

METALO- β -LACTAMASAS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN LIMA, PERÚ

Edgar Gonzales-Escalante^{1,a}, William Vicente-Taboada^{2,b}, Roky Champi-Merino^{3,a}, Javier Soto-Pastrana^{4,a}, Wilfredo Flores-Paredes^{5,b}, Margarita Lovera-García^{5,a}, Nancy Chuquiray-Valverde^{6,a}, Carlos Bejarano-Cristobal^{6,a}, Maritza Puray-Chávez^{7,a}, Segundo León-Sandoval^{7,a,c}

RESUMEN

Con el objetivo de detectar y caracterizar molecularmente las metalo- β -lactamasas (M β L) en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, se realizó un estudio transversal en seis hospitales de referencia de Lima (Perú) en agosto de 2011. Se evaluó 51 aislamientos de *P. aeruginosa*, resistentes a ceftazidima y con sensibilidad reducida a carbapenémicos. El ensayo fenotípico se realizó con el método de aproximación de discos con sustratos (ceftazidima, imipenem y meropenem) y con ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). La detección de genes M β L se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa multiplex. A través del método fenotípico se detectaron M β L en el 15,7% de los aislamientos, en todos ellos la detección de genes mostró la presencia del gen *bla*_{IMP}. La descripción del primer reporte de M β L en aislamientos de *P. aeruginosa* en el Perú debería alertar a los equipos de vigilancia epidemiológica intrahospitalaria para promover su control y prevenir su diseminación.

Palabras clave: Farmacorresistencia bacteriana; Penicilinas; Genes MDR; Proteínas asociadas a resistencia a múltiples medicamentos; *Pseudomonas aeruginosa* (fuente: DeCS BIREME).

METALO- β -LACTAMASES IN CLINICAL ISOLATES OF *Pseudomonas aeruginosa* IN LIMA, PERU

ABSTRACT

The aim of this study was to detect and characterize molecularly metallo- β -lactamase (M β L) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. We carry out a cross sectional study in six public hospitals in Lima on August 2011. 51 isolates of *P. aeruginosa* resistant to ceftazidime and reduced susceptibility to carbapenems were evaluated. The phenotypic assay was performed using the approximation method with substrate disks (ceftazidime, imipenem and meropenem) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). M β L gene detection was performed using the technique of polymerase chain reaction (PCR) multiplex. Through M β L detected phenotypic method in 15.7% of isolates. Detection of genes revealed the presence of the gene in the 8 isolates *bla*_{IMP}. The first report of M β L in *P. aeruginosa* in Peru was described, this should alert the monitoring equipment in the institutions to promote control their spread.

Key words: Drug resistance, bacterial; Penicillinase; Genes, MDR; Itidrug resistance-associated proteins; *Pseudomonas aeruginosa* (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La *Pseudomonas aeruginosa*, es el patógeno humano más importante del género *Pseudomonas*, caracterizado por su alta virulencia y morbimortalidad. Tradicionalmente considerado como un patógeno oportunista asociado a múltiples infecciones intrahospitalarias, ahora se

sabe que la *P. aeruginosa* se encuentra asociada a infecciones adquiridas tanto en la comunidad como en ámbitos nosocomiales.

Existen pocas opciones terapéuticas efectivas para las infecciones causadas por este microorganismo, ello debido a la elevada resistencia intrínseca que este

¹ Instituto Nacional de Salud del Niño. Lima, Perú.

² Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Lima, Perú.

³ Hospital Nacional Hipólito Unanue. Lima, Perú.

⁴ Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé. Lima, Perú.

⁵ Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Lima, Perú.

⁶ Hospital Alberto Sabogal Sologuren. Lima, Perú.

⁷ Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

^a Tecnólogo médico; ^b médico patólogo clínico; ^c magister en Enfermedades Infecciosas y Tropicales

Recibido: 19-12-12 Aprobado: 17-04-13

Citar como: Gonzales Escalante E, Vicente Taboada W, Champi Merino R, Soto Pastrana J, Flores-Paredes W, Lovera García M, et al. Metallo- β -lactamasas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2013;30(2):241-5.

presenta ante diferentes familias de antimicrobianos^(1,2). La farmacoresistencia de este microorganismo esta relacionado a diferentes mecanismos tales como la alteración de las bombas de eflujo o la alteración de la permeabilidad en la membrana celular. La alteración de la MexAB-OprM, que es una bomba de eflujo, compromete de manera simultánea la sensibilidad a penicilinas, cefalosporinas, quinolonas y al meropenem. Otro ejemplo es la pérdida de la porina OprD, que se encuentra en la membrana externa y es utilizada por los carbapenémicos, y no por otros β -lactámicos, para su penetración en la célula; cuya alteración se asocia a la resistencia a imipenem y a una sensibilidad reducida a meropenem, esta pérdida es mediada por la mutación de los genes que codifican esta porina^(3,4). Sin embargo, es la adquisición de genes codificantes de metalo- β -lactamasas (M β L) el mecanismo de resistencia bacteriana que tiene una alta implicancia epidemiológica, debido a su capacidad de diseminación horizontal.

Las M β L poseen cuatro características principales: poseen actividad contra los carbapenemes; no hidrolizan los monobáctamicos, como el aztreonam; son inhibidas por quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), o el mercapto acetato de sodio, y requieren cationes divalentes (generalmente Zn⁺²) como cofactor para su actividad catalítica; además de ello, las M β L no son inhibidas por los antibióticos suicidas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) que bloquean la acción de las serino- β -lactamasas^(5,6). Diversas familias de M β L han sido identificadas hasta el momento y, debido a sus características bioquímicas, han sido divididas en tres subgrupos. El subgrupo 3a incluye enzimas con amplio espectro de hidrólisis para penicilinas, cefalosporinas e imipenem, muchas enzimas de este subgrupo necesitan de Zn⁺² para desarrollar su actividad. El subgrupo 3b comprende enzimas que hidrolizan preferentemente carbapenemes siendo consideradas las verdaderas carbapenemasas, todas las enzimas de este subgrupo necesitan Zn⁺² para su actividad y son inhibidas por el EDTA. El subgrupo 3c comprende enzimas que hidrolizan rápidamente ampicilina^(7,8).

A pesar de que en otras partes del mundo han sido ampliamente documentadas, en nuestro país los genes productores de M β L no han sido detectados hasta la fecha. La aproximación de un disco que contenga un agente quelante como el EDTA a un disco que contenga un carbapenémico podría resultar una herramienta útil para la detección de M β L; ello debido que el efecto sinérgico entre los carbapenémicos y el agente quelante sería indicativo de la presencia de M β L. Sin embargo, ningún método fenotípico ha sido suficientemente estandarizado o recomendado para la detección de M β L en el laboratorio de microbiología

clínica^(9,10). El objetivo de este estudio fue detectar y caracterizar molecularmente las M β L responsables de la resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

EL ESTUDIO

Se realizó un estudio transversal, en el cual se estudiaron 51 aislamientos consecutivos y no repetitivos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes hospitalizados en seis hospitales públicos de Lima (uno pediátrico, uno materno-infantil, uno oncológico y tres generales) recolectados durante el mes de agosto de 2011. Los criterios de selección de los microorganismos fueron señalados siguiendo las recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología^(10,11); es decir, que durante las pruebas de disco difusión la *P. aeruginosa* tuviera resistencia a ceftazidima (halos menores a 15 mm) y sensibilidad reducida a los carbapenémicos (halos menores a 21 mm de imipenem o meropenem). El procesamiento de los aislamientos se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se realizaron pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en los aislamientos mediante la técnica de disco difusión, de acuerdo con las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Se incluyeron discos conteniendo aztreonam 30 μ g (ATM); ceftazidima 30 μ g (CAZ); cefepima 30 μ g (FEP); imipenem 10 μ g (IPM); meropenem 10 μ g (MEN); piperacilina/tazobactam 100/10 μ g (TZP); amikacina 5 μ g (AMK); gentamicina 10 μ g (GEN); ciprofloxacina 5 μ g (CIP), y colistin 10 μ g (COL, Oxoid®). Inmediatamente después del tiempo de incubación, los diámetros de los halos de inhibición para cada uno de los antimicrobianos se registraron e interpretaron de acuerdo con las normas CLSI 2012⁽¹²⁾.

Para la determinación fenotípica de las M β L se utilizó la técnica de aproximación del disco modificada. Para ello se inocularon las placas según las recomendaciones del CLSI para la prueba de disco difusión, y se colocaron discos conteniendo EDTA (Laboratorios Britania-Argentina: EDTA 372 μ g / mercapto acetato de sodio 900 μ g) y discos comerciales conteniendo imipenem 10 μ g, meropenem 10 μ g y ceftazidima 30 μ g (Oxoid®), respetando la distancia de 1,5 cm de centro a centro entre los discos con antibióticos y el inhibidor. Las placas se incubaron durante 18 horas a 35 °C. Un agrandamiento en el halo de inhibición del disco con antibiótico en la zona adyacente al disco con EDTA fue interpretado como posible presencia de M β L^(9,10).

Tabla 1. Pares de cebadores empleados en la detección genotípica de las Metallo-β-lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Cebador	Secuencia
IMPF	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3'
IMPR	5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'
VIMF	5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3'
VIMR	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'
GIMF	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3'
GIMR	5'-AACTTCCAACCTTGCCATGC-3'
SIMF	5'-TACAAGGGATTTCGGCATCG-3'
SIMR	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'
SPMF	5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3'
SPMR	5'-ACATTATCCGCTGAAACAGG-3'

La detección genotípica de la MβL se realizó mediante un ensayo de Multiplex-PCR empleando como molde ADN total (10). Los pares de cebadores empleados se detallan en la Tabla 1.

Los reactivos empleados fueron de Invitrogen (EE. UU.). Se empleó un termociclador VERITI *Applied Biosystem* (EE. UU.) y la siguiente reacción de amplificación: desnaturalización 94 °C, 5 min; seguida de 36 ciclos de: desnaturalización 94 °C, 30 s; hibridación 52 °C, 40 s; amplificación 72 °C, 50 s; y un período final de elongación 72 °C, 5 min. Los fragmentos esperados fueron IMP (188pb), VIM (390pb), SPM (271pb), GIM (477pb) y SIM (570pb).

HALLAZGOS

A través del método fenotípico se detectaron aislamientos sospechosos de producir MβL en el 15,7% (8/51) de los aislamientos, en ellos se observó sinergia entre los carbapenémicos y el disco que contenía EDTA. El 25% (2/8) de los aislamientos sospechosos de producir MβL fueron sensibles al aztreonam, a pesar de ser este un indicador de la presencia de las MβL. En todos los casos los aislamientos fueron sensibles a colistin. Los datos de susceptibilidad se muestran en la

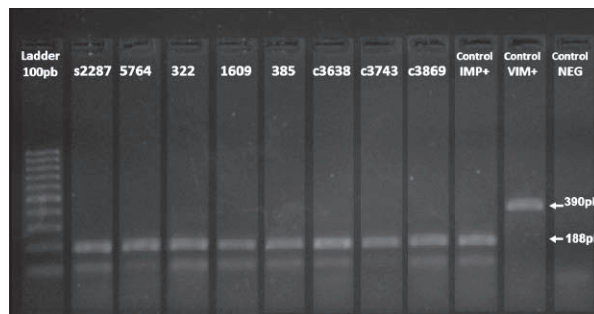


Figura 1. Gel de agarosa de la corrida electroforética de PCR multiplex para MβL en los 8 aislamientos de *P. aeruginosa* positivos para *bla_{IMP}*

Tabla 2. La detección de los genes codificantes de MβL por Multiplex-PCR reveló la presencia del gen *bla_{IMP}* en los ocho aislamientos sospechosos de producir MβL que fueron detectados por el ensayo fenotípico empleando EDTA (Figura 1), lo que indica que los ensayos de detección fenotípica resultaron adecuados.

DISCUSIÓN

Si bien los resultados obtenidos pertenecen a un periodo corto y la situación epidemiológica es particular para las distintas instituciones del país, es importante notar que la prevalencia de MβL en aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes ceftazidima y con sensibilidad reducida a carbapenémicos resultó ser similar a la de otros estudios realizados en América Latina. En Argentina, dos estudios han señalado frecuencias de 11 y 14%, en ambos casos se aisló la enzima VIM (13,14); en Chile se encontró una frecuencia de 18,6% de MβL también del tipo VIM (15). En tanto que en Brasil se ha señalado que el gen prevalente es SPM-1 con frecuencias que varían entre 5 a 62%, en diferentes regiones del país, en el caso del gen IMP la prevalencia va de 2 a 8% y, finalmente, el gen VIM fue detectado con una prevalencia del 30% (16).

Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* productoras de Metallo β lactamasas.

Aislamientos (identificación)	Tipo de Muestra	Susceptibilidad antimicrobiana (mm/interpretación)									
		CAZ	FEP	ATM	AMK	GEN	CIP	COL	TZP	IPM	MEN
1 (s2287)	ABr	8 / R	6 / R	33 / S	6 / R	6 / R	8 / R	16 / S	13 / R	14 / R	18 / I
2 (5764)	Sec	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	15 / S	15 / R	6 / R	6 / R
3 (322)	Her	6 / R	6 / R	11 / R	6 / R	6 / R	6 / R	15 / S	16 / R	6 / R	6 / R
4 (1609)	Orn	6 / R	6 / R	10 / R	6 / R	6 / R	6 / R	14 / S	6 / R	6 / R	6 / R
5 (385)	Orn	9 / R	7 / R	34 / S	6 / R	6 / R	6 / R	16 / S	23 / S	6 / R	6 / R
6 (c3638)	Cat	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	18 / R	15 / S	6 / R	6 / R	6 / R
7 (c3743)	ATq	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	21 / R	15 / S	6 / R	6 / R	6 / R
8 (c3869)	ATq	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	6 / R	14 / S	6 / R	6 / R	11 / R

Nota: la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó según los criterios de la CLSI 2012; los números arábigos representan el diámetro (mm) del halo alrededor del disco de difusión y, las letras son la interpretación (S: sensible, I: intermedio, R: resistente)
 CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; ATM: aztreonam; COL: colistina; TZP: piperacilina/tazobactán; IPM: imipenem; MEM: meropenem; ABr: aspirado bronquial, Sec: secreción, Her: herida, Orn: orina, Cat: catéter, ATq: aspirado traqueal

La no detección de genes para M β L en 84,3% de los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima y con sensibilidad reducida a los carbapenémicos, asociado al resultado de la prueba fenotípica refuerza la hipótesis que la producción de M β L no es el principal mecanismo de resistencia a los carbapenémicos en *P. aeruginosa*. Este resultado sugiere la ocurrencia de otros mecanismos de resistencia, como mutaciones en el gen OprD, que resultan en porinas con reducida afinidad por el imipenem y es considerado el principal responsable por la resistencia al imipenem en *P. aeruginosa* ⁽¹⁷⁾ La resistencia al meropenem puede ser resultado de la hiperexpresión de sistemas de eflujo ⁽¹⁸⁾.

Si bien las M β L no hidrolizan eficientemente al aztreonam, por lo cual no son capaces de conferir resistencia a este antibiótico, en esta investigación se obtuvieron dos aislamientos sensibles, los demás valores se interpretaron como resistentes; por lo que no resultó un buen indicador de la presencia de M β L; sin embargo, la resistencia a dicho agente no descarta su presencia ^(5,6). En este caso, la resistencia a este antibiótico estaría mediada por otro mecanismo de resistencia no analizado en el presente estudio, como por ejemplo, la presencia de β -lactamasas de espectro extendido o sobre expresión de un sistema de eflujo ^(19,20). En todos los casos se observó sensibilidad a colistin, siendo este una buena alternativa terapéutica en caso de *P. aeruginosa* multi-resistente.

Algunas limitaciones de nuestro estudio deben ser reconocidas, el tiempo en que se recolectaron las muestras y su cantidad no permiten determinar la magnitud del problema, por lo que hacen faltan estudios

mayores para conocer la realidad nacional en torno a la resistencia bacteriana mediada por M β L en *P. aeruginosa*. Además, es necesaria la realización del secuenciamiento para conocer las variantes alélicas de esta enzima y su codificación genética que nos permita conocer si existen otros genes de resistencia relacionados, como enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

En conclusión, se ha descrito el primer reporte de M β L en *P. aeruginosa* en el Perú, la descripción molecular de estas enzimas ha señalado que el gen *bla*_{IMP} estuvo presente en todos ellas. El desarrollo de este mecanismo de farmacoresistencia en el Perú podría tener un grave impacto en el ámbito clínico y epidemiológico, en particular de los hospitales incluidos en el presente estudio; por lo cual los equipos de vigilancia de estos hospitales deberían promover medidas de control para evitar su diseminación.

Agradecimientos: al personal del Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

Contribuciones de autoría: EGE, WVT, RCM, JSP y WFP han participado en la concepción del artículo, la recolección de datos, material de estudio y redacción del artículo. MPC y SLS participaron en la idea de la investigación, la redacción y la asesoría técnica y administrativa. Además, MLG, NCV Y CBC participaron en la recolección de datos y material de estudio y redacción del artículo. Todos los autores aprobaron la versión final del manuscrito.

Fuentes de financiamiento: autofinanciada

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925). Rev Infect Dis. 1984;6 Suppl 3:S775-6
- Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis. 2001;32(Suppl 2):S146-55.
- Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2001;47(3):247-50.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol. 2000;3(5):489-95.
- Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005;18(2):306-25.
- Queenan A, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):440-58.
- Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(2):223-32.
- Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. Biochem Pharmacol. 2007;74(12):1686-1701.
- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol. 2000;38(1):40-3.
- Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, et al. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de

- Microbiología. Rev Argent Microbiol. 2011;43(2):136-53.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second informational supplement. M100-S22. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
 12. Ellington M, Kistler J, Livermore D, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamasas. J Antimicrob Chemother. 2007;59(2):321-2.
 13. Pagniez G, Radice M, Cuirolo A, Rodríguez O, Rodríguez H, Vay C, et al. Prevalencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un hospital universitario de Buenos Aires. Rev Argent Microbiol. 2006;38(1):33-7.
 14. Cejas D, Almuzara M, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figueroa S, et al. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. Rev Argent Microbiol. 2008;40:238-245
 15. Pérez A, García P, Poggi H, Braun S, Castillo C, Román J, et al. Presencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. Rev Méd Chile. 2008;136:423-32.
 16. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamasas in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Antimicrob Agents. 2005;25(1):57-61.
 17. Farra A, Islam S, Stralfors A, Sorberg M, Wretling B. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. Int J of Antimicrob Agents. 2008;31(5):427-33.
 18. Pages JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta. 2009;1794(5):826-33.
 19. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res. 2003;2(1):48-62.
 20. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamasas. Antimicrob. Agents. Chemother. 2010;54(3):969-76.

Correspondencia: Edgar Gonzales Escalante
 Dirección: Av. Brasil 600, Lima 05, Perú.
 Teléfono: (511) 330-0066 anexo 3201.
 Correo electrónico: egones_5@hotmail.com