

Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires

D. CEJAS^{1*}, M. ALMUZARA², G. SANTELLA¹, A. TUDURI², S. PALOMBARANI², S. FIGUEROA², G. GUTKIND¹, M. RADICE¹.

¹Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Junín 954, (1113) Buenos Aires

²Laboratorio de Bacteriología, Hospital Interzonal General de Agudos "Eva Perón", San Martín, Provincia de Buenos Aires. Argentina.

*Correspondencia. E-mail: danielacejas@ffyb.uba.ar

RESUMEN

En el presente estudio, que tuvo por objeto analizar los mecanismos involucrados en la resistencia a carbapenemes, se incluyeron 129 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados durante el año 2006 en el Hospital "Eva Perón" de la Provincia de Buenos Aires. La caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia permitió reconocer la presencia de metalo- β -lactamasas (MBL) en el 14% de esos aislamientos. En todos ellos se identificó la presencia de la enzima IMP-13; sin embargo, algunos aislamientos resultaron sensibles a carbapenemes de acuerdo a los puntos de corte establecidos por el CLSI e incluso a las sugerencias de la Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC, AAM. El ensayo de detección fenotípica de MBL de sinergia con doble disco resultó útil en este estudio. Sólo aquellos aislamientos productores de IMP-13 que a su vez presentaron alteraciones en las proteínas de membrana externa resultaron completamente resistentes a imipenem. Los aislamientos productores de MBL correspondieron a varios tipos clonales, lo cual sugiere no sólo la diseminación de una cepa resistente, sino también la diseminación horizontal de este mecanismo de resistencia entre clones diferentes.

Palabras clave: carbapenemasas, metalo- β -lactamasas, resistencia a carbapenemes

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Buenos Aires. From 129 *P. aeruginosa* isolated at a health care centre located in Buenos Aires (Hospital "Eva Perón"), 14% produced IMP-13. Although 18 isolates were metalo- β -lactamasases (MBL) producers, only those isolates that displayed altered outer membrane protein profiles correlated with the resistant category according to CLSI or even Subcomisión de Antimicrobianos, SADEBAC, AAM. Phenotypic screening of metalo- β -lactamasases proved to be appropriate for detecting MBL producing isolates. IMP-13 producing isolates corresponded to at least five different clonal types, which not only suggests the dissemination of the resistant strain but also of the resistant marker.

Key words: carbapenemasases, metalo- β -lactamasases, carbapenem resistance

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos recuperados con más frecuencia en infecciones hospitalarias. Las infecciones causadas por este microorganismo suelen resultar complicadas y están asociadas a un alto índice de mortalidad. Los carbapenemes constituyen la opción terapéutica más utilizada en cuadros severos producidos por bacilos gram-negativos no fermentadores, en los cuales es frecuente la multiresistencia a otros antibióticos. La resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa* ha sido descrita en diversas partes del mundo y se considera un problema terapéutico creciente (7, 30); en nuestro país se ha documentado en el 26% de los aislamientos (31).

P. aeruginosa puede adquirir fácilmente resistencia a la mayoría de las drogas de utilización clínica a través de mutaciones en los genes codificantes o reguladores de los mecanismos involucrados en su resistencia natural (12, 14, 18, 19, 24), o a través de la adquisición de determinantes genéticos de enzimas con capacidad de hidrolizar carbapenemes (9). Las mutaciones que conducen a la pérdida de la proteína OprD contribuyen a la resistencia a imipenem y a la disminución de la sensibilidad a meropenem (29), mientras que aquellas que determinan el incremento en la expresión de los sistemas de eflujo de tipo Mex pueden conferir resistencia o sensibilidad reducida a los β -lactámicos, excepto a imipenem (4, 20, 21). Por su parte, la hiperproducción de enzimas

de tipo AmpC se asocia a la resistencia a penicilinas y cefalosporinas (13).

La adquisición de genes codificantes de metalo- β -lactamasas (MBL) constituye un mecanismo de resistencia con alta implicancia epidemiológica debido a su capacidad de diseminación horizontal (36). Estas enzimas pertenecen a la clase molecular B de Ambler (1) y se caracterizan por presentar un amplio perfil de sustratos, que incluye cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima, ceftacidima y cefepime) y carbapenemes (imipenem y meropenem), pero no hidrolizan monobactamas (aztreonam); no son afectadas por los inhibidores de uso clínico y su actividad es susceptible a quelantes como el EDTA (25). Se conocen diversos grupos de MBL: IMP, VIM, SPM, GIM-1, SIM-1 y AIM-1. Las enzimas de tipo IMP y VIM constituyen las más ampliamente diseminadas en el mundo (5, 30, 36, 38). Éstas han sido descritas principalmente en *P. aeruginosa* y otros microorganismos no fermentadores, y con menor frecuencia en enterobacterias. Los genes codificantes de MBL, a excepción de *spm-1*, se encuentran como genes en *cas-sette* reclutados en integrones de clase 1 o clase 3, que pueden, a su vez, estar localizados en plásmidos y transposones; esto contribuiría a la amplia diseminación de estos genes de resistencia (36).

A pesar de que en otras partes del mundo han sido ampliamente documentadas, en nuestro país las MBL se detectaron recién en el año 2002 (27), y hasta la fecha fueron informadas las enzimas VIM-2, VIM-11, IMP-13 y SPM-1 (3, 6, 26, 28).

Estudios previos han demostrado que alteraciones en la expresión de la proteína OprD y la sobreexpresión de las bombas de eflujo de la familia RND (*resistant-nodulation-cell division*) en cepas productoras de MBL incrementan los niveles de resistencia a imipenem y meropenem, respectivamente (17, 37).

En este trabajo se analizaron los mecanismos responsables de la resistencia o la sensibilidad disminuida a carbapenemes en *P. aeruginosa* aisladas de pacientes internados en el Hospital Interzonal General de Agudos "Eva Perón" de la Provincia de Buenos Aires durante el año 2006. Se intentó caracterizar fenotípica y genotípicamente las MBL presentes y las posibles alteraciones en la membrana externa, para analizar la correlación entre los mecanismos detectados y los respectivos fenotipos de resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos: Se incluyeron aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes internados en diferentes servicios del Hospital "Eva Perón" de la Provincia de Buenos Aires, durante el año 2006, que presentaron resistencia a ceftacidima y disminución de la sensibilidad poblacional a imipenem, determinadas por el ensayo de difusión en agar según el CLSI. Se entiende como

disminución de la sensibilidad poblacional a la presencia de halos de inhibición que, si bien no resultan inferiores a los puntos de corte de resistencia del CLSI, se alejan de los obtenidos para la población salvaje (16).

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos: Los ensayos de sensibilidad por difusión en agar y la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en medio sólido se realizaron según las recomendaciones del CLSI (22, 23) y de la Subcomisión de Antimicrobianos, SADEBAC-AAM (33). Se ensayaron los siguientes antibióticos: ceftacidima (CAZ), ceftacidima/clavulánico (CAC), piperacilina/tazobactam (PTZ), imipenem (IMI) y meropenem (MER) (Laboratorio Britania); se incluyeron discos de EDTA (1 μ mol). Los discos conteniendo antibióticos fueron ubicados de acuerdo al esquema sugerido por la Subcomisión de Antimicrobianos. La CIM se ensayó para los siguientes antibióticos dentro de los rangos que se indican (en μ g/ml): piperacilina (PIP) (1-128), PTZ (1-128), CAZ (16-1024), cefepime (FEP) (16-1024), aztreonam (AZT) (0,5-128), IMI (0,5-32), MER (1-128), amikacina (AKN) (0,5-128), gentamicina (GEN) (0,5-128), ciprofloxacina (CIP) (0,5-128).

Detección fenotípica de metalo- β -lactamasas: Se realizaron ensayos de sinergia de doble disco empleando EDTA (1 μ mol) como inhibidor de las MBL (26), sobre la base del ensayo de sinergia descrito inicialmente por Arakawa *et al.* (2). Para ello se inocularon las placas según las recomendaciones del CLSI para la prueba de difusión, y se colocaron discos conteniendo EDTA (1 μ mol) y discos comerciales conteniendo CAZ y con IMP a 15 mm de distancia, centro a centro del primero. 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 MBL.

Detección del perfil de sustratos de las β -lactamasas: Se obtuvieron extractos enzimáticos crudos por ruptura ultrasónica de los cultivos bacterianos. Se evaluó el perfil de hidrólisis de sustratos por el método iodométrico en agar, utilizando como sustratos ampicilina (AMP) (500 μ g/ml), CAZ (1000 μ g/ml) e IMI (1000 μ g/ml) (32).

Determinación del perfil de proteínas de membrana externa (OMP): La extracción de porinas se realizó según el método de Hancock y Poxton (10) y los perfiles fueron resueltos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), empleando un marcador de peso molecular de proteínas (Bio-Rad). Se seleccionaron para este ensayo los siguientes aislamientos, que presentaron distintos niveles de resistencia a carbapenemes y fueron productores o no productores de MBL: aislamiento 145, productor de IMP-13 ($CIM_{IMI} > 32$ μ g/ml); aislamiento 152, productor de IMP-13 ($CIM_{IMI} = 8$ μ g/ml); aislamiento 208, productor de IMP-13 ($CIM_{IMI} = 8$ μ g/ml); aislamiento 255, no productor de MBL ($CIM_{IMI} = 16$ μ g/ml). Se incluyó en el ensayo la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 como control.

Detección de la presencia de genes codificantes

de MBL: Se realizó un ensayo de Multiplex-PCR empleando como molde ADN total (8). Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos (5'-3'): VIMG-F: TCT ACA TGA CCG CGT CGT CTG TC, VIM-R mult: CGA ATG CGC AGC ACC AG; IMPA-F: CTA CCG CAG CAG AGT CTT TGC, IMP-R mult: CCA AAC YAC TAS GTT ATC T; SPM-F mult: AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG, SPM-R mult: ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG; GIM-F mult: TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA, GIM-R mult: AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC; SIM-F mult: TAC AAG GGA TTC GGC ATC G, SIM-R mult: TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG. Los reactivos empleados fueron de Invitrogen (USA). Se empleó un termociclador BIOMETRA T-Gradient (Germany) y la siguiente reacción de amplificación: desnaturalización 94 °C, 5 minutos; seguida de 36 ciclos de: desnaturalización 94 °C, 30 segundos; hibridación 52 °C, 40 segundos; amplificación 72 °C, 50 segundos; y un período final de elongación 72 °C, 5 minutos. Los fragmentos esperados fueron: *imp*: 188 pb, *vim*: 390 pb, *spm*: 271 pb, *gim*: 477 pb, *sim*: 570 pb.

Determinación de la localización de los genes codificantes de MBL:

Se amplificó por PCR la región variable de integrones de clase 1 a partir de DNA total. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos (5'-3'): 5' C: GGC ATC CAA GCA GCA AGC, 3' C: AAG CAG ACT TGA CCT GAT. Los reactivos empleados fueron de Invitrogen (USA). Se empleó un termociclador BIOMETRA T-Personal (Germany) y la siguiente reacción de amplificación: desnaturalización a 95 °C, 5 minutos; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto; hibridación a 52 °C, 1 minuto; amplificación a 72 °C, 2 minutos; y un período final de elongación a 72 °C, 20 minutos. Se empleó un kit de Bioneer (USA) para purificar las bandas correspondientes a las regiones variables. Se realizó una PCR empleando cebadores específicos para *imp*, utilizando como molde el amplicón correspondiente a las regiones variables. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos (5'-3'): IMP-AF: GAA GGC GTT TAT GTT CAT ACT T, IMP-AR: GTT TTG CCT TAC CAT ATT TGG A. Los reactivos empleados fueron de Invitrogen (USA). Se empleó un ciclador BIOMETRA T-Personal (Germany) y la siguiente reacción de amplificación: desnaturalización 95 °C, 5 minutos; seguida de hibridación 52 °C, 15 minutos, con el agregado de la *Taq* polimerasa a los 6 minutos; y amplificación 72 °C, 6 minutos; seguida de 29 ciclos de desnaturalización 95 °C, 1 minuto; hibridación a 52 °C, 1 minuto; amplificación 72 °C, 1 minuto; y un período final de elongación 72 °C, 20 minutos. El fragmento esperado fue de 0,4 kb.

Secuenciación de los productos amplificados: Las secuencias nucleotídicas de los distintos fragmentos amplificados fueron determinadas por el servicio de secuenciación de Macrogen (Corea), empleando el sistema ABI Prism DNA 3700. Se usó la herramienta Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National*

Center for Biotechnology Information) para comparar con las secuencias génicas depositadas en base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Tipificación molecular de los aislamientos productores de MBL:

Se amplificaron por PCR las secuencias repetitivas del DNA: REP-PCR, ERIC-PCR a partir de DNA total (34). Se emplearon los siguientes oligonucleótidos (5'-3'): REP-1: IIIGCGCCGICATCAGGC, REP-2: ACGTCTTATCAGGCCTAC; ERIC-1: CACTTAGGGGTCCTCAATGTA, ERIC-2: AAGTAAGTGACTGGGGT-GAGCG. Los reactivos empleados fueron de Invitrogen (USA). Se empleó un ciclador Biometra T-Personal (Germany) y las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización a 94 °C, 2 minutos; seguida de 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C, 30 segundos; hibridación a 50 °C, 1 minuto; amplificación a 72 °C, 4 minutos; y un período de extensión final a 72 °C, 7 minutos. El patrón de bandas fue visualizado con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La matriz de similitud fue realizada empleando el programa TREECON y se construyeron dendrogramas basados en el algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method arithmetic averages*).

RESULTADOS

Durante el año 2006 se recolectaron un total de 129 aislamientos de *P. aeruginosa*, de los cuales 36 resultaron resistentes a ceftadima. En 18 de ellos se sospechó la presencia de MBL en el ensayo de difusión realizado según las recomendaciones de la Sub-comisión de Antimicrobianos, ya que se observó sinergia entre los carbapenemes y el disco que contenía EDTA (Figura 1a). Los resultados fueron concordantes con el ensayo de detección fenotípica de MBL (Figura 1b). Estos aislamientos resultaron también resistentes a CAC, FEP, AZT, AKN, GEN y CIP (Tabla 1), y hubo concordancia de los resultados obtenidos en los ensayos por dilución y por difusión. Todos fueron sensibles a PTZ en el ensayo por difusión, mientras que dos presentaron resistencia cuando se determinó la CIM a esta combinación. Sin embargo, no se observó buena correlación en los resultados de sensibilidad a los carbapenemes entre los ensayos por dilución y por difusión: 8 aislamientos que fueron sensibles a imipenem en el ensayo por difusión resultaron de sensibilidad intermedia en el ensayo por dilución (Tabla 1). Esta discordancia fue observada en trabajos previos (26), en especial para FEP.

Por otro lado, se observó asociación en la resistencia a los distintos carbapenemes ensayados, ya que los aislamientos que fueron resistentes a meropenem también lo fueron a imipenem. Sólo 7 de los 18 aislamientos resultaron resistentes a imipenem en los ensayos de sensibilidad por difusión de acuerdo a los puntos de corte del CLSI. Incluso si se tiene en cuenta lo sugerido por la Subcomisión de Antimicrobianos acerca de que los halos menores o iguales a 21 mm podrían ser considerados

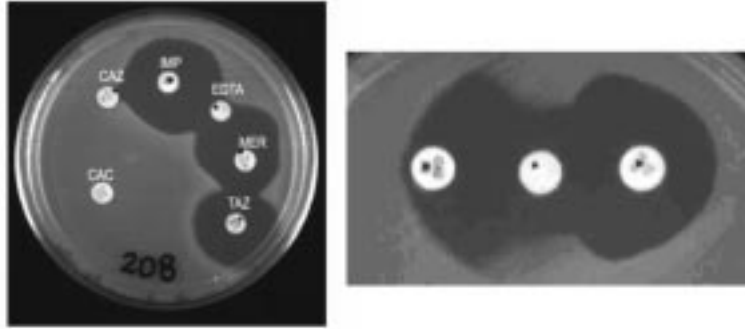


Figura 1. a) ensayo de sensibilidad a antimicrobianos por difusión en agar correspondiente al aislamiento 208 empleando el esquema sugerido por la Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC. CAZ: ceftacidima, IMI: imipenem, MER: meropenem, TAZ: piperacilina-tazobactama, CAC: ceftacidima-clavulánico. b) ensayo de detección fenotípica de MBL por el método de doble disco empleando EDTA (1 μ mol), correspondiente al aislamiento 208.

como sospechosos de producir MBL, sólo 11 de los 18 aislamientos quedarían incluidos con este criterio.

La sensibilidad a AZT en microorganismos resistentes a carbapenemes resulta un buen indicador de la presencia de MBL; sin embargo, la resistencia a dicho agente no descarta su presencia, dado que la resistencia a AZT podría deberse a otros mecanismos no analizados en el presente estudio (26).

Los extractos enzimáticos correspondientes a esos 18 aislamientos fueron activos frente a AMP, CAZ e IMI; la hidrólisis de este último indica claramente la presencia de una carbapenemasa.

La detección de genes codificantes de MBL por Multiplex-PCR reveló la presencia de *imp* en los 18 aislamientos que presentaron sinergia con EDTA, mientras que la detección de genes codificantes de MBL fue negativa en el resto de los aislamientos, lo que indica que los ensayos de detección fenotípica resultaron adecuados. La amplificación por PCR del segmento variable de integrones de clase 1 permitió evidenciar la presencia de al menos una región variable de 1,5 kb en todos los casos. Se confirmó la localización de *imp* en dicho fragmento por PCR anidada. La secuenciación de los amplicones de 1,5 kb permitió identificar la presencia del gen *imp-13* como primer gen en *cassette*, seguido del gen codificante de una enzima modificadora de aminoglucósidos de tipo acetilante, *aacA4* (Figura 2).

Al comparar los perfiles de OMP de los aislamientos productores de IMP-13, se observó en el aislamiento resistente a imipenem la desaparición de una banda proteica de aproximadamente 46 kDa, presente en los aislamientos que no mostraron resistencia a imipenem y en la cepa control (Figura 3). De acuerdo a lo descrito en la bibliografía (24), esta banda correspondería a una porina que permite la entrada de imipenem en *P. aeruginosa* (OprD), aunque sería necesario contar con anticuerpos específicos para poder confirmarlo. Por otro

lado, en el perfil correspondiente al aislamiento de *P. aeruginosa* 255 (no productor de MBL), se observa la desaparición de la misma banda proteica (Figura 3); este aislamiento presenta una CIM de IMI de 16 μ g/ml. Estos resultados permitirían confirmar que la disminución en la expresión de una porina en los aislamientos productores de IMP-13 conduciría a francas resistencias a imipenem, mientras que la producción de esta enzima en presencia de patrones no alterados de porinas no sería suficiente para elevar la CIM de imipenem por encima de los puntos de corte de resistencia.

A través de los ensayos de tipificación molecular se pretendió analizar si los aislamientos productores de IMP-13 eran el resultado de la diseminación de un único clon o si existiría más de una línea clonal. En el dendrograma obtenido por ERIC-PCR se observaron tres grupos, E1, E2 y E3, el primero integrado por 15 aislamientos que no pudieron ser discriminados entre sí (Figura 4). Cuando se analizó el dendrograma obtenido por REP-PCR se observó la presencia de al menos 5 grupos (R1 a R5), algunos de ellos con aislamientos que presentaron entre sí más de un 90% de similitud (Figura 4). Combinando los resultados obtenidos con ambas técnicas se definieron los diferentes grupo clonales que se muestran en la Tabla 1.

DISCUSIÓN

La prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* productores de MBL en el Hospital "Eva Perón" durante el año 2006 fue de 14%, y éstos fueron recuperados en su mayoría de pacientes internados en la Unidad de Cuidados Intensivos (14/18 aislamientos). Pese a ser productores de MBL, sólo 7 de ellos resultaron clínicamente resistentes a carbapenemes. Considerando las recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos se logró incrementar las detecciones, pero éstas no resultaron adecuadas para todos los microorganismos ensayados,

Tabla 1. Datos y perfil de sensibilidad de los aislamientos productores de MBL

Datos de los aislamientos		Valores de CIM en µg/ml/diámetro halos de inhibición de antibiogramas en mm (R: resistente, I: intermedio, S: sensible)											
<i>P. aeruginosa</i> (grupo clonal)	Fecha de aislamiento	Muestra	Servicio	IMI	MER	PIP	TAZ	CAZ	FEP	AZT	AKN	GEN	CIP
145 (E1-R2)	08/02/06	liquido abdominal	Cirugía/UCI	≥32 R/14 R	128 R/6 R	16 S	64 S/26 S	512 R/6 R	256 R	≥32 R	32 R	8 R	≥64 R
146 (E1-R2)	13/02/06	punta de catéter y hemocultivos	UCI ⁽¹⁾	≥32 R/15 R	128 R/6 R	32 S	64 S/25 S	512 R/6 R	256 R	≥32 R	64 R	16 R	≥64 R
150 (E1-R2)	14/02/06	aspirado traqueal	CM ⁽²⁾	≥32 R/13 R	128 R/6 R	16 S	32 S/25 S	512 R/6 R	256 R	≥32 R	128 R	16 R	≥64 R
152 (E1-R1)	16/02/06	herida en muslo	UCI	8 I/24 S	4 S/24 S	16 S	32 S/24 S	512 R/6 R	128 R	≥32 R	128 R	16 R	≥64 R
173 (E1-R2)	27/04/06	escara sacra infectada	CM	16 R/8 R	≥16/6 R	32 S	64 S/25 S	512 R/6 R	128 R	≥32 R	128 R	8 R	≥64 R
178 (E1-R1)	22/05/06	punta de catéter y hemocultivos	Cirugía/UCI	≥32 R/17 R	128 R/6 R	32 S	64 S/24 S	1024 R/6 R	256 R	≥32 R	32 R	8 R	≥64 R
180 (E1-R1)	27/05/06	punta de catéter	UCI	>32 R/14 R	64 R/6 R	64 S	128 R/25 S	128 R/6 R	128 R	≥32 R	≥128 R	16 R	≥64 R
192 (E3-R5)	06/06/06	minibal	UCI	8 I/24 S	4 S/22 S	16 S	32 S/25 S	512 R/6 R	128 R	≥32 R	128 R	16 R	≥64 R
206 (E1-R4)	28/06/06	minibal	UCI	8 I/24 S	4 S/23 S	16 S	32 S/26 S	512 R/6 R	128 R	≥32 R	128 R	16 R	≥64 R
207 (E1-R3)	04/07/06	minibal	UCI	8 I/22 S	4 S/26 S	16 S	32 S/25 S	256 R/6 R	128 R	32 R	≥128 R	16 R	≥64 R
208 (E1-R1)	07/07/06	aspirado traqueal	UCI	8 I/22 S	8 I/19 S	16 S	64 S/24 S	512 R/6 R	256 R	32 R	64 R	16 R	≥64 R
210 (E1-R1)	13/07/06	minibal	UCI	8 I/22 S	4 S/20 S	32 S	64 S/25 S	512 R/6 R	256 R	≥32 R	64 R	16 R	≥64 R
211 (E1-R4)	22/07/06	escara sacra infectada	CM	8 I/21 S	2 S/21 S	32 S	64 S/24 S	512 R/6 R	256 R	≥32 R	64 R	16 R	≥64 R
216 (E1-R1)	23/08/06	minibal	UCI	8 I/17 S	8 I/16 S	32 S	64 S/22 S	1024 R/6 R	256 R	≥32 R	>128 R	16 R	≥64 R
217 (E1-R1)	28/08/06	minibal	UCI	8 I/21 S	4 S/17 S	16 S	64 S/23 S	512 R/6 R	128 R	≥32 R	128 R	16 R	≥64 R
237 (E1-R4)	18/10/06	aspirado traqueal	UCI	8 I/22 S	2 S/21 S	16 S	32 S/22 S	512 R/6 R	128 R	32 R	64 R	8 R	≥64 R
281 (E2-R1)	27/11/06	LCR ⁽³⁾	UCI Peditría	≥32 R/15 R	64 R/6 R	64 S	64 S/20 S	512 R/6 R	128 R	≥32 R	64 R	16 R	≥64 R
M2245 (E2-R1)	01/12/06	partes blandas prepucio y escroto	CM	≥32 R/6 R	128 R/6 R	128 R	128 R/25 S	≥1024 R/6 R	512 R	≥32 R	≥128 R	16 R	≥64 R

⁽¹⁾UCI: Unidad de cuidados intensivos, ⁽²⁾CM: clínica médica, ⁽³⁾LCR: Líquido cefalorraquídeo

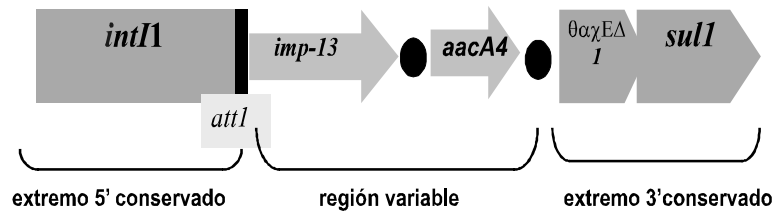


Figura 2. Entorno genético de *imp-13*. *intI1*: gen codificante de la integrasa, *attI*: sitio de recombinación específica, *imp-13*: gen codificante de la MBL IMP-13, *aacA4*: gen codificante de la enzima modificadora de aminoglucósidos de tipo acetilante, *qacΔ1*: gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario, *sulI*: gen de resistencia a sulfamidas.

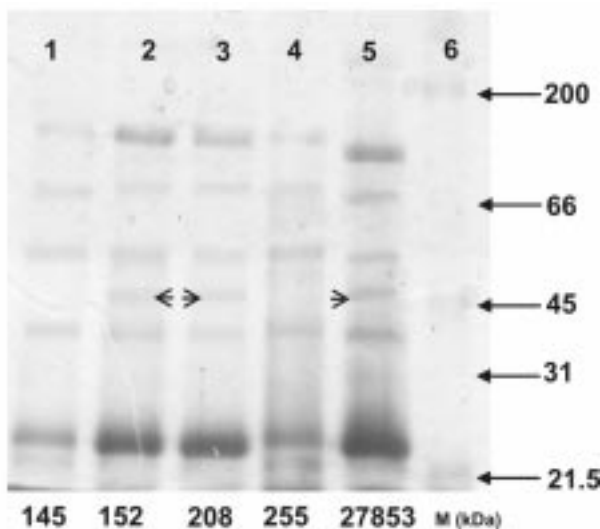


Figura 3. Perfil de OMP en un gel de poliacrilamida al 12%. Calle 1: aislamiento 145 productor de IMP-13 resistente a IMI, calle 2: aislamiento 152 productor de IMP-13 de resistencia intermedia a IMI, calle 3: aislamiento 208 productor de IMP-13 de resistencia intermedia a IMI, calle 4: aislamiento 255 no productor de MBL resistente a IMI, calle 5: cepa ATCC 27853, calle 6: marcador de peso molecular de proteínas. Las flechas sobre las calles 2, 3 y 5 indican la banda de 46 kDa.

ya que 7 aislamientos productores de IMP-13 presentaron halos de inhibición de IMI mayores al punto de corte sugerido. Esto constituye un llamado de atención, el cual debería ser corroborado con un número mayor de aislamientos. Si bien dichos aislamientos fueron categorizados como sensibles, presentaron halos de inhibición entre 22 y 24 mm, los cuales se alejan de los halos observados para la población de *P. aeruginosa* no productora de mecanismos de resistencia (halos de imipenem de 28 a 32 mm). Por otro lado, la CIM de IMI de dichos aislamientos fue de 8 µg/ml (nivel intermedio), lo cual sugiere que la determinación de la CIM resultaría más adecuada en la detección de microorganismos que presentan mecanismos de resistencia.

Si bien ha sido descrito que la participación de mecanismos de resistencia tales como la pérdida de OprD o la hiperproducción de sistemas de eflujo elevan los niveles de CIM de carbapenems en cepas productoras de MBL (11, 17, 35), en este trabajo la alteración en dicha porina resultó necesaria para conferir resistencia fenotípica a imipenem. La producción de IMP-13 parecería requerir de la presencia simultánea de otros mecanismos. Así, los aislamientos productores de dicha enzima en los que se observó una disminución en la expresión de OprD presentaron franca resistencia a imipenem, fácilmente detectable en los ensayos de sensibilidad. Si bien esto no fue analizado en el presente estudio, es probable que la resistencia a meropenem esté asociada a la sobreexpresión de MexEF-OprN, ya que existe correlación entre la sobreexpresión de esta bomba y la disminución en la expresión de OprD (15, 29).

La ocurrencia de aislamientos productores de MBL en este hospital parece deberse no solo a la diseminación de algunas cepas multirresistentes, sino también a la diseminación horizontal del marcador de resistencia. Considerando que algunos aislamientos productores de IMP-13 resultan indistinguibles clonalmente por ambos métodos empleados (E1-R1) y que algunos de ellos presentan sensibilidad disminuida a carbapenems mientras que otros presentan francas resistencias (por déficit de OprD), es posible pensar en la selección de estos últimos a partir de los primeros; por ello resultaría conveniente la inclusión de los ensayos de detección fenotípica de MBL en todas las *P. aeruginosa* que presenten sensibilidad disminuida a carbapenems.

Agradecimientos: Este trabajo fue parcialmente financiado con subsidios de la ANPCyT y UBACyT a Gabriel Gutkind.

BIBLIOGRAFIA

1. Ambler R, Coulson A, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, *et al.* A standard numbering scheme for the class A β-lactamases. *Biochem J* 1991; 276: 269-72.

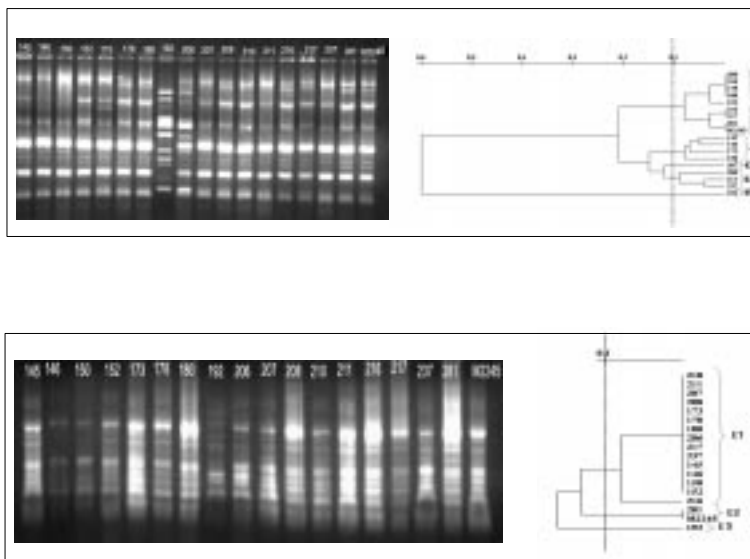


Figura 4. Tipificación de los aislamientos productores de IMP-13; a) REP-PCR, b) ERIC-PCR

2. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, *et al.* Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 40-3.
3. Bucca R, Mastroberti M, Centron D, Jorda Vargas L, Kovensky J. Emergencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas* spp. provenientes de infecciones en pacientes quemados. Congreso SADEBAC 2006, 2006, p. 16560.
4. Cavallo J, Hocquet D, Plesiat P, Fabre R, Roussel-Delvallez M. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1021-4.
5. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Canton R, Cauda R, Docquier JD, *et al.* Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 380-8.
6. Cuirolo A, Radice M, Gutkind G. Molecular characterization of Imp-13 producing *Pseudomonas aeruginosa*. 46th. ICAAC, 2006, Abstract C2-415, pag. 109, San Francisco, USA.
7. Docquier J, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing Per-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and Vim-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 910-1.
8. Ellington M, Kistler J, Livermore D, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 321-2.
9. Gutierrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, *et al.* Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4329-35.
10. Hancock I, Poxton I. *Bacterial Cell Surface Techniques*. First ed. 1988. John Wiley and Sons.
11. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4062-70.
12. Hogan D, Kolter R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology* 2002; 5: 472-7.
13. Juan C, Macia M, Gutierrez O, Vidal C, Perez J, Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4733-8.
14. Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Epp S, Pechere J-C. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 424-7.
15. Kolayli F, Karadenizli A, Savli H, Ergen K, Hatirnaz O, Balikli E, *et al.* Effect of carbapenems on the transcriptional expression of the oprD, oprM and oprN genes in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 915-20.
16. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8: 557-84.
17. Maniati M, Ikonomidis A, Mantzana P, Daponte A, Maniatis A, Pournaras S. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blavim-4/blap1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 132-5.
18. Maseda H, Yoneyama H, Nakae T. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 658-64.
19. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 645-9.
20. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3322-7.

21. Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, Caceres N, Tulkens P, Van Bambeke F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 378-86.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. Sixth edition. M7-A6. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement. Wayne, Pa., 2004
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard - Eighth edition - M2-A8, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement. Wayne, Pa., 2004.
24. Ochs M, McCusker M, Bains M, Hancock R. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1085-90.
25. Page M I. The reactivity of beta-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 895-913.
26. Pagniez G, Radice M, Cuirolo A, Rodríguez O, Rodríguez H, Vay C, Famiglietti A, Gutkind G. Prevalence of metallo-beta-lactamase in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* at a university hospital of Buenos Aires city. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 33-7.
27. Pagniez G, Radice M, Amoroso A, Famiglietti A, Gutkind G. Class I integron containing a new variant of Vim-2 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. 44 th. ICAAC, 2004, Abstract C1-293, p. 65, Washington, USA.
28. Pasteran F, Faccione D, Petroni A, Rapoport M, Galas M, Vazquez M, *et al.* Novel variant (bla(vim-11)) of the metallo-beta-lactamase bla(vim) family in a Ges-1 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 474-5.
29. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, AmpC, and OprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1633-41.
30. Queenan A, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58.
31. Quinteros M, Radice M, Famiglietti A, Marín M, Nicola F, Casellas J M, *et al.* Análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos en los aislamientos de pacientes internados. Años 2004-2005. <http://www.aam.org.ar/novedades/2004-2005.pdf> 2006.
32. Rossi A, Lopardo H, Woloj M, Picandet A, Mariño M, Galas M, *et al.* Non-typhoid *Salmonella* spp resistant to cefotaxime. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1995; 36: 697-702.
33. Subcomision de Antimicrobianos, SADEBAC, AAM. Caracterización fenotípica de la resistencia a los β-lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. http://www.aam.org.ar/novedades_mas.php?categorialD=4&subcategorialD=20&novedadID=28 2005.
34. Szymis M, O'Carroll M, Sloots T, Coulter C, Wainwright C, Bell S, *et al.* Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1089-96.
35. Tam V, Chang K, LaRocco M, Schilling A, McCauley K, Poole K, *et al.* Prevalence, mechanisms, and risk factors of Carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 309-14.
36. Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-325.
37. Wang C, Mi Z H. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing Imp-1 metallo-beta-lactamases and lacking the outer-membrane protein OprD. *J Med Microbiol* 2006; 55: 353-4.
38. Yong D, Ritchie B, Pratt R, Toleman M, Walsh T. A novel sub-group metallo-β-lactamase (MBL), Aim-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (Psa) from Australia. 47 th ICAAC, 2007, abstract C1-593, p. 75, Chicago, USA.