

ARTICULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLES

Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central

Enterobacteria Carbapenem-resistant KPC by production, isolated inhospitals and Asunción and Central Department

Melgarejo Nancy, Martinez Mario, Franco Rossana, Falcón Myrian*

RESUMEN

Las infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenemes o productoras de carbapenemasas (KPC) han emergido como un importante desafío en los centros de salud de todo el mundo, incluyendo el Paraguay. Este estudio describe los hallazgos de estos patógenos en diferentes centros de Asunción y Departamento Central, donde han sido aisladas 76 cepas de enterobacterias con resistencia a carbapenemes por producción de esta enzima, confirmadas por métodos moleculares. Además, en las mismas, han sido detectadas otros mecanismos de resistencia, como producción de betalactamasa de espectro extendido (CTX-M y PER-2) y genes que codifican la resistencia a quinolonas (qnr).

Palabras claves: KPC, Enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenemes

INTRODUCCIÓN

Los carbapenemes usualmente representan las drogas de elección para el tratamiento de infecciones serias causadas por aislamientos multirresistentes prevalentes en muchas especies de bacterias gram negativas, especialmente productoras de Beta lactamasa de espectro extendido (BLEE) y/o AMP-C derreprimida¹. No obstante, la resistencia a estos antibióticos ha ido incrementándose relacionada principalmente a enzimas carbapenemasas. Se han reportado principalmente tres clases de betalactamasas que hidrolizan carbapenemes, llamadas: Serin betalactamasas de clase A

SUMMARY

Infections caused by carbapenem resistant or carbapenemase producing (KPC) enterobacteria have emerged as an important challenge in healthcare centers throughout the world, including Paraguay. This study describes findings of these pathogens in different facilities in Asunción and the Central Department, where 76 families of carbapenem resistant bacteria have been isolated through detection of this enzyme, and confirmed through molecular methods. In addition, other resistance mechanisms have been detected in the same families, such as broad spectrum betalactamase resistance (CTX-M and PER-2) and genes that codify quinolone resistance.

Key words: KPC, Enterobacteria, *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenems

(entre ellas las KPC), de la clase B, las Metalobetalactamasas y la clase D donde se encuentran las Oxacilinasas.²

En diversos países del mundo, se ha reportado resistencia de *Klebsiella pneumoniae* con mecanismo del tipo KPC³⁻⁷. Las variantes más comúnmente reportadas son KPC-2 y KPC-3, ambas microbiológicas y clínicamente similares. Los genes de KPC se encuentran generalmente en elementos genéticos móviles especialmente en el transposón Tn 4401, como también asociados a plásmidos⁸.

El reporte de aislamientos productores de KPC es preocupante debido a que estas cepas son resisten-

*Laboratorio Central de Salud Pública M.S.Py B.S. / Instituto de Previsión Social.

tes a todos los agentes betalactámicos y frecuentemente también a otros antimicrobianos. Esto limita la terapéutica para el tratamiento de infecciones severas, restringida básicamente a tigeciclina y polimixinas. Además, la detección de tales cepas en los laboratorios puede no ser factible con el empleo de los métodos estándar de susceptibilidad usuales que pueden no indicar la resistencia. Hasta ahora, las carbapenemasas de *K. pneumoniae* han sido aisladas de pacientes que llevan un tiempo prolongado de internación. También ha sido detectada en otras especies de enterobacterias y en *Pseudomonas aeruginosa*.

La *K. pneumoniae* productora de BLEE tipo KPC ha sido reportada desde 1996. La primera cepa identificada en Estados Unidos se aisló en Carolina del Norte.

La rápida diseminación clonal de *K. pneumoniae* productora de KPC es observada a menudo dentro de cada país como también entre países, indicando que hay clones internacionales circulando⁹⁻¹³.

La primera detección de KPC en enterobacterias en Argentina fue registrada a fines del año 2006. En un hospital de Buenos Aires se detectó esta carbapenemasa en *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*, ambas cepas recuperadas del mismo paciente⁴ y el centro de referencia de este país ha confirmado la presencia KPC en más de 70 cepas de enterobacterias.

Entre setiembre y noviembre de 2006 fueron aisladas las primeras cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-2 en Brasil a partir de muestras de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos^{3,5,10}

Este estudio tiene como objetivo describir los hallazgos de enterobacterias resistentes a carbapenemes por producción de KPC en el Paraguay, como también los sitios de donde fueron aislados con mayor frecuencia.

MATERIAL Y METODOS

Estudio multicéntrico realizado desde setiembre del 2009 a agosto del 2011. Fueron remitidas desde centros públicos y privados de Asunción y

Departamento Central al Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP) cepas de enterobacterias con sospecha de ser portadoras de genes que codifican para enzimas con acción hidrolítica sobre los carbapenemes (KPC), cefalosporinas (CTX-M y PER-2) y quinolonas (qnr).

Como método de tamizaje para la detección de KPC hemos utilizado el halo de inhibición con el disco de imipenem (IMP) ≤ 22 mm obtenido por el método de difusión de Kirby Bauer (KB)^{11,12}.

La identificación de las cepas fue corroborada con las pruebas bioquímicas convencionales, y la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de difusión (KB).

Además, se realizaron pruebas fenotípicas para detección presuntiva de la presencia de mecanismos de resistencia por el método de aproximación de discos, método microbiológico de HODGE modificado para detección y confirmación de la presencia de mecanismos enzimáticos responsables de resistencia y, posteriormente PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la confirmación molecular.

Para la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos, fue utilizado el método de difusión de discos KB, con las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Fueron incluidos los siguientes antibióticos: imipenem 10 ug. (IMP), meropenem 10 ug. (MEM), ertapenem 30 ug. (ERT), ceftazidima 30 ug (CAZ), cefotaxima 30 ug. (CTX), cefepima 30 ug. (FEP), ceftaxitina 30 ug. (FOX), amoxicilina-acido clavulánico 10/10 ug. (AMC).

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia por aproximación de discos: Los discos de antibióticos fueron ubicados estratégicamente para la detección fenotípica de los siguientes mecanismos de resistencia:

Carbapenemasa del grupo 2f tipo KPC: discos de IMP y MEM de 15 a 20 mm de distancia del disco de ácido borónico (APB).

Carbapenemasa del tipo Metalobetalactamasa (MBL): discos de IMP y MEM de 15 a 20 mm de distancia del disco de EDTA/SMA.

Betalactamasa de espectro extendido tipo GES

con actividad carbapenemasa: discos de IMP de 15 a 20 mm de distancia del disco de CAZ.

Betalactamasa de espectro extendido (BLEE): discos de CAZ y CTX de 15 a 20 mm de distancia del disco de AMC.

Para la búsqueda de mecanismos enzimáticos de resistencia, se utilizó el Método microbiológico de HODGE modificado¹⁴.

Detección molecular de los genes codificantes de resistencia: De acuerdo a los resultados de los ensayos, fenotípico y microbiológico, previamente realizados, se llevó a cabo la PCR para determinar la presencia de genes que codifican para las enzimas que confieren resistencia a carbapenemes (KPC), cefalosporinas (CTX-M y PER-2) y quinolonas (qnr), para lo cual utilizamos los siguientes cebadores:

Tabla 1. Cebadores utilizados para detección molecular de genes de resistencia

Cebador	Secuencia 5'.....3'
blaCTX-MU-F	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT
blaCTX-MU-R	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA
blaPER-2-F	GTA GTA TCA GCC CAA TCC CC
blaPER-2-R	CCA ATA AAG GCC GTC CAT CA
blaKPC-F	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG
blaKPC-R	AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA
qnrB-F	CCGACCTGAGCGGCACTGA
qnrB-R	CGCTCCATGAGCAACGATGCCT

Protocolo de amplificación: Desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, *annealing* a 50°C por 1 min y extensión a 68°C por 1 min, y extensión final a 72°C por 5 min (termociclador THERMO Electrón Corporation) (PXE 0,5 Thermal Cycler). Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2%, en buffer TAE 0,5 X y teñidos con Bromuro de Etidio al 1% para una observación posterior con luz UV con el equipo BIORAD UV Transiluminator 2000.

Los datos fueron representados por medio de frecuencias y porcentajes-

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio, fueron confirmadas 76 cepas con portación de genes que confieren resistencia a los carbapenemes mediante la enzima KPC.

Utilizando el método de aproximación de discos, para la detección fenotípica de mecanismos de resistencia, hemos encontrado que todas las cepas estudiadas presentaron sinergia entre IMI y MEM con APB (Foto 1), y algunas además presentaron sinergia entre CTX y CAZ con AMC.

El método microbiológico de HODGE modificado para los carbapenemes (IMP, MEM) también resultó positivo para las 76 cepas estudiadas Foto 2.



Foto 1. Sinergia IMI-BOR-MEM.



Foto 2. Prueba de HODGE modificada positiva.

Los resultados de la PCR concluyeron que las 76 cepas contaban con la portación de los genes que codifican para la enzima KPC, encontrándose además otros genes de enzimas que dan resistencia a otros antimicrobianos, como los CTX-M, PER-2 y qnr Foto 3.

Como se puede apreciar en el Gráfico 2, el mayor porcentaje de enterobacterias en las que fueron confirmadas la presencia de KPC corresponden a *K. pneumoniae*, aunque también fueron encontradas en otros géneros y especies.

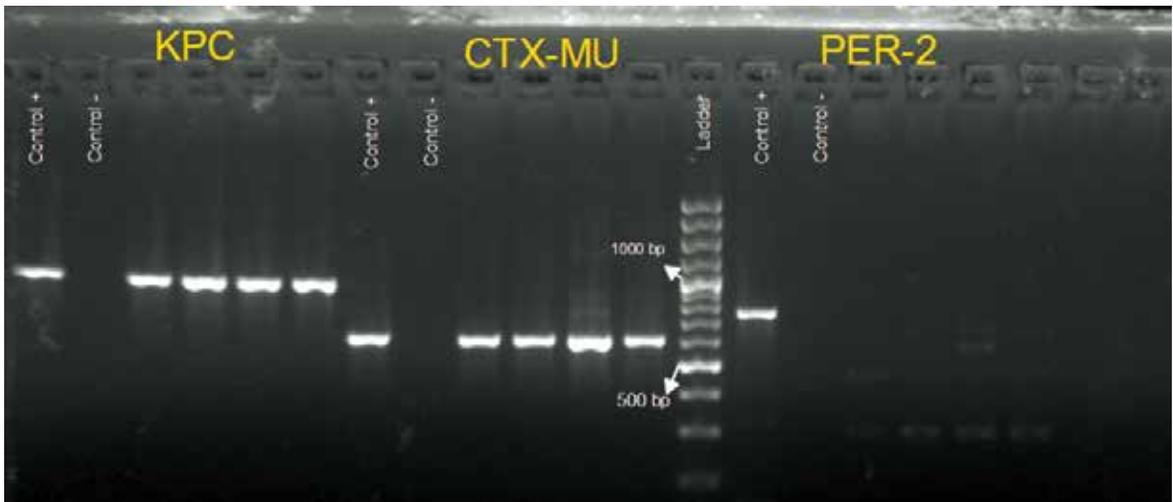


Foto 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Carbapenemasa tipo KPC y BLEEs tipo CTX-MU y PER-2.

En cuanto a los centros desde donde fueron remitidas las cepas, la mayor parte correspondió al sector público 73 cepas (de Asunción y Departamento Central), aunque también fueron confirmadas cepas provistas de KPC provenientes de instituciones privadas 3 cepas (Asunción), totalizando ocho centros, Gráfico 1.

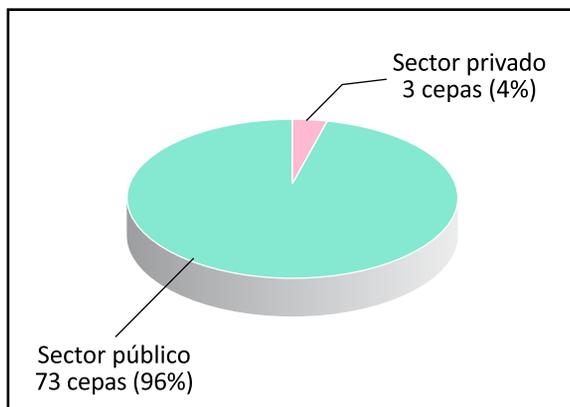


Gráfico 1. Cepas KPC positivas remitidas según sector público o privado (n 76).

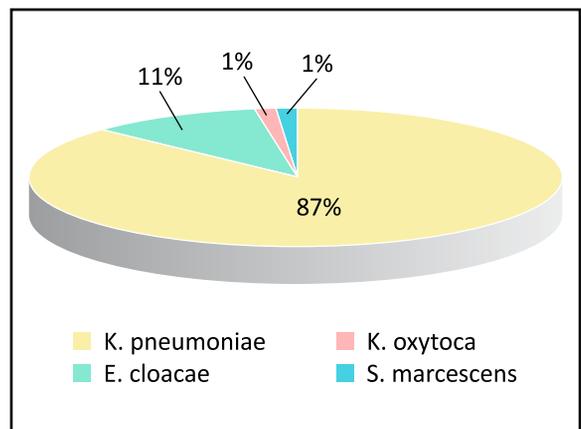


Gráfico 2. Enterobacterias productoras de KPC aisladas en Asunción y Central (n 76).

Según el tipo de material del cual fueron aislados, encontramos que el 36 % de los casos fueron a partir de muestras del aparato respiratorio (esputo, secreción traqueal, lavado broncoalveolar y en un caso líquido pleural), seguido de muestras de orina.

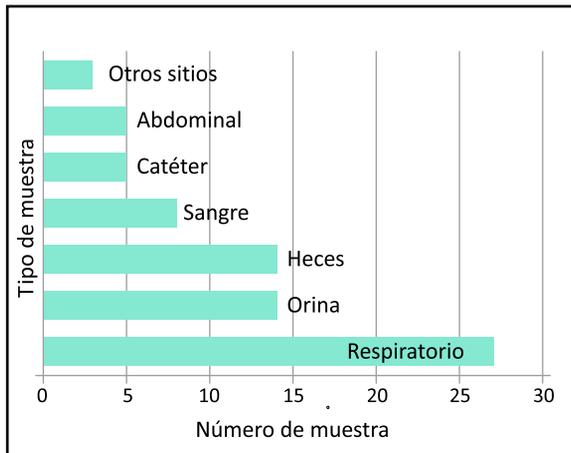


Gráfico 3. Sitios clínicos de aislamiento de cepas KPC (n 76).

Hemos realizado además la búsqueda por métodos moleculares de otros mecanismos de resistencia asociados y encontramos en el 61 % de las cepas KPC positivas, combinaciones de resistencia a otros antibióticos por otras enzimas como betalactamasas de espectro extendido (CTX-M y PER-2) y a quinolonas (qnr), Gráfico 4.

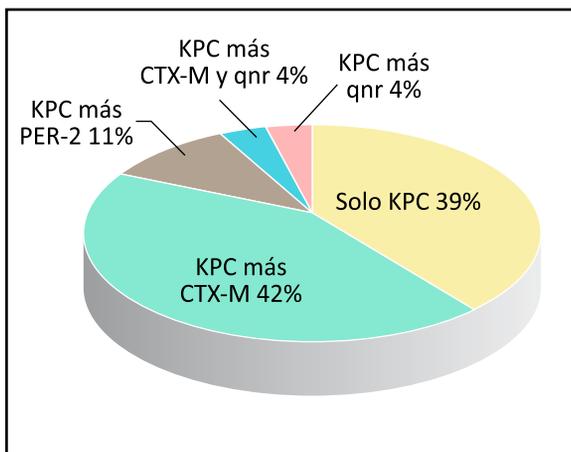


Gráfico 4. Combinaciones de mecanismos de resistencia en cepas KPC. (n 76)

Finalmente, los resultados de resistencia a otros antibióticos por el método de KB, se muestran en el Gráfico 5.

CIP: Ciprofloxacina, GEN: Gentamicina; AMK: Amikacina; LEV: Levofloxacina; TMS: Cotrimoxazol, TAZ: Piperacilina/Tazobactam

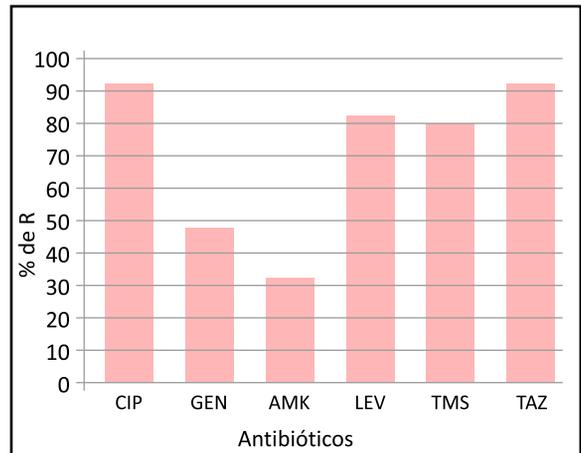


Gráfico 5. Porcentajes de resistencia de cepas KPC a otros antibióticos (n 76).

DISCUSIÓN

Este estudio demostró que cepas multirresistentes de enterobacterias productoras de KPC están presentes en varios hospitales de Asunción y Departamento Central, tanto en instituciones públicas como privadas. Probablemente estos hallazgos reflejan solo una parte de la situación real en nuestro país, ya que muchos hospitales no cuentan con laboratorios de Bacteriología, principalmente los del interior, y otros no están en condiciones de detectarlas.

En este trabajo solo se han incluido las cepas que fueron remitidas desde los ocho centros que realizan una búsqueda activa de estos patógenos y cuentan con un plantel entrenado y sensibilizado con la emergencia de la resistencia a los antimicrobianos. En este sentido, es necesario el fortalecimiento en laboratorios de Bacteriología de los diferentes centros sanitarios para una detección certera y oportuna.

Por otro lado, la asociación en estas cepas de otros mecanismos de resistencia, como betalactamasas de espectro extendido y genes de resistencia a quinolonas, se traducen en un mayor riesgo de situaciones críticas de pacientes que se encuentran infectados o eventualmente pueden infectarse durante hospitalizaciones prolongadas debido a las escasas opciones terapéuticas.

La rápida y fácil diseminación de estos patógenos por el personal de salud hace necesaria la urgente búsqueda y aplicación de estrategias por parte de equipos multidisciplinarios, que incluyan la correcta y rápida detección de estas cepas con la finalidad de que, las intervenciones terapéuticas y la implementación de medidas de contención y control sean oportunas y eficaces.

Los elevados porcentajes de resistencia a otros antimicrobianos diferentes a los beta lactámicos, prácticamente deja sin opciones terapéuticas aplicables. Existen otros antimicrobianos con probable acción sobre estos patógenos, aunque poco disponibles en nuestro país, como los derivados de la polimixina y la tigeciclina, la eficacia clínica de éstos aun debe ser bien determinada.

Si bien también son reportadas en otras partes del mundo y en la región la presencia de KPC en otras enterobacterias diferentes a *K. pneumoniae*, en este trabajo encontramos un porcentaje relativamente alto (11 %) de *Enterobacter cloacae* con la enzima KPC, no coincidente con datos de la región. Esto tal vez sea debido a la alta circulación de *E. cloacae* en nuestros hospitales y la fácil transferencia de esta enzima a otras enterobacterias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Livermore DM. The impact of carbapenemes on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002; 3:218-24
2. Bush K and Singer SB. Effective cooling allows sonication to be used for liberation of β -lactamases from gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1989; 24:82-84.
3. Peirano G and cols. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009) 63: 265–268.
4. Pasteran F, Corso A, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). ANLIS "Dr. Carlos Malbran". Servicio Antimicrobianos. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología. Alerta: diseminación de KPC en Argentina. Buenos Aires: INEI, 2010. Consultado 26 de junio 2012. Disponible en: <http://www.cocemi.com.uy/docs/PandemiaKPC-2.pdf>
5. Monteiro J y cols. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; p. 333–334.
6. Bratu SD, Landman M, Alam E, Tolentino J, Quale. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. 49:776-778.
7. Woodford N, Dallow J W, Hill RL, Palepou M F, Pike R, Ward M E, M Warner, and Livermore DM. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2007; 29:456-459
8. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39:55-60.
9. Ørjan Samuelsen y cols. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (2009) 63, 654–658
10. Pavez M y cols. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, p. 2702.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 7th ed. Approved standard M7-A7. CLSI. [sn]; 2006.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testings, 21th ed. Disk diffusion and MIC testing. 2011; 31 (1). M 100-S21.
13. Kitchel B. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. [sn] 2009; p. 3365–3370.
14. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum J H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001; 7:88-91.