

# **Búsqueda de KPC y Metaloβlactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital Córdoba**

Mena Javier Alberto; Minoli, María Jimena; Garutti, Alicia Beatriz; Aiassa  
María Susana.

Supervisión Microbiología. Servicio de Bioquímica. Hospital Córdoba.  
Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Correspondencia postal: Libertad 2050. C.P. 5000. Córdoba. Argentina

Correspondencia electrónica: javier\_mena85@hotmail.com

Teléfono: 0351-152253602

## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pae*) constituye un importante patógeno nosocomial ya que es causante de infecciones graves, sobre todo en pacientes hospitalizados. El mecanismo de resistencia adquirida más importante es el que afecta a carbapenemes, donde se destacan dos tipos de enzimas, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) y metaloβlactamasa (MβL). Se investigó la presencia de KPC y MβL en 185 cepas de *Pae* aisladas de muestras de pacientes atendidos en el Hospital Córdoba, mediante sistemas automatizados, ensayos fenotípicos utilizando agentes quelantes y el método de Hodge modificado y se analizó el perfil de sensibilidad antibiótica de dichas cepas. No se detectó la presencia de *Pae* productora de carbapenemasa. En cuanto al perfil de sensibilidad observado, puede resultar útil la terapia empírica con imipenem (IMI), meropenem (MEM) y colistín (COL).

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenemasas, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, metaloβlactamasa, resistencia, carbapenemes.

**Abreviaturas:** EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético. EDTA+SMA, Ácido etilendiaminotetraacético/mercaptoacetato de sodio. AZT, Aztreonam. BLEE, β-lactamasas de espectro extendido. CAZ, Ceftazidima. CAC, Ceftazidima-clavulánico. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. COL, Colistín. CIM, Concentración inhibitoria mínima. IMI, Imipenem. KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa. MEM, Meropenem. MβL, Metaloβlactamasa. TAZ, Piperacilina-tazobactam. *Pae*, *Pseudomonas aeruginosa*. VAN, Vancomicina.

## Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pae*) constituye un importante patógeno nosocomial que causa infecciones graves, sobre todo en pacientes hospitalizados.

En las últimas décadas se ha demostrado la emergencia y diseminación de cepas de bacilos gram negativos productores de carbapenemasas tipo metaloβlactamasa (MβL) en diferentes partes del mundo. Sin embargo, *Pae* continúa siendo el microorganismo más frecuentemente asociado a MβL a nivel mundial, representando hasta el 40% de todos los casos. (1)

Las tasas de resistencia de bacilos Gram negativos tienden a ser mucho mayor en América Latina que en los Estados Unidos y Europa. (2,3). En la actualidad, se ha podido identificar la dispersión en Argentina de *Pae* productoras de diversas MβLs con un patrón regional característico y único en el país. Independientemente de la zona geográfica y las variantes involucradas, se observa una tendencia sostenida y creciente de casos reportados durante los últimos dos años. (4)

La mortalidad asociada a infecciones severas por *Pae* productoras de MβL corresponde al 70-95% (1,5).

La elección del tratamiento antimicrobiano empírico adecuado resulta dificultosa dado que, por un lado, *Pae* es naturalmente resistente a muchos antimicrobianos de uso clínico, y por otro, presenta una elevada capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia que reducen aún más las posibilidades terapéuticas.

Una de las resistencias adquiridas más importantes es la resistencia a carbapenemes, los cuales son usados como último recurso para el tratamiento de infecciones graves.

Esto puede ser producido por diferentes mecanismos tales como:

1. Excreción del antibiótico mediante sobre-expresión de bombas de eflujo (MexAB-OprM) comprometiéndose en este caso, la sensibilidad a meropenem

(MEM) más que imipenem (IMI) y la de otros antibióticos no carbapenémicos (fluorquinolonas, penicilinas, cefalosporinas).

2. Alteraciones de la porina OprD que confiere impermeabilidad a carbapenemes, generando resistencia a IMI y sensibilidad disminuida a MEM.

3. Presencia de MβL y KPC. (6)

Las MβLs pertenecen a la clase B de Ambler y al grupo 3b de Bush, hasta el momento se han identificado varias enzimas (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM) siendo IMP-1, IMP-13 y VIM-2 las más comúnmente reportadas. (7). Poseen capacidad hidrolítica sobre penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y cefamicinas (cefexitina), sólo el monobactam aztreonam (AZT) evade la acción de estas carbapenemasas.

De manera distintiva, las MβLs requieren de metales divalentes ( $Zn^{2+}$ ) en su sitio activo, condición indispensable para su capacidad hidrolítica. Es por ello que en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) u otros quelantes de metales divalentes, como la combinación de ácido etilendiaminotetraacético/mercaptoacetato de sodio (EDTA+SMA), estas enzimas presentan una inhibición característica.

Las serino-enzimas KPC pertenecen a la clase A de Ambler y al grupo 2f de Bush, se describieron por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* y se conocen hasta el momento 10 variantes (KPC-2 a KPC-11). En *Pae* han sido detectadas solo 2 variantes: KPC-2 y KPC-5. (8). Hidrolizan todos los β-lactámicos incluyendo penicilinas, cefalosporinas, monobactames y carbapenemes. Además son pobremente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. (7)

Ambos tipos de genes de resistencia se ubican en cassettes genéticos móviles insertados dentro de un plásmido o en integrones cromosomales facilitando la transmisión horizontal entre diferentes cepas, por lo tanto este mecanismo de resistencia tiene alta implicancia epidemiológica. (9)

La presencia de carbapenemasas involucradas en procesos infecciosos severos, determina una alta probabilidad de falla de tratamiento en aquellas drogas incluidas en el espectro de sustratos de estas enzimas. Más aún, estas enzimas tienen una gran capacidad de diseminación, por lo que su hallazgo, debe acompañarse con los mayores esfuerzos del equipo de salud a fin de evitar una posible diseminación del microorganismo o de la carbapenemasa.

La exposición a diversos antibióticos se ha asociado con *Pae* multirresistente productora de carbapenemasas, incluyendo carbapenemes (10, 11, 12, 13, 14), piperacilina-tazobactam (TAZ) (12, 13), vancomicina (VAN) (12), aminoglucósidos (12,13), ceftazidima (CAZ) (15), y quinolonas (15, 16, 17, 18). Un estudio realizado por Rasmussen y Bush (19) predijo que un aumento de los microorganismos productores de MβL era inevitable, dado el uso cada vez mayor de los carbapenemes. Además experiencias anteriores con *Streptococcus pneumoniae* no sensibles a penicilina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus faecium* resistente a VAN, y *Klebsiella pneumoniae* productora de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) indican que las bacterias una vez que adquieren determinados mecanismos de resistencia no pueden ser controladas. (20)

Estos mecanismos de resistencia constituyen una problemática mundial en la salud pública debido al aumento del número de cepas con estos tipos de resistencia, lo cual ocasiona fallas de tratamiento; por lo tanto esto nos obliga a elegir un método eficiente para su detección.

En este trabajo se investiga la presencia de estos mecanismos de resistencia a carbapenemes en cepas de *Pae* aisladas de muestras de pacientes atendidos en el Hospital Córdoba, y se analiza el perfil de sensibilidad de dichas cepas.

## Materiales y métodos

Se analizaron, en primera instancia, 185 cepas de *Pae* provenientes de muestras remitidas al laboratorio de Bacteriología del Hospital Córdoba durante el año 2012; se consideró solo una muestra por cada paciente.

Se procesaron muestras tanto intrahospitalarias como extrahospitalarias (Tabla 1) y de diverso tipo (Tabla 2).

Tabla 1. N° de cepas analizadas según servicio hospitalario.

Servicio	N° cepas
UTI	62
I. del Quemado	30
Urología	25
Clínica Médica	21
UCI	14
Cirugía General	9
Cardiología	7
Neurocirugía	6
Nefrología	5
UCO	4
Hematología	1
IMAC	1
Total	185

Tabla 2. N° de cepas analizadas según tipo de muestras

Servicio	N° cepas
Orina (catéter)	46
Piel y partes blandas	40
Orina (chorro medio)	32
Hemocultivo	21
Aspirado traqueal	10
Espuito	8
Herida quirúrgica	7
Líquido abdominal	7
Líquido cefalorraquídeo	4
Punta de catéter	3
Retrocultivo	3
Lente de contacto	2
Líquido pleural	2
Total	185

La identificación de las cepas así como la concentración inhibitoria mínima (CIM) correspondiente a cada antibiótico se realizó mediante el uso del sistema automatizado VITEK 2.

Del total de cepas analizadas en primera instancia se seleccionaron sólo las que eran resistentes a IMI y/o MEM y CAZ, categorizadas según los puntos de corte establecidos en la guía Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (n=48) (21).

A estas cepas se le realizó antibiograma por el método de difusión de Kirby Bauer, probando IMI (10 µg), MEM (10 µg), CAZ (30 µg), AZT (30 µg) y adicionando discos que contienen EDTA (1µmol) distanciados de los primeros a 1 cm o a 1,5 cm (de borde a borde), respectivamente (22).

Paralelamente se realizó el método de Hodge modificado, el cual permite la detección de la presencia de enzimas con actividad de carbapenemasas, pero no discrimina entre serino-carbapenemasas y MβL. Esta técnica es de baja complejidad y presenta moderada sensibilidad (23).

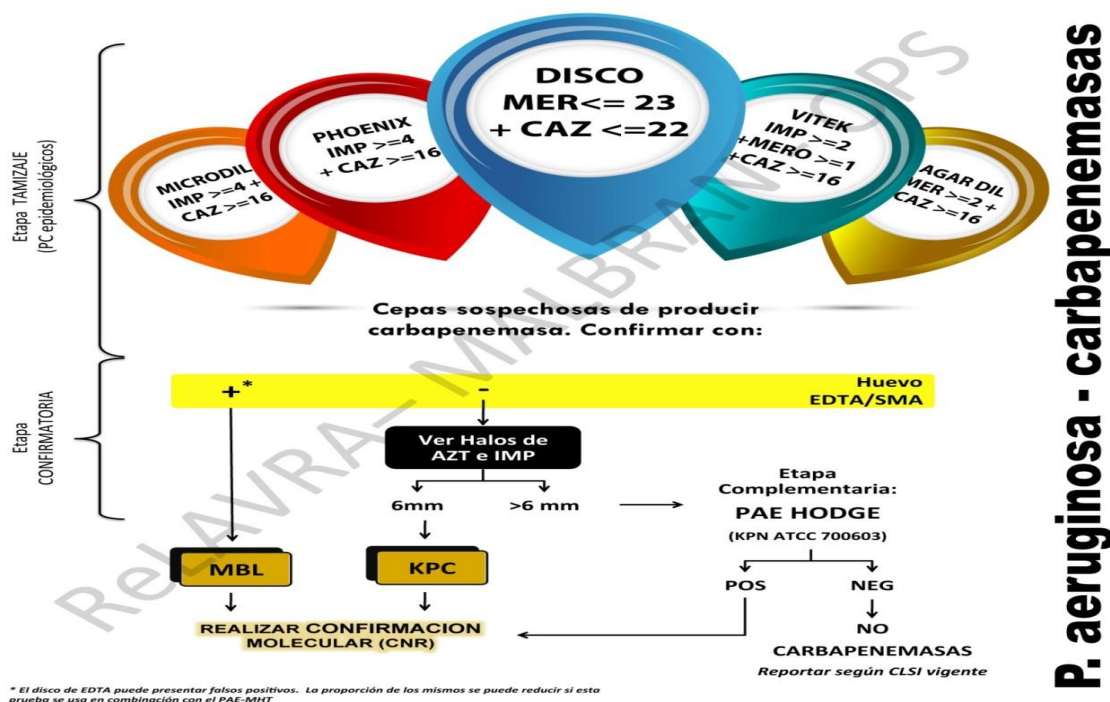
Para la detección de KPC también se realizó el método de difusión de Kirby Bauer colocando discos de CAZ (30 µg), IMI (10 µg), AZT (30 µg) y EDTA (1µmol), el resultado se interpreta mediante los puntos de corte establecidos por el CLSI. (21, 22)

Ambas pruebas se interpretaron de acuerdo al esquema sugerido por el Servicio Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” para la detección de MβL y KPC. (Fig. 1)

Se realizó la búsqueda de BLEE a través de la utilización de discos de CAZ (30 µg) y ceftazidima-clavulánico (CAC) (30 µg /10 µg) (22). Un resultado positivo se interpreta cuando la diferencia del halo entre CAC y CAZ es mayor a 5mm, según criterios establecidos por CLSI. (21)

Las cepas que posean dichos mecanismos de resistencia deben ser enviadas a un centro de referencia para su confirmación mediante biología molecular.

Fig. 1. Algoritmo recomendado por el Servicio Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” para la detección de carbapenemasas en *Pae*.



**P. aeruginosa - carbapenemasas**

## Resultados

El perfil de sensibilidad para las 185 cepas de *Pae*, demostró que el mayor porcentaje de sensibilidad se obtuvo para COL, seguido por IMI, MEM, CAZ (Tabla 3).

El patrón de sensibilidad del total de las cepas de acuerdo al servicio hospitalario del cual provenía la muestra reveló que el menor porcentaje de sensibilidad para CAZ y FEP se obtuvo en el Servicio de Cardiología, mientras que para IMI y MEM en el Servicio de Neurocirugía. (Gráfico I).

En la tendencia de resistencia correspondiente al 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> semestre del año 2012 se observó un ligero aumento en la resistencia para todos los antimicrobianos analizados en el 2<sup>do</sup> semestre. (Gráfico II).

En cuanto a la búsqueda de cepas con BLEE se identificaron solo 2, las cuales ambas presentaban sensibilidad a COL, IMI, MEM y resistencia a los demás antibióticos.

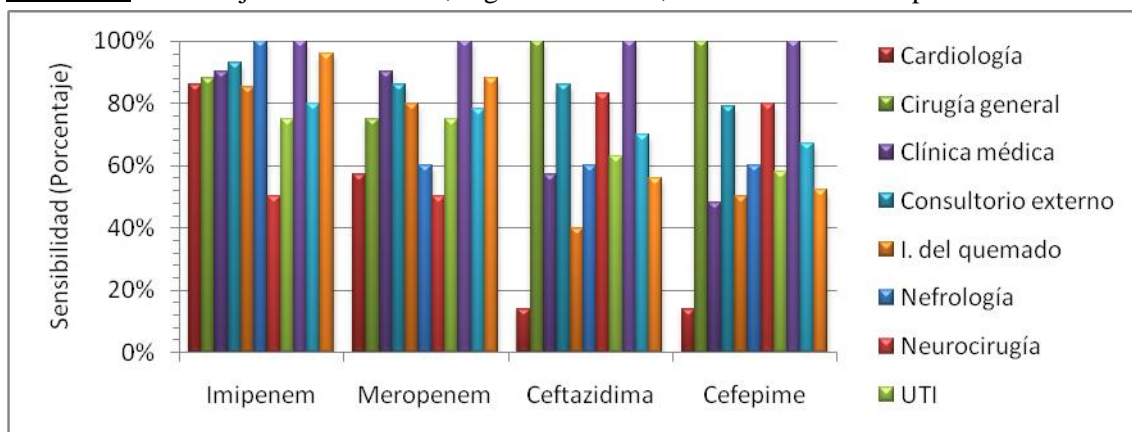
No se obtuvieron resultados positivos para la detección de KPC y MβL.



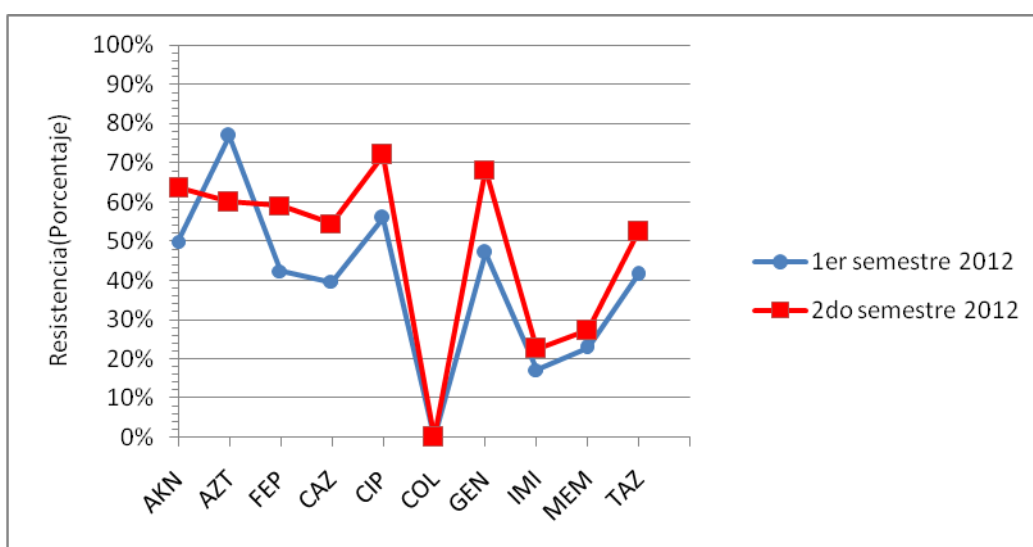
**Tabla 3:** Porcentaje de sensibilidad según antibiótico, del total de cepas (n=185)

Antibiótico	% Sensibilidad
Amicacina	52%
Aztreonam	23%
Cefepime	59%
Ceftazidima	62%
Ciprofloxacina	46%
Colistin	100%
Gentamicina	54%
Imipenem	84%
Meropenem	78%
Piperacilina-tazobactam	58%

**Gráfico I.** Porcentaje de sensibilidad, según antibiótico, en cada servicio hospitalario



**Gráfico II.** Porcentaje de resistencia, según antibiótico, en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> semestre de 2012



COL: Colistin, GEN: Gentamicina, IMI: Imipenem, MEM: Meropenem, TAZ: Piperacilina-tazobactam

## Discusión

Las únicas variables con capacidad de ser modificadas, en todo intento por reducir la mortalidad asociada, son el inicio precoz del tratamiento antimicrobiano y la apropiada selección de antibióticos. El régimen antimicrobiano ideal para el tratamiento de infecciones producidas por *Pae* con MβL aún no se ha determinado, pero sin lugar a dudas, el uso clínico como monoterapia de sustratos afectados por la enzima como penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, no debería ser considerado de primera elección. Debido a la multirresistencia asociada a cepas productoras de MβL, COL resulta el antimicrobiano con mayor actividad in vitro y ha sido utilizado para el tratamiento de estos gérmenes pero su uso puede significar un problema porque estos fármacos pueden estar asociados con nefrotoxicidad (24). Al igual que para enterobacterias productoras de carbapenemasa, la terapia combinada se asocia a mayor éxito clínico (1).

El tratamiento de las enfermedades infecciosas constituye un verdadero desafío debido al continuo aumento en las poblaciones de pacientes inmunosuprimidos y la ventaja de las bacterias para mutar y adaptarse rápidamente a las amenazas antibacterianas (25).

Es por ello que la detección precoz de este tipo de resistencia es crítica y debe ser realizada con la mayor precisión diagnóstica por parte de los laboratorios de microbiología clínica. Se han sugerido diversos métodos para el screening de MβL en *Pae*, sin embargo, no existen directivas y métodos estándar proporcionados por el CLSI para la detección de estas enzimas.

No se obtuvieron resultados positivos para la presencia de KPC y MβL con los métodos empleados, lo cual concuerda con el informe de Giske et al., donde se muestra que la disminución de la permeabilidad y el aumento de bombas de eflujo son los mecanismos más frecuentes de resistencia de carbapenemes (26).

En cuanto al perfil de sensibilidad de acuerdo a los servicios hospitalarios, la UTI, el Instituto del Quemado y la UCI tienen el porcentaje de sensibilidad a IMI y MEM más bajos. En el caso de UTI esto se podría deber a la presencia de factores de riesgo tales como: períodos de internación prolongados, asistencia respiratoria mecánica, enfermedad de base subyacente, pacientes quemados, uso de antibióticos de amplio espectro durante tiempo prolongado, etc.

Con relación al tipo de muestra de la cual se aisló *Pae*, la mayor cantidad de muestras fueron de piel y partes blandas provenientes de pacientes del Instituto del Quemado. El segundo lugar lo ocuparon las muestras de orina, en su mayoría de pacientes con sonda vesical (probablemente debido a la capacidad de *Pae* de colonizar y formar biofilms en catéteres vesicales).

## **Conclusión**

En nuestra institución no se detectó la presencia de *Pae* productora de carbapenemasa.

En cuanto al perfil de sensibilidad observado, puede resultar útil la terapia empírica con IMI, MEM y COL.

Como hemos visto la aparición de KPC y M $\beta$ L es inminente, por lo que debemos continuar realizando todos los esfuerzos posibles para la optimización de métodos orientados a la búsqueda y detección de estos mecanismos.

## Referencias

1. Carmeli et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives. Journal Compilation, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2010; 102–11.
2. Sader, HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari, AC and SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz. J. Infect. Dis. 2004; 8: 25–79.
3. Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn, JP and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 49: 217–22.
4. INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Programa nacional de control de calidad en bacteriología. Boletín informativo nro. 5. Octubre - 2012.
5. Zavascki AP, Barth AL, Gaspareto PB, Goncalvez AL, Moro AL, Fernandes JF, Goldani LZ. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in two tertiary care teaching hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 2006; 58: 882-5.
6. Athanassios T, Aggeliki P, Ioulia K, Theodore P, Nicholas S, Spyros P, Fani M. Large Dissemination of VIM-2–Metallo-B-Lactamase–Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Health Care-Associated Community-Onset Infections. Journal of Clinical Microbiology 2009; 47:3524–29.

7. Lagatolla C, Edalucci E, Dolzani L, Riccio M, De Luca F, Medessi E, Rossolini G, Tonin E. Molecular Evolution of Metallo-B-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in a Nosocomial Setting of High-Level Endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 2348–53.
8. Grace C. Lee. Epidemiology and treatment of KPC'S...What's the news? Review of Current Evidence. BCPS Pharmacotherapy Rounds 2012: 1-22.
9. Livermore, DM, and Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 2000; 5: 489–95.
10. Cailleaux V, Mulin B, Capellier G, Julliot MC, Thouverez M, Talon D. Epidemiological study of variations in beta-lactam antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in two intensive care units. *J. Hosp. Infect.* 1997; 37: 217–24.
11. Cao B, Wang H, Sun H, Zhu Y, Chen M. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Hosp. Infect.* 2004; 57: 112–8.
12. Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC, Morris G, Kaye KS, and Johnson JA. Risk factors for piperacillin-tazobactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 854–8.
13. Harris, AD, Smith D, Johnson JA, Bradham, DD, Roghmann MC. Risk factors for imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34: 340–5.
14. Trouillet, JL, Vuagnat A, Combes A, Kassis N, Chastre, J, Gibert C. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: comparison of episodes due

to piperacillin resistant versus piperacillin susceptible organisms. Clin. Infect. Dis. 2002; 34: 1047–54.

15. Richard P, Le Floch R, Chamoux C, Pannier M, Espaze E, and Richet H. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. J. Infect. Dis. 1994; 170: 377–83.

16. Baddour, LM, Hicks DV, M. Tayidi MM, Roberts SK, Walker E, Smith RJ, Sweitzer DS, Herrington JA, and Painter BG. Risk factor assessment for the acquisition of fluoroquinolone-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a community-based hospital. Microb. Drug Resist. 1995; 1: 219–22.

17. Defez, C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, Mahamat A, Daures JP, Sotto A. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. J. Hosp. Infect. 2004; 57: 209–16.

18. Paramythiotou, E, Lucet JC, Timsit D, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet JL, Belloc S, Kassis N, Karabinis A, Andremont A. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. Clin. Infect. Dis. 2004; 38: 670–7.

19. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 223–32.

20. Lee K, Lee HS, Jang SJ, Park AJ, Lee MH, Song WK, et al. Antimicrobial resistance surveillance of bacteria in 1999 in Korea with a special reference to resistance of enterococci to vancomycin and gram-negative bacilli to third generation cephalosporin, imipenem, and fluoroquinolone. J Korean Med Sci 2001; 16: 262–70.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. January 2012.
22. SADEBAC-AAM. Subcomisión de antimicrobianos. Caracterización fenotípica de la resistencia a los B-lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*
23. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and Specific Modified Hodge Test for KPC and Metallo-Beta-Lactamase Detection in *Pseudomonas aeruginosa* by Use of a Novel Indicator Strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49: 4301–3.
24. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 60: 1206–15.
25. Bertrand X, Thouverez M, Talon D. et al. Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Medicine.* 2001; 27: 1263–8.
26. Giske CG, Buarø L, Sundsfjord A et al. Alterations of porin, pumps and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Res.* 2008; 14: 1145-52.