

## Resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* en un periodo de 10 años en el Hospital Rawson.

*Carbapenems resistance in Pseudomonas aeruginosa during a 10-year period at Rawson Hospital.*

Luisa A. Orecchini, Teresa López, Ana Littvik

### Resumen

**Antecedentes:** Pae es un bacilo gram negativo no fermentador que se asocia a infecciones nosocomiales y en inmunocomprometidos. Posee una gran variedad de mecanismos de resistencia natural, y una gran capacidad para adquirir mecanismos nuevos de resistencia. La resistencia a carbapenemes puede ser por mecanismos de impermeabilidad, bombas de eflujo o enzimática (producción de carbapenemasas).

**Objetivos:** determinar los mecanismos prevalentes de resistencia a carbapenemes en Pae y como fueron evolucionando en el período de tiempo seleccionado.

**Materiales y métodos:** se recolectaron 372 cepas de Pae en un periodo de 10 años. Las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y se les realizó prueba de sensibilidad por difusión con discos y la presencia de un mecanismo enzimático de resistencia, por el método microbiológico de Masuda

**Resultados:** los mecanismos de resistencia a carbapenemes para eflujo en el año 2000 fueron de 50%, 2001 16,6%, 2002 6,3%, 2003 23,9%, 2004 18%, 2005 8,8%, 2006 17,8%, 2007 31,8%, 2008 2,5%, 2009 5,2%.; para impermeabilidad 2000 de 33%, 2001 21,4%, 2002 8,5%, 2003 30,4%, 2004 14,7%, 2005 28,8%, 2006 23,5%, 2007 13,6%, 2008 2,5%, 2009 5,2%.

El test microbiológico fue negativo para todas las cepas estudiadas.

**Conclusión:** en nuestra institución la resistencia a carbapenemes en este periodo, fue por impermeabilidad y aumento en la expresión de las bombas de eflujo, y no enzimática. Esto es muy importante desde el punto de vista epidemiológico ya que la diseminación de cepas portadoras de mecanismos de resistencia enzimática por transmisión horizontal es muy rápida.

**Backgrounds:** Pae is a non-fermenting, Gram-negative bacillus that is associated with nosocomial infections and can easily be transmitted through the hands of health staff from patient to patient. Pae has a wide variety of natural resistance mechanisms and a great capacity to acquire new resistance mechanisms or to increase the expression of their natural resistance. Carbapenems resistance may be offered by impermeability mechanisms, increase in the efflux or enzymatic pump (production of carbapenemases).

**Purpose:** To determine prevailing carbapenems resistance mechanisms in Pae and their evolution.

**Materials and methods:** 372 Pae strains were collected during a ten-year period. The strains were identified through biochemical tests and performed a sensitivity test through diffusion and microbiological method.

---

Unidad de Microbiología, Hospital Rawson, Córdoba, Argentina.  
Bajada Pucara 2025  
CP 5014

**Results:** carbapenems resistance mechanisms for efflux in the year 2000 were , 50%; 2001 16.6%, 2002 6.3%, 2003 23.9%, 2004 18%, 2005 8.8%, 2006 17.8%, 2007 31.8%, 2008 2.5%, 2009 5.2%.

As regards impermeability: 2000 33%, 2001 21.4%, 2002 8.5%, 2003 30.4%, 2004 14.7%, 2005 28.8%, 2006 23.5%, 2007 13.6%, 2008 2.5%, 2009 5.2%.

The microbiological test was negative for all studied strains.

**Conclusion:** carbapenems resistance during this period was offered by impermeability and an increase in the expression of the efflux mechanism, not by enzymatic mechanism in our hospital. This is a very important issue from an epidemiological point of view because of the rapid horizontal transmission of the strains with this resistance mechanism.

## Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* (Pae) es un bacilo gram negativo no fermentador que se asocia a infecciones nosocomiales y en inmunocomprometidos ya que posee la capacidad de sobrevivir tanto en ambientes húmedos como antisépticos, aguas de diálisis, etc., como así también en superficies sólidas, equipos hospitalarios como ventilación mecánica respiratoria, equipos de diálisis, etc.,<sup>[1, 2]</sup>. Esto implica un problema hospitalario ya que la misma puede transmitirse fácilmente a través de las manos del personal de salud de paciente a paciente<sup>[1, 2]</sup>. Por eso es necesario extremar las precauciones para evitar la transmisión de este microorganismo, ya sea que este bacilo no fermentador esté colonizando o produciendo infección.

Pae posee una gran variedad de mecanismos de resistencia natural, y también una gran capacidad para adquirir mecanismos nuevos de resistencia o de aumentar la expresión de su resistencia natural. Este hecho provoca gran preocupación dentro del ambiente hospitalario, ya que Pae puede adquirir rápidamente resistencia a muchas drogas antimicrobianas, y de esta manera perjudicar seriamente la vida del paciente.

Pae además es capaz de adquirir múltiples mecanismos de resistencia de manera tal que el perfil de sensibilidad raramente revela un mecanismo puro de resistencia, sino que es una sumatoria de varios mecanismos de resistencia.

Resistencia a beta lactámicos

Puede ser por impermeabilidad, bombas de eflujo o inactivación enzimática.

Por impermeabilidad es resistente natural a macrólidos y glicopéptidos.

La porina oprF es la principal de Pae, su tamaño es pequeño por lo tanto muchos antibióticos quedan excluidos, y a su vez la escasa cantidad de antibiótico que ingresa favorece el mecanismo de acción de las beta lactamasas que rápidamente lo hidrolizan<sup>[3]</sup>. La porina oprD permite el ingreso de los aminoácidos básicos, la disminución de su expresión produce resistencia a imipenem<sup>[4, 5, 6]</sup>, y sensibilidad disminuida a meropenem<sup>[3, 5, 6]</sup>. La pérdida de la porina se debe a la inactivación del gen que regula su expresión<sup>[5, 6]</sup>.

La bomba de eflujo MexEF oprN, que confiere resistencia a quinolonas esta co- regulada con la expresión de oprD, la expresión de la bomba de eflujo produce una disminución de la expresión de la porina, por lo tanto también produce resistencia a imipenem<sup>[3, 5, 6, 7]</sup>.

En cuanto a las bombas de eflujo MexA MexB oprM es constitutiva y se expresa en bajo nivel<sup>[3]</sup>, confiriendo resistencia a ampicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación. Cuando se aumenta su expresión confiere resistencia afectando primero a aztreonam y ticarcilina, luego cefepime y meropenem y luego piperacilina, cef tazidima doripenem y ciprofloxacina<sup>[4, 5, 6, 8]</sup>.

La bomba de eflujo Mex CD oprJ produce resistencia a cefalosporinas de cuarta generación como cefepime<sup>[8]</sup>.

En relación a la producción de enzimas Pae posee una cefalosporinasa cromosómica inducible no inhibible por clavulánico, sulbactam ni tazobactam que le brinda resistencia natural a

ampicilina, amoxicilina clavulánico, ampicilina sulbactam, cefalosporinas de primera y segunda generación [3]. Los antibióticos que inducen la producción de esta enzima son ácido clavulánico y los carbapenemes, estos últimos son resistentes a la acción de la enzima [5]. A diferencia de la enterobacterias la frecuencia de mutación del AmpD es muy baja por lo tanto la derrepresión es infrecuente, la misma suele verse más frecuentemente en fibroquísticos, esto podría deberse a la hipermutabilidad que tienen las cepas de estos pacientes [6]. Sin embargo es más frecuente su hiperproducción [5].

Las betalactamasas de espectro ampliado que adquieren mas frecuentemente son PSE CARB y OXA, otras como TEM 1, TEM 2 y SHV 1 son poco frecuentes. Brindan resistencia a piperacilina y se mantienen sensibles a ceftazidima, aztreonam, y carbapenemes [5].

Las betalactamasas de espectro extendido encontradas mas frecuentemente son GES y OXA, y las menos frecuentes son PER y VEB. Confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactames [5].

Las carbapenemasas son betalactamasas que actúan sobre todos los carbapenemes aparecidos hasta ahora [8]. Se clasifican en metalo betalactamasas (MBL) si contienen en su sitio activo una molécula de zinc perteneciendo al grupo 3 de la clasificación de Bush Jacoby y Medeiros; y al grupo 2 serin betalactamasas si contienen un grupo serin en su sitio activo.

Las MBL son más frecuentes en Pae; son inhibidas por agentes quelantes de cationes divalentes como EDTA debido a la presencia de Zn en su molécula. Esta enzima confiere resistencia todos los betalactámicos excepto a aztreonam [9]. No es inhibible por ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam [5, 10]. En 1990 se detectó el primer caso de carbapenemasas (IMP-1) en Pae en Japón [12] y luego se describieron numerosas: VIM, SPM, IMP, GIM [1, 4, 5, 10, 11] en diferentes países: Italia (Verona), en Francia, en Brasil y en Alemania [12].

## Objetivos

Determinar los mecanismos de resistencia a carbapenemes en Pae prevalentes en nuestro medio.

Describir como han evolucionado dichos mecanismos a lo largo del período considerado.

## Materiales y Métodos

Se recolectaron 372 cepas de Pae de diferentes muestras clínicas durante un período de 10 años comprendido entre 2000 y 2009 De las mismas fueron seleccionadas 85 cepas que mostraron sensibilidad disminuída o resistencia a carbapenemes de acuerdo a las normas CLSI 2009 [13], tomando como punto de corte para sospecha de carbapenemasa un diámetro de imipenem menor o igual a 21mm.

Las muestras estudiadas fueron analizadas según el protocolo WHONET (Programa de Vigilancia de resistencia de la OMS) [14] y correspondieron a muestras respiratorias, orina, sangre y catéter.

Fueron identificadas a través de: coloración de Gram, detección de citocromo oxidasa, demostración de metabolismo no fermentativo en TSI, utilización de citrato, producción de arginina dehidrolasa, gelatinasa y pigmento (piocianina). Se les realizó antibiograma por difusión con discos por el método de Bauer y Kirby [15] a los siguientes antimicrobianos: ceftazidima (30ug); cefepime(30ug); imipenem(10ug); meropenem (10ug); polimixina (300u); piperacilina tazobactam (100/10ug); ciprofloxacina (5ug); piperacilina (100ug); aztreonam (30ug); gentamicina (10ug), amikacina (30ug). Se interpretaron los resultados de los halos de inhibición en las categorías de sensible, intermedio o resistente de acuerdo a las normas CLSI 2009 [13]. Se le colocó un disco de EDTA/SMA, entre los discos de meropenem e imipenem como screening para detectar la presencia de MBL.

A las cepas sospechosas de poseer una carbapenemasa se le realizó el test confirmatorio de resistencia enzimática Masuda, mediante la técnica descrita por Machiaro y col [16]. Se hizo una suspensión bacteriana densa en tubos eppendorf conteniendo 200 uL de buffer fosfato 0.01M PH.

A este inóculo se le agregó 300mg de esferas de zirconio. Se llevó a vórtex por más de 3 minutos. Luego se centrifugó a más de 6000 rpm por 20 minutos. Se goteó discos de papel de filtro estériles con el 10uL del sobrenadante. Esto se realizó con la cepa problema, un control negativo (Pae ATCC 27853) y un control positivo (*Pseudomonas putida* productora de MBL provista por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán) En una placa de Mueller Hinton hisopada con un inóculo 0.5 Mac Farland de *Escherichia coli* ATCC 25922, se colocaron los discos de imipenem y ceftazidima. Los discos con la cepa en estudio, control positivo y negativo se colocaron a 3 mm por dentro del borde del halo de sensibilidad registrado en el último control de calidad interno de la sección antimicrobianos de nuestro hospital.

## Resultados

En el período analizado se aislaron 372 cepas de Pae.

Los perfiles de resistencia para ambos carbapenemes se observan en la tabla 1.

A todas las cepas con perfil genotípico compatible con metalo betalactamasa se les realizó la técnica de Masuda para la detección de resistencia enzimática, y todas fueron negativas.

En cuanto a los mecanismos de resistencia a carbapenemes por eflujo, impermeabilidad y enzimática en el período considerado se muestran en la tabla 2.

No se detectó resistencia enzimática mediante la técnica de Masuda.

En los siguientes histogramas se muestran como

fueron variando los porcentajes de resistencia para los betalactámicos a lo largo del periodo estudiado.

Dichos resultados fueron analizados con el programa WHONET.

El gráfico de resistencia a carbapenemes explica como se fueron comportando los mecanismos de resistencia a carbapenemes a lo largo del periodo estudiado.

## Discusión

Las betalactamasas de espectro extendido (TEM, SHV, PER, VEB, y GES) y las metalobeta lactamasas (incluyendo la familia VIM) se han descrito en Europa, Asia y America [17].

La asociación de betalactamasas de espectro extendido y de metalo betalactamasas se encuentra en raras ocasiones, sin embargo en Argentina se ha descrito la coexistencia de VIM y GES [17].

En el hospital Eva Perón Provincia de Buenos Aires, Argentina, se han detectado en el 2004-2005 18 cepas con IMP 13 [18]. En Argentina el número de aislamientos está en ascenso.

Se han publicado un gran número de casos de Pae multiresistentes; en Texas en 2005-2007 se realizó un estudio en el cual de 235 aislamiento, 33 fueron cepas multiresistentes, en cuanto a la resistencia a carbapenemes, el 44% se debió a hiperexpresión de MexAB, y solo se encontró un caso de resistencia enzimática por VIM [19].

En Francia se publicó un trabajo de prevalencia en *Pseudomonas* multiresistentes donde se halló que 474 aislamientos, 24 presentaban pérdida de la porina D2 y un 78% de resistencia a meropenem de los cuales un 60% presentaban

Año	N	Imipenem %	Meropenem %	Año	N	Imipenem %	Meropenem %
2000	6	0	50	2005	34	14.7	5.9
2001	42	27.5	30.8	2006	34	6.7	0
2002	47	19.5	17.4	2007	44	4.5	9.1
2003	46	30.4	26.7	2008	39	12.8	17.9
2004	54	18.5	16.7	2009	19	15.8	15.8

Tabla 1

hiperexpresión de bombas de eflujo (un 28% del total de aislamientos) [20].

	N	Eflujo	Impermeabilidad	Enzimática
2000	6	50	33	0
2001	42	16.6	21.4	0
2002	47	6.3	8.5	0
2003	46	23.9	30.4	0
2004	54	18	14.7	0
2005	34	8.8	2.8	0
2006	34	17.6	23.5	0
2007	44	31.8	13.6	0
2008	39	2.5	2.5	0
2009	19	5.2	5.2	0
<b>Total</b>	<b>365</b>	<b>16.1</b>	<b>14.7</b>	<b>0</b>

Tabla 2

En 1990 se detectó el primer caso de carbapenemasas (IMP-1) en Pae en Japón [12] y luego se describieron numerosas: VIM, SPM, IMP, GIM [1, 4, 5, 10, 11] en diferentes países: Italia (Verona), en Francia, en Brasil y en Alemania [12].

De esta manera la prevalencia de carbapenemasas se ha incrementado con el paso del tiempo, diseminándose a Estados Unidos y Canadá con informes de VIM y IMP [12].

Se han informado en Australia, y en distintos centros médicos de la India [12, 21].

En Taiwan el primer aislamiento fue en 2001 de VIM 3. En esta publicación se encontró una prevalencia de resistencia enzimática de 1,9% para VIM 2 y de 28,6% para VIM 3, en 308 cepas de Pae resistente a carbapenemes [22].

Nuestro trabajo demuestra que hay una sumatoria de resistencias involucrando varios mecanismos. En nuestra institución a la fecha (2009), la resistencia a carbapenemes al igual que en la mayor parte del mundo se debe a mecanismos de impermeabilidad e hiperexpresión de bombas de eflujo pero a diferencia de otras instituciones de Argentina y el resto del mundo no hubo resistencia por carbapenemasas.

## Conclusiones

En el período estudiado no se demostró resistencia enzimática a carbapenemes. Es probable que los únicos mecanismos implicados hasta ahora son por impermeabilidad por pérdida de las porinas y al aumento de expresión de la bomba de eflujo.

La ausencia de resistencia enzimática adquiere gran relevancia desde el punto de vista epidemiológico ya que la transmisión horizontal de este mecanismo es muy rápida.

La presencia de carbapenemasas confiere una alta probabilidad de falla de tratamiento y aumenta la morbimortalidad. Es importante la detección temprana de las mismas, dentro de las 72 horas de iniciado el tratamiento.

Es imprescindible contar en las instituciones del cuidado de la salud, con personal entrenado en la metodología de detección de estos mecanismos de resistencia y en la correcta interpretación de una prueba de sensibilidad antimicrobiana.

## Bibliografía

- [1] Paterson D. *The Epidemiological Profile of Infections with Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter Species*. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:S43–8.
- [2] Bertrand X., Bailly P., Blasco G., Balvay P., Boillot A., Talon D. *Large Outbreak in a Surgical Intensive Care Unit of Colonization or Infection with Pseudomonas aeruginosa that Overexpressed an Active Efflux Pump*. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31:e9–14.
- [3] Livermore D. *Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Our Worst Nightmare?*. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34:634–40.
- [4] Laupland K., Parkins M., Church D., Gregson D., Louie T., Conly J., Elsayed S., Pitout J. *Population-Based Epidemiological Study of Infections Caused by Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa in the Calgary Health Region: Importance of Metallo- $\beta$ -Lactamase (MBL)-Producing Strains*. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192:1606–12.
- [5] Bonomo R., Szabo D. *Mechanisms of Multidrug Resistance in Acinetobacter Species and Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:S49–

- 56.
- [6] Wolter D., Acquazzino D., Goering R., Sammut P., Khalaf N., Hanson N. Emergence of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Patient with Cystic Fibrosis in the Absence of Carbapenem Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:e137–41.
- [7] Lister P., Wolter D. Levofloxacin-Imipenem Combination Prevents the Emergence of Resistance among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40:S105–14.
- [8] Rice L. Challenges in Identifying New Antimicrobial Agents Effective for Treating Infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:S100–5.
- [9] Paterson D. Serious Infections in the Intensive Care Unit: *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:S41–2.
- [10] Yoichi Hirakata, Toshiyuki Yamaguchi, a Michiko Nakano, Koichi Izumikawa, Mariko Mine, Shiho Aoki, Akira Kondoh, Junichi Matsuda, Mitsukuni Hirayama, Katsunori Yanagihara, Yoshitsugu Miyazaki, Kazunori Tomono, Yasuaki Yamada, Shimeru Kamihira, and Shigeru Kohno. Clinical and Bacteriological Characteristics of IMP-Type Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37:26–32.
- [11] Fritsche T., Sader H., Toleman M., Timothy R. Walsh T., Jones R. Emerging Metallo- $\beta$ -Lactamase-Mediated Resistances: A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:S276–8.
- [12] Queenan A., Bush K. Carbapenemases: the Versatile Lactamases. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, July 2007, p. 440–458.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testsc Approved Standard. Tenth edition. 2009
- [14] WHONET. Programa de vigilancia de Resistencia de la OMS. John Stelling, MD, MPH. Collaborating Centre for Surveillance of Antimicrobial Resistance Brigham and Women's Hospital, Boston.
- [15] Bauer, Kirby. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-496.
- [16] Marchiaro P., Mussi M., Ballerini V., Pasteran F., Viale A., Vila A., Limansky A. Sensitive EDTA-Based Microbiological Assays for Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamases in Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Nov. 2005, p. 5648–5652.
- [17] Pasteran F., Faccone D., Petroni A., Rapoport M., Galas M., Vázquez M., Procopio A. Novel Variant (blaVIM-11) of the Metallo- $\beta$ -Lactamase blaVIM Family in a GES-1 Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in Argentina. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Jan. 2005, p. 474–475.
- [18] Santella G., Cuirolo A., Almuzara M., Palombarani S., Sly G., Radice M., Gutkind G. Full Resistance and Decreased Susceptibility to Carbapenems in IMP-13-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from an Outbreak. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Mar. 2010, p. 1381–1382.
- [19] Tam V., Chang K., Abdelraouf K., Brioso C., Ameka M., McCaskey L., Weston J., Caeiro J., Garey K. Prevalence, Resistance Mechanisms, and Susceptibility of Multidrug-Resistant Bloodstream Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Mar. 2010, p. 1160–1164
- [20] Rodríguez-Martínez J. M., Poirel L., Nordmann P. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Nov. 2009, p. 4783–4788.
- [21] Castanheira M., Bell J., Turnidge J., Mathai D., Jones R. Carbapenem Resistance among *Pseudomonas aeruginosa* Strains from India: Evidence for Nationwide Endemicity of Multiple Metallo- $\beta$ -Lactamase Clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the Newly Characterized VIM-18). *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Mar. 2009, p. 1225–1227.
- [22] Sung-Pin Tseng, Jui-Chang Tsai, Lee-Jene Teng and Po-Ren Hsueh. Dissemination of transposon Tn6001 in carbapenem-non-susceptible and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009) 64, 1170–1174.