

Resistencia a carbapenems mediada por metalo- β -lactamasas en bacilos Gram negativos aislados de ambientes hospitalarios*

Torres Luis^{1,2}, Salazar Mariángela¹, Moran Alejandra¹, González Andreina¹, Sanoja Lluvia¹, Calvo Alberto³, Rodríguez Nicolás⁴, Chalbaud Valentina⁵, Carías Carolina⁵, Aguilar Fanny⁶, Peña Caridad⁷, Montilla Ninoska⁸, Bolívar Arelis⁹, R. Pedroza²

RESUMEN

Los carbapenems son antibióticos que muestran una potente actividad bactericida contra bacilos Gram negativos, se unen a PBP's esenciales y además son estables ante la mayoría de β -lactamasas. En múltiples ocasiones estas drogas constituyen la única opción terapéutica. En los últimos años se ha incrementado la resistencia a estos antibióticos, por múltiples mecanismos de resistencia, siendo el de mayor importancia y relevancia la producción de carbapenemasas. Las metalo- β -lactamasas (MBLs), son carbapenemasas localizadas a nivel cromosómico y plasmídico, pertenecientes al grupo-3 de Bush, necesitan cofactores de metales (Zn^{2+}), por lo tanto su actividad es inhibida por agentes químicos quelantes como el EDTA. Debido al impacto clínico y epidemiológico que genera este mecanismo de resistencia nos planteamos detectar fenotípicamente y molecularmente la presencia de metalo- β -lactamasas en 49 bacilos Gram negativos (*P. aeruginosa* y *A. baumannii*) resistentes a carbapenems provenientes de ocho centros hospitalarios de Caracas-Venezuela. La detección de carbapenemasas se realizó mediante el test de Hodge y Masuda, la identificación de metalo- β -lactamasas se llevó a cabo mediante doble difusión del disco demostrando el efecto sinérgico que ejerce el EDTA sobre la actividad del IPM, igualmente se emplearon tiras de E-test de IPM e IPM/EDTA. Se utilizaron ensayos de PCR para la identificación de genes MBLs tipo *VIM-2*, tipo *IMP-2* e Integrones Clase I. Los tests de Hodge/Masuda evidenciaron un total de 38 (77%) cepas con actividad hidrolítica para el IPM, los ensayos fenotípicos demostraron un número de 30 (61,2%) cepas productoras de metalo- β -lactamasas. En 18 (60%) de estas cepas, se detectó la presencia de genes *bla_{IMP}* mediante ensayos de PCR. En la mayoría (94%) de estos aislados, se evidenció la presencia de integrones clase I. Estas MBLs pueden estar asociadas a ADN plasmídico y eventualmente pueden ser transferidas a otros géneros bacterianos y ser diseminadas en el ambiente hospitalario si las medidas de control y vigilancia epidemiológicas no son adecuadas.

Palabras clave: Metallo- β -lactamasas, carbapenems, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, infección hospitalaria.

Carbapenems resistance mediated by metallo-beta-lactamases in Gram negatives bacilli isolated from hospital environments

SUMMARY

The carbapenems are antibiotics that show a powerful bactericidal activity against gram negative bacilli, they join essential PBP's and are stable in the presence of almost all β -lactamases. In multiple occasions these drugs are the only therapeutic option. Over the last years, the resistance against these antibiotics has increased, this has been caused by different resistance mechanisms, from which the most important is the production of carbapenemases. The metallo- β -lactamases (MBLs), are carbapenemases located at chromosomal and plasmatic level, and that belong to the Bush group-3, they need metal cofactors (Zn^{2+}), so that their activity is inhibited by chemical chelating agents like EDTA. Due to the clinical and epidemiologic impact that this resistance mechanism generates, we proposed ourselves to detect the phenotypic and molecular presence of metallo- β -lactamases in 49 gram negative bacilli (*P. aeruginosa* and *A. baumannii*) resistant to carbapenems obtained from eight hospital centers of Caracas-Venezuela. The detection of carbapenemases was realized by the test of Hodge and Masuda; the identification of metallo- β -lactamases was done by the double diffusion disc showing the synergistic effect that exerts the EDTA over the IPM activity, equally we used IPM e IPM/EDTA E-test strips. We used PCR assays for the identification of MBLs genes type *VIM-2*, type *IMP-2* and class I integrons. The Hodge/Masuda tests showed a total of 38 (77%) of strains with hydrolytic activity for the IPM, the phenotypic assays resulted with 30 (61,2%) strains that produce metallo- β -lactamases. In 18 (60%) of these strains, we detected the presence of *bla_{IMP}* genes by PCR assays. In almost all (94%) of these isolates, we evidenced the presence of class I integrons. These MBLs can be associated to plasmidic DNA and eventually can be transferred to other bacterial kinds and disseminate in hospital environments if the control and epidemiologic guidelines are not adequate.

Key words: Metallo- β -lactamases, carbapenems, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* hospitalary infection.

* Trabajo ganador del Premio Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas otorgado en el Congreso Venezolano de Bioanálisis año 2006.

1. Cátedra de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, UCV. 2. Sección de Biología Molecular de Agentes Infecciosos, Instituto de Medicina Experimental, UCV. Secciones de Bacteriología de los Laboratorios. 3. Policlínica Metropolitana. 4. Hospital José G. Hernández. 5. Hospital J. M. de los Ríos. 6. LAICUT. 7. Hospital de Clínica Caracas. 8. Hospital Domingo Luciani. 9. Hospital Universitario de Caracas. ltorresucv@yahoo.com, raquelpedroza@cantv.net.

Introducción

Los carbapenems son antibióticos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos, son considerados compuestos muy activos para tratar infecciones producidas por microorganismos resistentes a la mayoría de los β -lactámicos, gracias a su estabilidad frente a β -lactamasas y a la alta capacidad de unión a las proteínas fijadoras de penicilina (1,2). La aparición e incremento de aislamientos a nivel mundial de bacilos Gram negativos resistentes a estos, constituye un problema de salud pública que cada día cobra mayor auge en los centros asistenciales, con mayor énfasis en las unidades de cuidados intensivos, debido a la presión selectiva que sufren estas cepas, aunado al grado de inmunosupresión de los pacientes, permitiéndose con esto la facilidad de crear microepidemias intrahospitalarias (3,4).

Entre los principales mecanismos de resistencia a los carbapenems se encuentran: baja permeabilidad de la membrana, pérdida de las porinas, sistemas de expulsión activa y producción de enzimas inactivantes (4). El mecanismo enzimático está representado por las carbapenemasas enzimas con capacidad de hidrolizar los carbapenems, dentro de este grupo se encuentran las carbapenemasas tipo OXA, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) del grupo 2f y las metalo- β -lactamasas (MBLs); estas últimas son dependientes de zinc como cofactor para su actividad (3).

Las MBLs son las enzimas de mayor relevancia clínica y epidemiológica, pues generan un alto nivel de resistencia a todos los β -lactámicos excepto el aztreonam (5,6), presentan una alta mortalidad asociada a la infección, persisten en el ambiente hospitalario, y están asociadas a integrones, estructuras genéticas que permiten la captación y almacenamiento de genes de resistencia (7,8). Los cassettes génicos de resistencia asociado a integrones, pueden ser transferidos a otros géneros bacterianos, debido a que generalmente se encuentran ubicados en elementos genéticos móviles como los transposones y plásmidos conjugativos, de esta manera se garantiza el recambio génico, la transferencia de genes de resistencia y su diseminación en el ambiente hospitalario, situación que incrementa y agrava el contexto clínico y epidemiológico (7,8).

Tomando en cuenta que en nuestro país, los datos del programa de vigilancia de la resistencia antimicrobiana, evidencian un incremento progresivo en los últimos años de la resistencia a carbapenems entre diversos Bacilos Gram negativos y que de la misma manera son escasos los estudios que determinen el tipo de mecanismos de resistencia implicado en dichos aislados. En el presente trabajo nos planteamos detectar la presencia de metalo- β -lactamasas en una población de bacilos Gram negativos resistentes y con susceptibilidad intermedia a carbapenems. La caracterización fenotípica y molecular de las

cepas ensayadas, permitió conocer la existencia de los principales mecanismos de resistencia asociados a estas drogas, por otra parte, se estableció epidemiología local de los mecanismos de resistencia a dichos antibióticos, hecho que contribuye a realizar los ajustes adecuados en la metodología de detección fenotípica en el laboratorio clínico, así como la creación de registros para consumo local, nacional e internacional, lo cual permitiría alertar y atacar la problemática antes de que surjan epidemias en los centros asistenciales del país. De tal manera, que se pretende: generar información que clínicamente facilite la disminución de la presión selectiva que se ejerce con el uso de estas drogas y epidemiológicamente proporcione datos en relación a la resistencia a estos antibióticos en nuestros centros asistenciales. Cabe destacar que este es el primer trabajo realizado en Venezuela, que evidencia la presencia de genes *bla_{TEM}* en aislados de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Materiales y métodos

Muestra

La muestra en estudio, estuvo conformada por 49 cepas de bacilos Gram negativos que mostraron un patrón de sensibilidad intermedia o resistencia a los carbapenems; criterios de selección tomados a partir de la CLSI en el 2005 para *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., y Enterobacterias (9).

Estas cepas fueron aisladas en las secciones de Bacteriología de los siguientes centros asistenciales: Hospital J. M de los Ríos (JMR), Hospital General del Oeste "José Gregorio Hernández" (JGH), Policlínica Metropolitana (PM), Maternidad Concepción Palacios (MCP), Hospital Universitario de Caracas (HUC), Hospital Domingo Luciani (HDL), Hospital Clínicas Caracas (HCC), Urológico San Román (USR).

Secuencia de los iniciadores utilizados en el estudio para la detección molecular de las MBLs de las familias VIM-2, IMP-2 e Integrones de Clase I.

Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana

El estudio de susceptibilidad fue realizado mediante la metodología de Kirby Bauer sugerida por la CLSI 2005, a catorce antibióticos de diferentes familias (9).

Detección de Carbapenemasas

Test de Hodge: Para la realización del test se inoculó la superficie de una placa de Agar Mueller Hinton con una cepa de *E. coli* ATCC-25922 con una turbidez de 0,5 del estándar McFarland, posteriormente se colocó una estría desde el centro a la periferia de la placa con la cepa en estudio y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min, una vez transcurrido

este tiempo se procedió a colocar un disco de IMP con una concentración de 10 μ g en el centro de la placa y se incubó a 37°C durante 24 horas. La presencia de una reducción del halo

de sensibilidad de la cepa *E. coli* ATCC-25922, es producto de la inactivación del antibiótico ejercida por la actividad hidrolítica de las carbapenemasas (15).

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores para la tipificación de MBLs de la familia IMP-2, VIM-2 e integrones clase I.

Nombre iniciador	Secuencia (5'→3')	Producto de amplificación	Referencia
Eubacterial 16S ARNr plus	5' - AAC TGG AGG AAG GTG GG AT - 3'	371 pb	Mason, W y col, 2001(10)
Eubacterial 16S ARNr minus	5' - AGG AGG TGA TCC AAC CGC A - 3'	371 pb	Mason, W y col, 2001(10)
Iniciador IMP-2 plus	5' - GTT TTA TGT GTA TGC TTC C - 3'	678 pb	Shibata, N y col, 2003 (11)
Iniciador IMP-2 minus	5' - AGC CTG TTC CCA TGT AC - 3'	678 pb	Shibata, N y col, 2003 (11)
Iniciador VIM-2 plus	5' - CCG ATG GTG TTT GGT CGT AT - 3'	744 pb	Yatsuyanagi, J y col, 2004(12)
Iniciador VIM-2 minus	5' - GAA TGC GCA GCA CCA GGA T - 3'	744 pb	Yatsuyanagi, J y col, 2004(12)
Iniciador VIM-2 ⁺ plus	5' - GTC TAT TTG ACC GCG TC - 3'	270 pb	Toleman, M* y col, 2002 (13)
Iniciador VIM-2 ⁺ minus	5' - CTA CTC AAC GAC TGA GCG - 3'	270 pb	Toleman, M* y col, 2002 (13)
Iniciador In CS minus	5' - GGC ATC CAA GCA GCA AGC - 3'	Variable	Di Conza y col, 2002 (14)
Iniciador In CS plus	5' - AAG CAG ACT TGA CCT GAT - 3'	Variable	Di Conza y col, 2002 (14)

Detección de Metallo- β -lactamasas

E-Test: Para la realización de este test se colocaron tiras impregnadas con imipenem (IMP)/ imipenem + EDTA (IMPI) en un placa de Agar Mueller Hinton inoculada con una dilución de cada cepa al 0,5 de la escala MacFarland. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Fue considerada la presencia de metalo- β -lactamasas cuando la relación entre la CIM IMP/ CIM IPI era = a 8 (16). Sin embargo, ciertos autores refieren que relaciones = a 5,3 deben ser tomadas en cuenta, ya que cabe la posibilidad de que la expresión de varios mecanismos de resistencia enmascare la presencia de la metaloenzima, disminuyendo la sensibilidad de la prueba (5). Estas consideraciones fueron tomadas en cuenta en nuestro estudio.

Test de EDTA de Doble difusión del disco: en una placa de Agar Mueller Hinton inoculada con una dilución de cada cepa problema al 0,5 de la escala McFarland, fueron colocados un disco de meropenem (MEM), y un disco de imipenem (IMP), entre un disco de papel filtro con una solución de EDTA al 3%, separados a una distancia de 15 mm. De la misma manera se colocó otro disco de IMP al cual se le añadió 20 μ l de EDTA al 3%, se incubó a 37°C por 24 horas (16). Un resultado positivo se evidenciaba, por la presencia de un efecto sinérgico (deformación del halo de inhibición) entre el disco de EDTA 3% y alguno de los dos carbapenems o por la obtención de una diferencia = 4 mm entre los halos de inhibición del disco de IMP/EDTA y el disco IMP.

Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)

El procedimiento se llevó a cabo según una modificación del protocolo de Chanawong y col (17): La reacción de amplificación fue realizada con 2,5 μ l de Buffer de PCR (INVITROGEN) 2,0 μ l de MgCl₂ (INVITROGEN) 1,0 μ l de

desoxinucleotidos difosfato 10 Mm, 1,0 μ l de cada primers, 1,0 μ l de suspensión celular y 16,5 μ l de mezcla Agua -Taq polimerasa (INVITROGEN).

El termociclador BIORAD gene cycler™ fue programado según los siguientes protocolos de trabajo: **IMP-2:** 1 ciclo de ruptura celular a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 3 minutos. **VIM-2:** 1 ciclo de ruptura celular a 95°C por 4 minutos, treinta (30) ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing a 55°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y 1 ciclo de extensión a 72°C por 1 minuto. **INTEGRONES CLASE I:** Un 1 ciclo de ruptura celular a 95°C por 10 minutos, treinta (30) ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing a 55°C por 1 minuto y 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y 1 ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos.

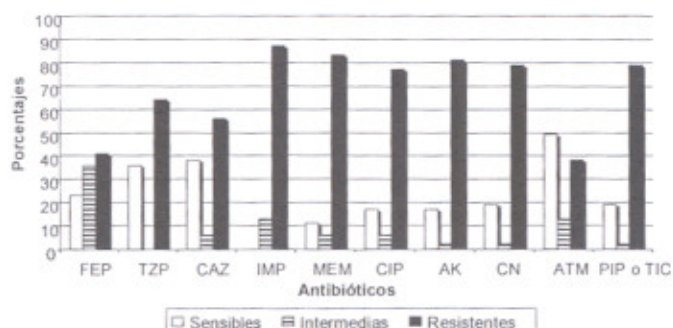
Para certificar que la técnica fue realizada en las condiciones ideales se empleó un control positivo con primers universal (amplifica la subunidad 16S ARNr, región conservada en todas las bacterias, necesario para verificar la extracción del ADN), control positivo M-5129 para VIM-2, control positivo M-7017 para IMP-2 (ambos controles donados por el Dr. Marcelo Galas, Instituto Carlos Malbrán Buenos Aires Argentina) y un control positivo para integrones *E. coli* 4412 (17), control negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853 y un control de contaminación sin DNA.

Los productos de amplificación fueron detectados en gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio al 0,5 μ g/ml.



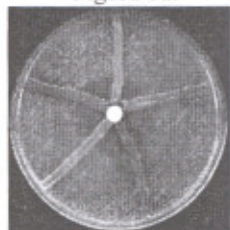
Resultados

Patrón de susceptibilidad antimicrobiana

P. Aeruginosa y A. baumannii

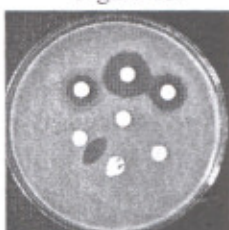
En este gráfico se puede observar el alto nivel de resistencia a múltiples antibióticos, entre la familia de los B-lactámicos, el aztreonam es la droga que presenta menor porcentaje de resistencia (38%), este resultado se correlaciona con la presencia de MBLs ya que este tipo de enzimas no hidrolizan dicha droga. De la misma manera se puede observar que para las alternativas terapéuticas amikacina, gentamicina y ciprofloxacina, los niveles de resistencia alcanzan el 80%.

Figura 1a.



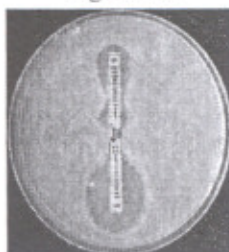
Detección de carbapenemasas mediante el test de Hodge.

Figura 1b.



Detección de MBLs mediante difusión del disco

Figura 1c.



Detección de MBLs mediante E-test

Figura 1. Detección fenotípica de Carbapenemasas y Metallo-B-lactamasas.

Detección fenotípica y molecular de MBLs.

En la Tabla 2 podemos observar que las metodologías realizadas para la detección fenotípica de MBLs son predictivas de la presencia de MBLs del tipo VIM-2, con excepción de tres cepas que resultaron Hodge y EDTA positiva, E-Test negativo y molecularmente presentaba MBLs de tipo VIM-2.

Tabla 2. Comparación entre los resultados del Test de Hodge, Test de EDTA al 3%, metodología por E-Test y detección molecular de MBLs del tipo VIM-2.

Microorganismos analizados	Test Hodge		Test EDTA		E-Test		VIM-2	
	Positivo		Positivo		Positivo		Positivo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>A. baumannii</i>	11	22.4	05	10.2	03	7.5	3	6.1
<i>P. aeruginosa</i>	27	55.1	25	51.0	20	50	15	30.6
<i>Enterobacterias</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Totales	38	77.5	30	61.2	23	57.5	18	36.7

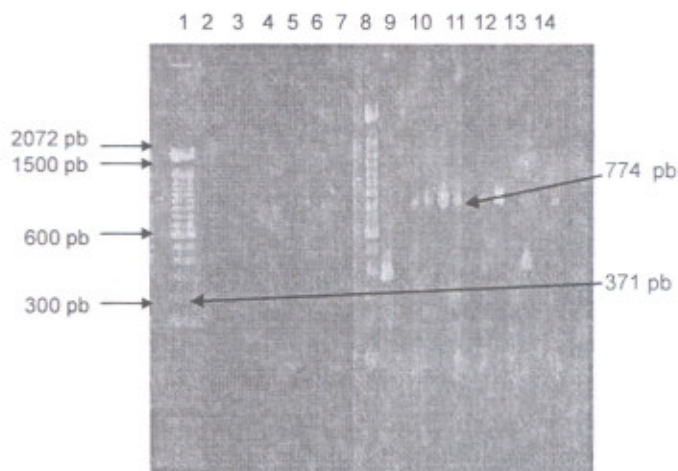


Figura 2. Detección de MBLs de la familia VIM-2 por PCR. Corrida Electroforética en gel de agarosa 1,2%. Carriles: 1) DNA ladder 100pb. 2) Control positivo Pae-M5109 (ADN bacteriano). 3) Control negativo Pae-ATCC-27853. 4) Control positivo Pae-M5109. 5) Pae-408. 6) Pae-418. 7) Pae-419. 8) Pae-5100. 9) Pae-425. 10) Pae-426. 11) Pae-429. 12) Pae-449. 13) Pae-571. 14) Control negativo (sin DNA).

Los productos de amplificación de PCR que se muestran en la Figura 2, corresponden a los resultados de la detección de MBLs de la familia VIM-2, en los cuales se observó una banda que se encuentra en el rango de 774 pb, la misma se correlaciona con el tamaño teóricamente estimado en la búsqueda de la secuencia del gen de VIM-2 en el Gen Bank, que es de 774 pb.

Detección Molecular de Integrones Clase I en aquellas Cepas Productoras de Metallo- β -Lactamasas tipo VIM-2

De las 18 cepas (60%) caracterizadas genotípicamente, que resultaron MBLs de la familia VIM-2, se encontró que 17 (94%) presentaban integrones clase I, mostrando diferentes bandas con pesos moleculares entre 250 pb y superiores a 2072 pb; destacando que en 10 cepas se observó un patrón repetido de bandas entre 1400 y 1500 pb, en 12 de ellas bandas entre 400 y 500 pb y 9 mostraron bandas con pesos moleculares elevados (entre 2000 y =2072 pb).

Tabla 3. Tipificación molecular de Integrones clase I en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* productoras de MBLs de la familia VIM-2 aisladas de los ocho Centros Asistenciales del área Metropolitana de Caracas 2005-2006.

Microorganismos analizados	Detección molecular de integrones clase I		
	Nº cepas totales	Nº positivos	%
<i>A. baumannii</i>	3	2	67
<i>P. aeruginosa</i>	15	15	100
Totales	18	17	94

En la corrida electroforética correspondiente a la figura 3 se muestra la migración del producto de amplificación de diferentes cepas como sigue: carril 1 marcador de peso molecular de 100 pares de base, control positivo *P. aeruginosa* M5109 con primer universal, carril 2 control negativo *P. aeruginosa* ATCC-27853 para integrones, carril 3 control positivo *E. coli* 4412 para Integrones, carriles del 4 al 18 y 19 cepas de *P. aeruginosa* respectivamente, carril 20 control negativo sin DNA y carril 21 marcador de peso molecular *fago* ϕ Hind III.

Detección Molecular de Metallo- β -Lactamasas tipo IMP-2

A partir de las 17 cepas que demostraron ser negativas para la caracterización molecular de las MBLs de la familia VIM-2, se realizó la detección de MBLs del tipo IMP-2 en donde a pesar que los controles positivos y negativos mostraron amplificación en la reacción, las cepas probadas no presentaron amplificación positiva con estos iniciadores; sin embargo esto no excluye la presencia de otras MBLs en esas cepas o la presencia de IMP-2 en las cepas productoras de VIM-2.

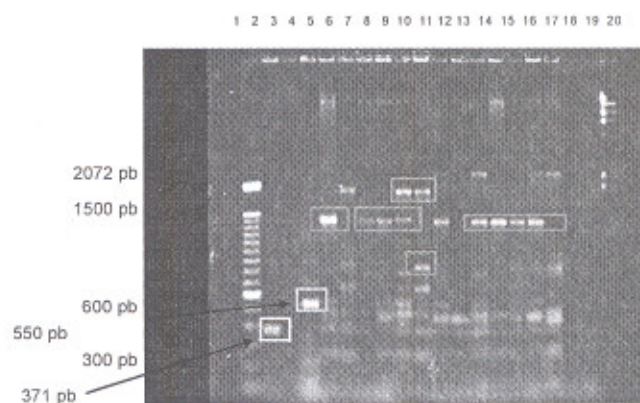


Figura 3. Detección de Integrones de clase I por PCR. Corrida Electroforética en gel de agarosa 1,2%. Carriles: 1) DNA ladder 100pb. 2) Control positivo Pae-M5109 (ADN bacteriano). 3) Control negativo Pae-ATCC-27853. 4) Control positivo *E. coli* 4412. 5) Pae-408. 6) Pae-415. 7) Pae-419. 8) Pae-420 9) Pae-425. 10) Pae-427. 11) Pae-426. 12) Pae-429. 13) Pae-449. 14) Pae-564. 15) Pae-571. 16) Pae-573. 17) Pae-590. 18) Pae-593. 20) Control negativo (sin DNA). 20) DNA Lambda Hind III.

Discusión

En los últimos años la aparición y diseminación de cepas multirresistentes a diversos antibióticos, en Bacilos Gram negativos, especialmente *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y en menor grado en Enterobacterias; supone un grave problema terapéutico y epidemiológico. Estos microorganismos se han convertido en los últimos años en los patógenos nosocomiales más relevantes como causantes de numerosas epidemias intrahospitalarias a nivel mundial, afectando especialmente a pacientes críticos que ingresan a las unidades de cuidados intensivos. Los carbapenems constituyen una de las mejores opciones terapéuticas por su alta eficacia para el tratamiento de estas infecciones; sin embargo, su uso indiscriminado asociado a otros factores propios del ambiente hospitalario y condiciones del paciente, han permitido la aparición de cepas resistentes a este antibiótico; permitiéndose de este modo la disminución de la eficacia terapéutica y la fácil propagación de estos microorganismos en el ambiente hospitalario.

Los resultados del Test de Hodge de la población en estudio, revela que el mecanismo enzimático es el que aparentemente prevalece, tal como se observa en diversos estudios realizados, entre ellos el realizado por el SENTRY (2005), en donde se demuestra que a partir de aislamientos de bacilos Gram negativos no fermentadores (*Acinetobacter* y *Pseudomonas*) resistentes a carbapenems recolectados de varios países (6).

En relación a la detección fenotípica de MBLs mediante el Test de EDTA, se demostró que existe un alto porcentaje de resultados positivos (61,2%) en estas cepas de bacilos Gram negativos correspondiente a 30 aislamientos de un total de 49. En algunos casos la interpretación del resultado del Test de EDTA fue complicada, añadiendo el hecho de que variaciones en la preparación del disco o distancias entre los discos en la placa modifican el resultado, es por ello que se estandarizó el método de acuerdo a los ensayos realizados y las cepas controles productoras de MBLs (*P. aeruginosa* M-5129, *P. aeruginosa* M-7017), y las cepas controles no productoras de MBLs (*E. coli* ATCC-25992 y *P. aeruginosa* ATCC-27853). Para disminuir el hecho de que la solución de EDTA pudiese interferir en el crecimiento de las cepas y distorsionar el resultado, resultó mucho más eficaz la utilización de EDTA al 3% y la alternativa del método utilizando 4 discos IMP, MEM, EDTA e IMP+EDTA; sin embargo no se pudo eliminar por completo la distorsión del resultado, causado por la inhibición competitiva del EDTA sobre otras reacciones enzimáticas en ciertas cepas ensayadas, tales como PacPM408, AbeJMR418, PacMAT433, PacHCC575; en estos casos se restó el excedente del valor (mm) del halo de EDTA al halo de IMP+EDTA (Ej. EDTA 9 mm, IMP+EDTA 15 mm, el nuevo valor de IMP+EDTA es de 12 mm).

En cuanto al E-Test, 40 de las cepas estudiadas fueron analizadas con esta metodología, encontrándose un alto porcentaje de resultados positivos tomando como punto de corte el valor de 5,33 en la relación IMP/IMP-EDTA (5). La mayoría de los mismos se encontraron en aislados de *P. aeruginosa*, estos resultados sugieren que al obtener relaciones en el rango de 5,33 mediante la metodología de E-test, se debe tratar en la medida de lo posible de confirmar la detección mediante ensayos más sensibles, ya que en diversos casos demostramos molecularmente la presencia de genes MBLs tipo VIM en cepas cuyos puntos de corte fueron 5,33. En cuanto a las cepas de *A. baumannii* se observó que el mayor porcentaje de las cepas resultaron negativas con relaciones menores a 5,33.

En relación a la detección genotípica de MBLs encontramos que nuestra población ensayada presentó los genes para MBLs de la familia VIM-2 de acuerdo con los análisis realizados con dos iniciadores diferentes para VIM-2 (VIM-2 y VIM-2a), los cuales mostraron un 100% de reproducibilidad. En el estudio se observó que el mayor porcentaje de esta enzima se encuentra en los aislamientos de *P. aeruginosa* tal y como lo demuestran los reportes realizados por el SENTRY en el año 2005 (6), así como estudios realizados por Poirel y Nordmann en el 2002 donde señalan la detección de esta variante enzimática fundamentalmente en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (3).

Cabe destacar que la detección de MBLs VIM-2 en las cepas de *A. baumannii* es el primer hallazgo realizado en nuestro país; en relación a esto, en Latinoamérica son escasos los reportes de MBLs de la familia VIM en *A. baumannii* (6). Sin embargo en el porcentaje correspondiente a cepas negativas para la tipificación molecular, no se puede descartar la presencia de otros miembros de MBLs dentro de las cuales sería de importancia investigar MBLs del tipo SPM-1, ya que como lo refieren ciertos estudios ha sido encontrada únicamente en Latinoamérica (Brasil) en aislamientos de *P. aeruginosa* (13), hecho que resulta de importancia epidemiológica por su cercanía geográfica con nuestro país. El estudio molecular permitió demostrar que la detección fenotípica puede predecir la presencia de MBLs, así como también que en el área Metropolitana de Caracas se encuentran cepas productoras de MBLs del tipo VIM-2 hecho que se correlaciona con el reporte realizado por el Antimicrobial Surveillance Program, en el año 2004 en tres cepas de *P. aeruginosa* Caracas-Venezuela (6), del mismo modo reafirma la diseminación de dichos clones enzimáticos en América ya que existen reportes de estas enzimas donde destacan la presencia de VIM-2 en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en Cali-Colombia (18), Argentina y USA.

Las cepas que resultaron negativas para la detección de VIM-2 fueron caracterizadas en la búsqueda de MBLs de tipo IMP-2, selección hecha por ser este tipo de enzima la más frecuentemente encontrada después de VIM-2, así como también por la homología aminoacídica; con respecto a lo anterior no se detectaron cepas positivas, sin embargo; no puede ser descartada como se mencionó anteriormente la presencia de otro tipo de MBLs como variantes de IMP, VIM y SPM-1, entre otras en esta población, ya que existen estudios donde reflejan la presencia de VIM-7 en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en USA (19), IMP-16 en aislamientos de *P. aeruginosa* Brasil (6), IMP-1 en cepas de *A. baumannii* en Argentina y Brasil (6), así mismo tampoco puede ser excluida la posibilidad de que la población que mostró detección genotípica positiva para VIM-2 presenten alguna de las previamente nombradas e incluso MBLs del tipo IMP-2.

La determinación genotípica de integrones clase I en las cepas portadoras de genes VIM-2 sugiere que en nuestra población, probablemente estos genes estén asociados a dichas estructuras genéticas; tal como lo señalan diversos estudios (18) donde demuestran la localización de estos genes de resistencia en MBLs de la familia VIM-2. La ubicación de estos genes, a su vez en elementos móviles como los plásmidos, facilita la expansión de estos elementos de resistencia en diversos géneros bacterianos así como su diseminación en los centros asistenciales si no son tomadas en cuenta medidas de control. La mayoría de las cepas VIM-2 positivas mostraron la presencia de varias bandas sugestivas de integrones, situación

que evidencia que las cepas portadoras de estos genes MBLs y de otros genes de resistencia, tienen la capacidad de albergar y capturar genes de resistencia a diferentes antibióticos, transferirlos mediante conjugación si los mismos están asociados a plásmidos conjugativos y diseminarlos a otros géneros bacterianos, situación que ya se está evidenciando a nivel mundial, con los recientes reportes de Enterobacterias productoras de MBLs, sin duda alguna, este panorama genera un importante reto a la terapéutica antimicrobiana actual y al laboratorio de microbiología, que debe estar en la capacidad de detectar, vigilar e informar estos mecanismos de resistencia.

En este trabajo no se detectó la presencia de MBLs en las cepas de enterobacterias estudiadas, probablemente la resistencia observada en estos aislados, se debe a la expresión de varios determinantes de resistencia, como la sobreexpresión de la B-lactamasa cromosómica AmpC y a la disminución de la permeabilidad, por pérdida de porinas (3,4,6).

En relación a las cepas positivas para MBLs del tipo VIM-2 se observó correlación para las metodologías del Test de EDTA y de E-Test, sin embargo, se encontraron tres resultados discrepantes en los cuales la relación IMP/IMP-EDTA fue menor a 5,3 mm, lo cual puede ser causado por un efecto inhibitorio producido por el EDTA o que posiblemente la expresión de la enzima se encuentre en un rango que no pueda ser detectado por dicha metodología (5), así como también cabe la probabilidad tal y como señala Sanchez y col, que la expresión de varios mecanismos de resistencia enmascare la presencia de la metaloenzima, disminuyendo la sensibilidad de la prueba (5).

A pesar de la utilidad de los test fenotípicos descritos como técnicas de uso rápido en el laboratorio de microbiología, los resultados de este estudio indican y apoyan la sugerencia de otros autores con respecto a la necesidad de realizar también detección molecular para la caracterización específica de nuevas carbapenemasas.

Conclusiones y recomendaciones

De un total de 49 cepas ensayadas en este trabajo, donde se evidencio resistencia y resistencia intermedia a carbapenems se obtuvieron los siguientes resultados:

Existe un alto porcentaje (77%) de cepas positivas para la detección fenotípica de carbapenemasas por la metodología del Test de Hodge.

El 61,2% de cepas estudiadas presentaron resultados positivos en la detección de MBLs mediante Test de EDTA.

La metodología del E-Test, la cual fue realizada a 40 de las 49

cepas estudiadas indica que el 57% son productoras de MBLs fenotípicamente.

Se obtuvo que 37% de un total de 49 cepas ensayadas presentan MBLs de la familia VIM-2 en los géneros de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

A partir de las cepas productoras de MBLs de la familia VIM-2 se detectó la presencia de integrones clase I, evidenciándose que el 94% de estas 18 cepas, presentan estas estructuras de almacenamiento y reservorio genético, lo cual posiblemente indique que estos integrones estén asociados a la transferencia genética de estas metaloenzimas.

Se recomienda utilizar el Test de EDTA al 3% como prueba de rutina para la detección de MBLs en el laboratorio de microbiología, pues se obtienen resultados confiables con esta metodología.

Los profesionales de la salud deben incrementar medidas de bioseguridad en los hospitales para evitar la transmisión de un paciente a otro de estas cepas, tales medidas incluyen el correcto aseo de las manos, el uso de guantes y batas desechables por paciente, entre otras cosas, pues de no ser así este problema ha de incrementarse aún más e incluso que estas cepas se diseminen a los ambientes extrahospitalarios, tal como ocurrió con las BLEE.

Referencias

1. Gómez-Lus R. Caracterización de meropenem. Rev Esp Quimioter 1993; 10 (supl. 2): 3-5.
2. Honorato J. Características farmacológicas del meropenem. Rev Esp Quimioter 1994; 10 (supl.): 141-2.
3. Nordmann P and Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clinical Microbiology and Infection 2002; (8): 321-31.
4. Livermore David M. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001; 47: 247-250.
5. Sanchez A, Salso S, Culebras E, Picazo J. Resistencia a carbapenems por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Esp Quimioterap 2004; 17(4): 336-340.
6. Sader H, Castanheira M, Mendes R, Toleman M, Walsh T y col. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 2005; 57-61.
7. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo, J, et al. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron- Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000; 44(4): 891-897.
8. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, et al. PCR Typing of Genetic Determinants for



- Metallo- β -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5407-5413.
9. Wikler M, Cockerill F. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; fifteenth informational supplements 2005; 25(1):40-42.
10. Mason W, Blevins J, Bwnken K, Wibowo N, Ojha N, Ismeltzer M. Multiplex PCR protocols for the diagnostic of staphylococcal infectious. *Journal Clinical Microbiology* 2001. 39(9):3332-3338.
11. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibawama K, Kato H. PCR typing of genetics determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram negative bacterial isolated in Japan with focus on the class 3 integron. 2003. *Journal of Clinical Microbiology*.41(12):5407-5413.
12. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K. Class I integron containing metallo-beta-lactamases genes *bla_{VIM-2}* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(2): 626-628.
13. Toleman M, Simm T, Gales A, Iedenbach D, Jones R, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 50: 673-679.
14. Di Conza J, Ayala J, Power P, Mollerach M, Gutkind G. (2002). Novel class I integron (InS21) carrying *bla_{CTX-M-2}* in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 2257-2261.
15. Young D, Lee K, Yum J, Shin R, Rossolini G and Chong Y. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy test to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7: 88-91.
16. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier J, Mugnaioli C, Beonsignori M, Amicosante G y col. Prevalence and Characterization of Metallo- β -lactamases and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease* 2004; 48: 131-135.
17. Torres L, Pedroza R, Díaz S, Hudson V, Morales L. Detección de Genes que Codifican β -Lactamasas de Espectro Extendido de los Grupos CTX-M-1 y CTX-M-2 Asociados a Integrones Clase I en Enterobacterias Aisladas en Centros Hospitalarios. Trabajo no publicado. Universidad Central de Venezuela; 2005.
18. Villegas M, Lolans K, Olivera M, Suarez C, Correa A, Queenan A, Quinn J y the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First Detection of Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50 (1): 226 - 229.
19. Toleman M, Rolston K, Jones R. and Walsh T. *bla_{VIM-2}*, an Evolutionarily Distinct Metallo- β -Lactamase Gene in a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(1): 329-332.