

ARTICULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Resistencia plasmídica a colistin por el gen *mcr-1* en *Enterobacteriaceae* en Paraguay

Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-1 in Enterobacteriaceae in Paraguay

Melgarejo Touchet Nancy¹, Martínez Mario¹, Franco Rossana¹, Falcón Miryan¹, Busignani Sofia¹, Espínola Carmen², Takahasi Vivian³, Meyer Isabel⁴, Almada Sandra⁵, Segovia Nancy⁶, Ortellado Juana⁷.

RESUMEN

La resistencia a las polimixinas mediada por plásmidos (gen *mcr-1*) representa una amenaza para la salud pública, puesto que colistina es utilizada en la práctica médica como una de las últimas alternativas para el tratamiento de gérmenes multiresistentes.

Este estudio describe la circulación de cepas de Enterobacterias que portan este gen de resistencia, aisladas de pacientes hospitalizados, así como también de la comunidad.

Los hallazgos de la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos-Paraguay fueron de casi el 5 % (4,7) en cepas remitidas con criterio de sospecha, siendo las especies involucradas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella Schwarzengrund*.

Además, por métodos moleculares se confirmaron en todas ellas la portación de otros genes de resistencia (KPC, CTX-M, Qnr B, Qnr S, aac (6')-Ib-cr) asociados al *mcr-1*.

Palabras claves: Enterobacterias, resistencia, colistina, *mcr-1*.

ABSTRACT

Resistance to polymyxins mediated by plasmids (*mcr-1* gene) represents a threat to public health, since colistin is used in medical practice, as one of the last alternatives, for the treatment of multi-resistant germs.

This study describes the circulation of strains of Enterobacteria that carry this resistance gene, isolated from hospitalized patients, as well as from the community.

The findings of the Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos-Paraguay were almost 5% (4.7) in strains submitted with suspicion criteria; the species involved being *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella Schwarzengrund*.

In addition, molecular methods confirmed in all of them the carrying of other resistance genes (KPC, CTX-M, Qnr B, Qnr S, aac (6')-Ib-cr) associated with *mcr-1*.

Key words: Enterobacteria, resistance, colistin, *mcr-1*.

¹Servicio Antimicrobianos de Laboratorio Central de Salud Pública

²Instituto de Previsión Social-Hospital Central

³Hospital Nacional de Itaugua

⁴Meyer Lab

⁵Hospital Regional de Encarnación

⁶Hospital Regional de Ciudad del Este

⁷Hospital de Clínicas-UNA

Contacto autor principal: Nancy Melgarejo Touchet nmtouchet@gmail.com antimicrobiano@lcsp.gov.py

Recibido el 25 de abril de 2018, aceptado para publicación el 3 de junio de 2018

INTRODUCCIÓN

La resistencia a la colistina mediada por plásmidos se encuentra en la interfaz entre la salud animal y la salud humana. Las polimixinas, y en particular colistina, han sido utilizadas tanto en medicina humana como veterinaria, por más de 50 años, aunque su uso parenteral en humanos ha sido limitado por su nefrotoxicidad y neurotoxicidad⁽¹⁾. En los últimos años, el uso de este antibiótico en humanos ha resurgido como una opción de tratamiento de última línea para los organismos resistentes a múltiples antimicrobianos, incluyendo carbapenemes, para los bacilos gram negativos responsables de infecciones asociadas a la atención de salud con alta morbilidad y mortalidad⁽²⁾.

En noviembre de 2015, Liu YY y col. reportaron los primeros aislamientos de resistencia a la colistina mediada por plásmidos (gen *mcr-1*), mediante un estudio retrospectivo de prevalencia del gen *mcr-1* en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* recolectados entre abril de 2011 y noviembre de 2014 a partir de muestras de carne cruda, de animales y de pacientes hospitalizados con infecciones asociadas a bacterias que portaban este gen⁽³⁾.

A partir de entonces, varios investigadores publicaron aislamientos similares en diferentes partes del mundo, confirmando la presencia del gen *mcr-1* en especies de Enterobacterias aisladas de muestras de alimentos, animales y humanos^(1,4-12); e incluso en muestras tomadas del medio ambiente (agua de río)^(13,14).

Arcilla y cols. describieron la circulación del gen en países de la región, en un estudio de colonización fecal hecha en viajeros holandeses en 2012-2013⁽¹⁵⁾.

En febrero de 2016, el Servicio Antimicrobianos del Instituto “Dr. Carlos G. Malbrán” de Buenos Aires, Argentina, emitió una alerta epidemiológica por los primeros hallazgos de Enterobacterias portadoras del gen *mcr-1* en dicho país, ante la confirmación en 9 cepas clínicas (*E. coli*) portadoras del gen^(16,17).

Posteriormente, Colombia informó sobre la detección del gen *mcr-1* en tres aislamientos de *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* de pacientes procedentes de diferentes ciudades de Colombia y un aislamiento de *E. coli* portador de *mcr-1*⁽¹⁸⁾.

Ante esta situación, en junio del 2016 la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una alerta epidemiológica, instando a sus Estados Miembros a implementar y mantener la capacidad para detectar,

prevenir y controlar la transmisión de microorganismos con resistencia transferible a colistina⁽²⁾.

A raíz de los reportes internacionales publicados, el Servicio Antimicrobianos del Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), instó a los laboratorios componentes de la Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos-Paraguay a la intensificación de la búsqueda y envío de cepas con sospecha de resistencia a polimixinas para la confirmación de la presencia del gen *mcr-1* y en agosto de 2016 fue confirmada la presencia del gen en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada a partir de orina; por lo que el LCSP emitió una alerta nacional⁽¹⁹⁾.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio multicéntrico realizado por la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos-Paraguay. Los laboratorios conformantes de la Red remitieron al Laboratorio Coordinador (Laboratorio Central de Salud Pública) un total de 150 cepas de Enterobacterias sospechosas de portación del gen que codifica para enzimas con acción hidrolítica sobre los polipéptidos (*mcr-1*), durante el periodo comprendido entre enero de 2016 y setiembre de 2017.

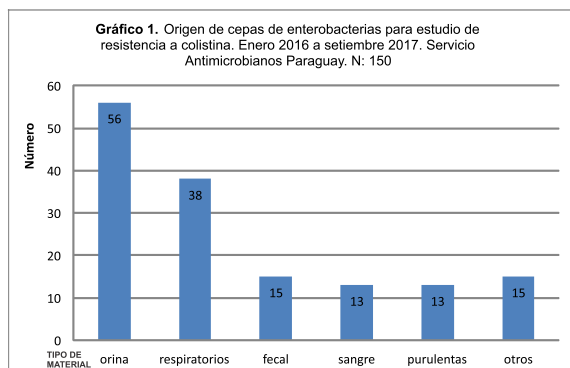
El criterio de tamizaje utilizado para dicha sospecha consistió en: halo de inhibición con el disco de colistina (COL) ≤ 12 mm obtenido por el método de difusión de Kirby Bauer (KB) y/o CIM de COL ≥ 4 ug/ml, establecido por el laboratorio de referencia regional⁽²⁰⁾.

En el LCSP fueron confirmadas las identificaciones por los métodos manual y automatizado; se realizaron pruebas de sensibilidad, según recomendaciones del CLSI (21), por el método de difusión de KB, concentración inhibitoria mínima de COL (método de elución de discos de colistina (22), macrodilución en caldo y epsilométrico) y confirmaciones moleculares por PCR convencional (reacción en cadena de la polimerasa) con primers específicos⁽²³⁾.

RESULTADOS

Un total de 150 cepas de Enterobacterias, remitidas de diversos centros, fueron estudiadas en el Servicio Antimicrobianos del Departamento Bacteriología y Micología del LCSP.

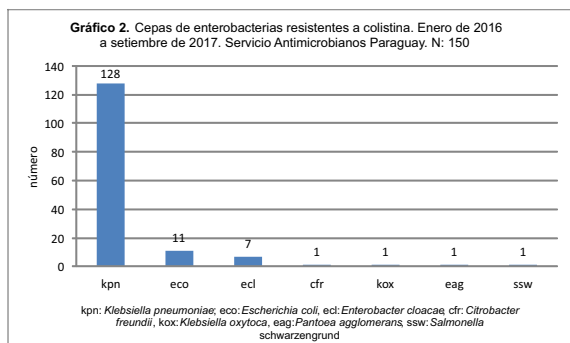
El Gráfico 1 indica el tipo de muestras de donde fueron aisladas las cepas de Enterobacterias estudiadas, de las cuales 56 correspondieron a orina.



Del total de las cepas estudiadas, el 95 % correspondieron a pacientes hospitalizados y el 53 % al género masculino.

Las Enterobacterias identificadas correspondieron a: *Klebsiella pneumoniae* (kpn), *Escherichia coli* (eco), *Enterobacter cloacae* (ecl), *Citrobacter freundii* (cfr), *Klebsiella oxytoca* (kox), *Pantoea agglomerans* (eag), *Salmonella Schwarzengrund* (ssw), como puede observarse en el **Gráfico 2**.

En cuanto a los halos de inhibición, 109 de las cepas presentaron halos de inhibición frente a colistina menor a 10 mm de diámetro y 41 entre 10 y 12 mm.



De las 150 cepas con resistencia a colistina, en 7 de ellas se confirmó la portación del gen *mcr-1* (4,7 %). En aquellas con resultados negativos para *mcr-1* se encontró resistencia a otros antibióticos: 112 cepas con resistencia a carbapenemes, de las cuales 96 (67 %) correspondieron a KPC y 16 (11 %) a NDM-1; en 20 (14 %) se detectó la presencia de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) y en 2 (1 %) de represión de β -lactamasa de tipo AMP-C1%).

De las 7 cepas confirmadas para el gen *mcr-1*, 3 correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* (kpn), 3 a *Escherichia coli* (eco) y 1 a *Salmonella Schwarzengrund*. El origen de estas cepas se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Origen de las cepas de Enterobacterias con portación del gen *mcr-1*. Servicio Antimicrobianos Paraguay. Enero 2016 a setiembre 2017. N: 7

Nº	Cepa	Muestra	Paciente	Sexo
1	kpn	orina	ambulatorio	f
2	kpn	orina	hospitalizado	f
3	kpn	orina	ambulatorio	m
4	eco	orina	hospitalizado	f
5	eco	orina	hospitalizado	m
6	eco	orina	ambulatorio	m
7	ssw	heces	ambulatorio	m

Los resultados de las pruebas de sensibilidad a colistina demostraron que las cepas portadoras del gen *mcr-1* presentaron halos de inhibición de entre 10 y 12 mm; y que las CIMs, independientemente de los métodos empleados (Epsilométrico, Elusión de discos de colistina de 10 ug y macrodilución en caldo), no superaron 8 ug/ml. (Tabla 2.)

Tabla 2. Resultados de las pruebas de sensibilidad a colistina de cepas de Enterobacterias portadoras del gen *mcr-1*. Servicio Antimicrobianos Paraguay. Enero 2016 a setiembre 2017. N: 7

Cepa	Difusión de disco (mm)	Método epsilométrico (ug/ml)	Elusión de disco (ug/ml)	Macrodilución en caldo (ug/ml)
kpn	10	8	4	4
kpn	10	4	8	8
kpn	10	4	4	8
eco	11	8	4	4
eco	12	8	4	4
eco	11	4	4	4
ssw	10	8	8	4

En todas ellas, se encontró que la portación del gen *mcr-1* estaba asociada a otros mecanismos de resistencia: una de ellas a carbapenemasa tipo KPC además de portación de BLEE tipo CTX-M y PMQR; los demás mecanismos de resistencia asociados con sus genotipos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resistencias asociadas en cepas de Enterobacterias portadoras de *mcr-1*. Servicio Antimicrobianos Paraguay. Enero 2016 a setiembre 2017. N: 7

Nº	Cepa	Carbapenemasa	BLEE	PMQR	Genotipos
1	kpn	-	+	-	CTX-M
2	kpn	+	+	+	KPC, CTX-M, Qnr B, Qnr S, aac (6')-Ib-cr
3	kpn	-	+	+	CTX-M, Qnr B, aac (6')-Ib-cr
4	eco	-	-	+	Qnr B
5	eco	-	-	+	Qnr B
6	eco	-	+	-	CTX-M
7	ssw	-	+	+	CTX-M, Qnr B

+: presencia; -: ausencia; BLEE: Beta-lactamasa de espectro extendido; PMQR: Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

DISCUSIÓN

Tal como varios países de la región y del mundo han publicado circulación de Enterobacterias portadoras del gen *mcr-1*, con este estudio se demostró en Paraguay la circulación de este gen de resistencia.

Las cepas con portación del gen *mcr-1* fueron aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados, así como de la capital e interior del país.

La confirmación molecular en Enterobacterias fue en casi el 5% (4,7 %) de las cepas remitidas con los criterios de sospecha. Las especies portadoras fueron *Escherichia coli* (N:3), *Klebsiella pneumoniae* (N:3) y *Salmonella Schwarzengrund* (N:1); aisladas en su mayoría de muestras de orina (N:6), además de materia fecal (N:1).

Los resultados de las pruebas de sensibilidad de estas cepas con colistina, presentaron características de halos de inhibición entre 10 y 12 mm de diámetro; y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) entre 4 y 8 ug/ml analizadas por 3 metodologías diferentes

(método epsilométrico, elusión de disco de colistina de 10 ug y macrodilución en caldo), observándose buena correlación en los resultados.

Se encontró además, que todas las cepas portadoras de *mcr-1*, poseían otros genes de resistencia. Se confirmó que 2 de ellas portaron además resistencia a cefalosporinas (CTX-M), y otras 2 resistencia a fluorquinolonas (Qnr B). Las demás cepas portaban o más genes de resistencia asociados, encontrándose en 1 de ellas una carbapenemasa del tipo KPC (del grupo 2f).

Si bien el número de cepas en las que se ha confirmado la presencia de este gen es pequeño, este estudio demostró la circulación del gen *mcr-1* de resistencia a colistina en Enterobacterias en Paraguay a partir de muestras clínicas de pacientes ambulatorios como hospitalizados y sin dudas aparecerán más cepas con este mecanismo de resistencia por lo que se debe tomar conciencia y acciones sobre el uso racional de antimicrobianos a fin de minimizar la propagación de *mcr-1* en los hospitales y en la comunidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scov RL and Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill. 2016; 21(9): pii=30155. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>.
2. OPS/OMS. Alerta Epidemiológica. Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud pública en las Américas. [citado 10 de junio de 2016]. Disponible en http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=35008&lang=es.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016; 16(2):161-8. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7 PMID: 26603172.
4. McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong I AC. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First report of *mcr-1* in the USA. AAC Accepted Manuscript Posted Online. [26 May 2016]. Antimicrob. Agents Chemother. doi:10.1128/AAC.01103-16.
5. Kluytmans-van den Bergh M, Huizinga P, Bonten M, Bos M, DeBruyne K, Friedrich A, et al. Presence of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in retail chicken meat but not in humans in the Netherlands since 2009. Euro Surveill. 2016; 21(9):30149. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30149.
6. Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Lancet Infect Dis. 2016; 16(3):287-8. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00056-6 PMID: 26842776.
7. Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Kasbohrer A, Roesler U, et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase producing Gram-negative bacteria in Germany. Lancet Infect Dis. 2016; 16(3):282-3. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00009-8 PMID: 26774242.
8. Hu Y, Liu F, Lin IY, Gao GF, Zhu B. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 2016; 16(2):146-7. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00533-2 PMID: 26711359.
9. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houee P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, et al. Prevalence

- of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill.* 2016; 11; 21(6): pii=30135. doi: DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.6.30135.
10. Public Health England (PHE). First detection of plasmid mediated colistin resistance (mcr-1 gene) in food and human isolates in England and Wales (Serial number 2015/090). London: PHE; 2015.
11. Ruppe E, Le Chatelier E, Pons N, Andreumont A, Dusko Ehrlich S. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):290-1. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00066-9.
12. Thanh DP, Tuyen HT, Nguyen TN, The HC, Wick RR, Thwaites G, et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid borne mcr-1 gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. *bioRxiv* 2016 (preprint first posted online, Feb. 18, 2016). doi: <http://dx.doi.org/DOI: 10.1101/039925>.
13. Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S, Rolain JM. 2016. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00540-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00540-X).
14. Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nuesch-Inderbinen M, Hachler H, Stephan R. Occurrence of the plasmid-borne mcr-1 colistin resistance gene in ESBL-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Feb 16. pii: AAC.00066-16.
15. Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders J, de Jong MD, Schultz C, COMBAT Consortium. 2016. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147-149. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1).
16. Rapoport M, Faccone D, Pasterán F, et al. mcr-1-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli*: first description in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:4412-3.
17. INEI-ANLIS. Servicio Antimicrobianos. Alerta epidemiológico: Emergencia de resistencia plasmídica (transferible) a colistina/polimixina B mcr-1 en Argentina. Boletín informativo No 3. Febrero 2016. Disponible en <http://antimicrobianos.com.ar/2016/02/alerta-epidemiologico-emergencia-de-resistencia-plasmidica-transferible-a-colistinapolimixina-b-mcr-1-en-argentina/>
18. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Alerta por la primera detección de mcr-1 gen de resistencia a colistina en aislamientos de *Salmonella* entérica serovar Typhimurium y *Escherichia coli* de origen humano en Colombia. Disponible en http://www.grebo.org/images/Alerta_Colombia_mcr_1_salmonella_y_E_coli.pdf.
19. Emergencia de resistencia a colistina/polimixina B por presencia de mcr-1 (mobile colistin resistance) en Paraguay. <https://www.mspbs.gov.py/lcsp/14258/comunicado-resistencia-a-colistina-en-paraguay.html>
20. INEI-ANLIS. Servicio Antimicrobianos. Alerta epidemiológico: Emergencia de resistencia plasmídica (transferible) a colistina/polimixina B mcr-1 en Argentina. Boletín informativo No 3. Febrero 2016. Disponible en <http://antimicrobianos.com.ar/2016/02/alerta-epidemiologico-emergencia-de-resistencia-plasmidica-transferible-a-colistinapolimixina-b-mcr-1-en-argentina>.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
22. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-de-Eluci%C3%B3n-de-Discos-de-COL-version2-Agosto2017.pdf>
23. <http://antimicrobianos.com.ar/2016/01/deteccion-de-resistencia-transferible-a-colistin-gen-mcr-1/>