacia clínica de vancomicina en la bacteriemia por SARM con CMI para este antimicrobiano  $\geq 1,5 \mu\text{g/ml}$

*Soriano et al. Clin Infect Dis 2008; 46:193-200*

## ▪ Enterobacteriaceae con carbapenemasas

- emergencia de enterobacterias con carbapenemasa de **clase B** (metalo-beta-lactamasas, MBL) en España

*Tato et al. Clin infect Dis 2007; 45:1171-8*

- emergencia de enterobacterias con carbapenemasas de **clase A** (KPC) en el Reino Unido

*Woodford et al. J Antimicrob Chemother 2008; 62:1261-4*

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

---

## Antecedentes

- Aumento de cepas de Enterobacteriaceae con carbapenemasas
- Diferentes tipos de enzimas: carbapenemasas de clase A, B y D
- Variable distribución geográfica
  - rápida dispersión
  - ¡problema emergente en España!
- Dificultad de detección en el laboratorio
- Asociación con fracaso clínico (?)

Cornaglia et al. Int J Antimicrob Agents 2007; 29:380-8

Tato et al. Clin Infect Dis 2007; 47:1171-8

Queenan & Bush. Clin Microbiol Rev 2007; 20:440-58

Poirel et al. Future Microbiol 2007; 2:501-12

Walsh. Curr Opin Infect Dis 2009 ; 21:367-71

# Carbapenemasas adquiridas

Class	Enzyme	Hydrolysis profile					Inhibited by		Organisms
		AMP	TIC	CTX CAZ	ATM	IMP MER	CLAV	EDTA	
A	NmcA Sme-1,2,3 IMI-1, ...	R	I	s-I	I	R	±	-	<i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i>
	KPC-1, ... GES-2	R	R	I	R	s-I	±	-	<i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>
B	IMP-1, ...	R	R	R	S	s-R	±	+	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter ...</i>
	VIM-1, ...	R	R	R	S	s-R	-	+	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> <i>E. coli</i>
D	OXA-23...27 40	R	R	R	S	s-I	±	-	<i>A. baumannii</i> <i>P. mirabilis</i>

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

## Complex Clonal and Plasmid Epidemiology in the First Outbreak of Enterobacteriaceae Infection Involving VIM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase in Spain: Toward Endemicity?

Clinical Infectious Diseases 2007;45:1171-8

M. Tato,<sup>1</sup> T. M. Coque,<sup>1</sup> P. Ruíz-Garbajosa,<sup>1</sup> V. Pintado,<sup>2</sup> J. Cobo,<sup>2</sup> H. S. Sader,<sup>3</sup> R. N. Jones,<sup>3</sup> F. Baquero,<sup>1</sup> and R. Cantón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología and <sup>2</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain; and <sup>3</sup>JMI Laboratories, North Liberty, Iowa

### Objetivos

- Descripción de la primera epidemia por Enterobacteriaceae con carbapenemasas producida en España
- Caracterización del enzima (VIM-1), gen asociado ( $bla_{VIM-1}$ ) y su entorno genético y los elementos de dispersión

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

---

## Material y métodos

- Hospital Universitario Ramón y Cajal, marzo-2005 – junio-2006
  - 25 pacientes infectados/colonizados por enterobacterias con carbapenemasas
- Estudio de sensibilidad y resistencias asociada
- Caracterización del:
  - enzima (IEF, PCR, secuenciación)
  - entorno genético (PCR, secuenciación)
  - plásmidos (grupos de incompatibilidad)
- Análisis de la estructura poblacional (PFGE)



# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

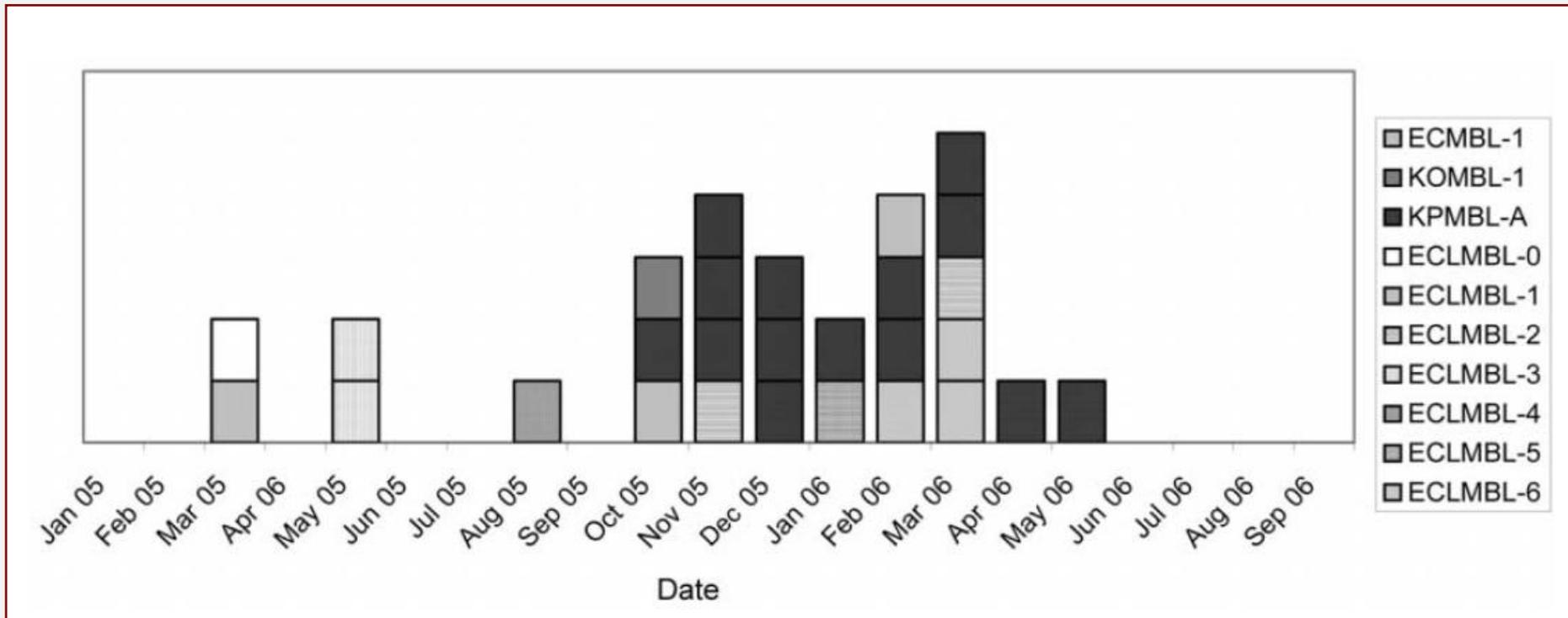
---

## Resultados

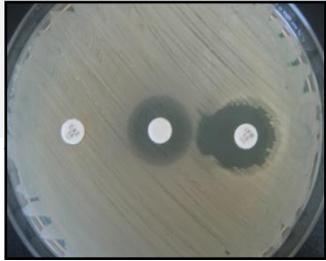
- 25 pacientes:
  - 52% UCI, 28% médica, 16% quirúrgica, 4% extrahospitalarios
  - 10 infectados y 5 colonizados
- Aislados y enzimas
  - VIM-1 + SHV-12 *K. pneumoniae* clon epidémico (14 pacientes)  
*E. coli* (1 paciente)
  - VIM-1 6 clones diferentes de *E. cloacae* (12 pacientes)  
*K. oxytoca* (1 paciente)
- Variabilidad en el entorno genético
- 50% mortalidad cruda (Pintado et al 46<sup>th</sup> ICAAC, 2006. Abstract 58)

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

Distribución temporal de clones de Enterobacteriaceae con MBL (VIM-1)



# Enterobacteriaceae con carbapenemasas



- Detección fenotípica: variabilidad en la expresión

Method, antibiotic	MIC, µg/mL								
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , KPMBL-A (n = 14)	<i>Enterobacter cloacae</i>						<i>Klebsiella oxytoca</i> , KOMBL-1 (n = 1)	<i>Escherichia coli</i> , ECMBL-1 (n = 1)
	ECLMBL-1 (n = 2)	ECLMBL-2 (n = 2)	ECLMBL-3 (n = 2)	ECLMBL-4 (n = 1)	ECLMBL-5 (n = 1)	ECLMBL-6 (n = 3)			
<b>Microdilution</b>									
Amoxicillin-clavulanic acid	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8
Piperacillin-tazobactam	>64/4	>64/4	>64/4	>64/4	>64/4	>64/4	>64/4	>64/4	>64/4
Ceftazidime	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefotaxime	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Cefepime	8 to >16	16 to >16	>16	16 to >16	2	>16	16 to >16	>16	16
Imipenem	≤1 to >16	2-4	4	4	≤1	4	≤1 to 4	2	2
Meropenem	≤1 to 8	4	≥8	2-4	≤1	4	≤1 to 4	2	≤1
Gentamicin	>8	≤2	≤2 to 4	≤2 to 4	4	≤2	≤2 to 4	4	≤2
Tobramycin	>8	4 to >8	4-8	≥8	8	8	4-8	8	4
Amikacin	≥16	≤4 to 8	≤4	≤4 to 8	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Ciprofloxacin	1 to >4	≤0.12	>4	1-2	1	≤0.12	1-2	4	>4
<b>Etest (AB Biodisk)</b>									
Imipenem	0.38 to >32	3-4	1.5-3	1-1.5	1	0.5	4 to >32	0.19	16
Meropenem	0.064-1	0.38-2	0.38-0.75	0.25-1	0.25	0.25	1-12	0.094	16
Ertapenem	2 to >32	>32	>32	12	16	32	12 to >32	0.50	8
Aztreonam	48 to >256	0.75 to >256	6 to >256	0.38-2	0.06	0.75	0.75-64	1	>256

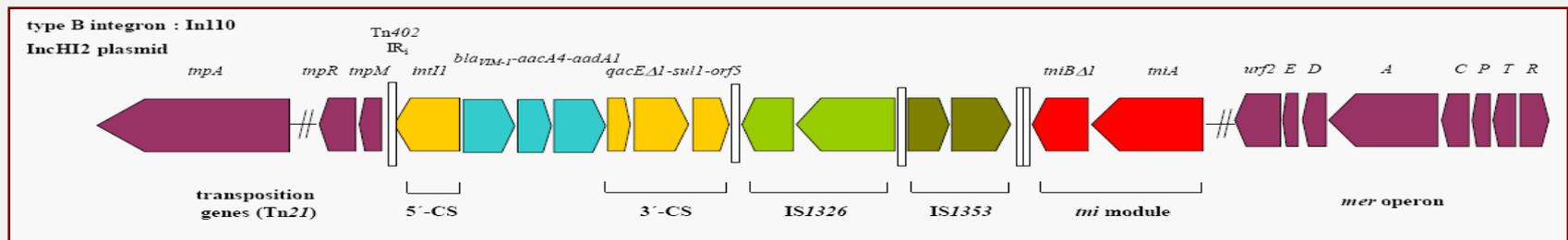
**NOTE.** Data are for 1 isolate per patient.

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

- Variabilidad en el entorno genético y asociación con plásmidos

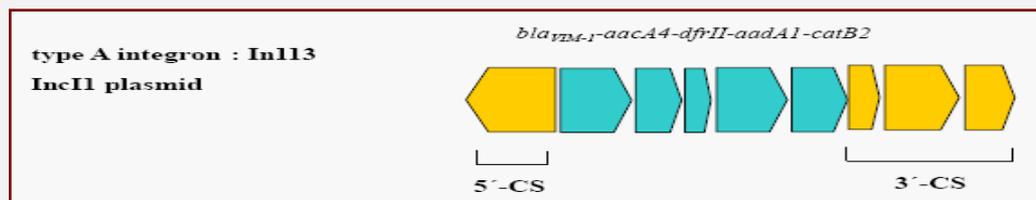
- *K. pneumoniae* y *E. coli*:

*bla*<sub>VIM-1</sub> en un integron de clase 1 de 4 Kb en un elemento de transposición Tn21-like y un plásmido epidémico de 60 Kb del grupo de incompatibilidad IncI1



- *E. cloacae*

*bla*<sub>VIM-1</sub> en un integron de clase 1 de 2,5 Kb en un plásmidos de 300-435 Kb de grupo de incompatibilidad IncH12



# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

---

## Conclusiones

- Diseminación epidémica:
  - clones de distintas especies de enterobacterias con VIM-1
  - diferentes plásmidos conjugativos de distintos grupos Inc
- Asociación de *bla*<sub>VIM-1</sub> con ...
  - diferentes plataformas de integrones de clase 1
  - Tn21
- Variabilidad en la expresión: dificultad en la detección

Facilidad para la dispersión y mantenimiento de una situación epidémica (¿endemia?)



# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

*Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 62, 1261–1264

doi:10.1093/jac/dkn396

Advance Access publication 23 September 2008

JAC

## Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom

Neil Woodford<sup>1\*</sup>, Jiancheng Zhang<sup>1</sup>, Marina Warner<sup>1</sup>, Mary E. Kaufmann<sup>1</sup>, Jorge Matos<sup>1</sup>, Alan MacDonald<sup>2</sup>, Daniel Brudney<sup>3</sup>, David Sompolinsky<sup>4,5</sup>, Shiri Navon-Venezia<sup>6</sup> and David M. Livermore<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre for Infections, Health Protection Agency, 61 Colindale Avenue, London NW9 5EQ, UK; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Crosshouse Hospital, Kilmarnock, UK; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Royal Free Hospital, London, UK; <sup>4</sup>Institute for Microbiology, Ma'ayanei Hayeshua Medical Center, Bnei Brak, Israel; <sup>5</sup>Faculty of Biology, Bar Ilan University, Ramat Gan, Israel; <sup>6</sup>Division of Epidemiology and the Laboratory for Molecular Epidemiology and Antibiotic Research, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel

## Objetivos

- Descripción de los primeros aislados de Enterobacteriaceae con carbapenemasas de clase A (KPC) en el Reino Unido
  - estudio de su relación con aislados de Israel con el mismo enzima
- Caracterización del enzima (KPC-3), gen asociado (*bla*<sub>KPC-3</sub>) y su entorno genético y los elementos de dispersión

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

---

## Material y métodos

- Estudio de 2 aislados de *K. pneumoniae* carbapenems-R remitidos al centro de referencia de resistencia antimicrobianas en el UK
  - 2007, *K. pneumoniae* aislada de un hemocultivo en un paciente en Escocia con ingreso previo en el país
  - 2008, *K. pneumoniae* aislada en una orina en una paciente en Londres con historia reciente de hospitalización en Israel
- Estudio de sensibilidad y resistencias asociadas
- Caracterización del:
  - enzima (CR, secuenciación)
  - entorno genético (PCR, secuenciación)
  - plásmidos (grupos de incompatibilidad)
- Comparación de aislados con los recogidos en Israel (PFGE)

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

---

## Resultados

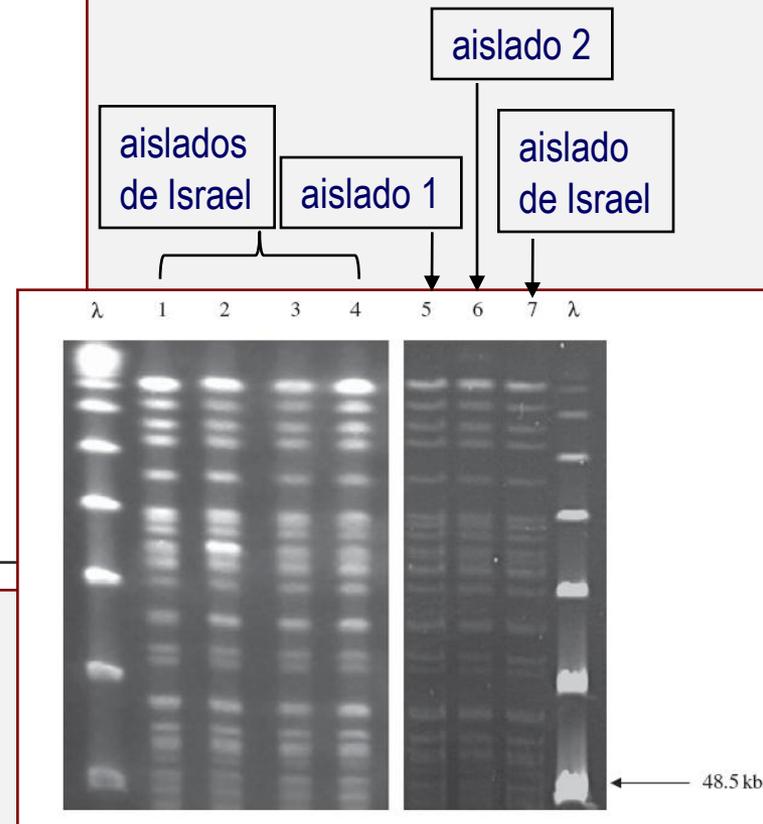
- Identificación de KPC-3 en los dos aislados con ...
  - alta resistencia a carbapenems (>16 µg/ml)
  - ausencia de sinergia con EDTA
- Entorno genético:
  - asociación de *bla*<sub>KPC-3</sub> con *ISKpn7* (*upstream*) y *ISKpn6* (*dowstream*) localizado en Tn4041-like
  - presencia de *bla*<sub>OXA-9-like</sub> y *bla*<sub>TEM-1</sub>
- PFGE indistinguibles en los dos aislados estudiados y los obtenidos en Israel

# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

## Resultados

### ■ Sensibilidad de *K. pneumoniae* con KPC-3

Antibiotic	Isolate 1, hospital A	Isolate 2, hospital B
Imipenem	32	> 128
Meropenem	>32	>32
Ertapenem	>16	>16
Aztreonam	>64	>64
Cefotaxime	128	128
cefotaxime + clavulanate	32	>32
cefotaxime + cloxacillin	32	64
Ceftazidime	256	>256
Cefpirome	>64	>64
Cefoxitin	>64	>64
Piperacillin/tazobactam	>64	>64
Ciprofloxacin	>8	>8
Gentamicin	1	0.5
Tobramycin	32	16
Amikacin	32	16
Minocycline	16	32
Tigecycline	2	1
Colistin	≤0.5	≤0.5



# Enterobacteriaceae con carbapenemasas

---

## Conclusiones

- Identificación de los dos primeros aislados (*K. pneumoniae*) con KPC en el Reino Unido
- Relacionados por PFGE con aislados previamente obtenidos en Israel
  - uno aislado en un paciente con ingreso previo en Israel
- Posible presencia previa no detectada de *K. pneumoniae* con KPC en el Reino Unido