

# Serinocarbapenemasas de clase A en enterobacterias

Virginia De la Lastra J.<sup>(1)</sup>, M. Teresa Ulloa F.<sup>(2)</sup>, M. Eugenia Pinto C.<sup>(3)</sup>, Mario Vidal C.<sup>(3)</sup>, Francisco Silva O.<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Programa de Formación de Especialistas en Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

<sup>(2)</sup>Programa de Microbiología - Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile.

<sup>(3)</sup>Servicio de Laboratorio Clínico, HCUCH.

**SUMMARY** Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics is becoming a matter of great concern. The rapid emergence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in Enterobacteriaceae has made the carbapenems the drugs of choice to treat severe infections due to these bacteria. The emergence and spread of carbapenem-resistant enterobacteria restricts the antibiotic therapy. ESBLs or AmpC enzyme hyperproduction in combination with porin loss are regarded as the main mechanisms of carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. Recently, it has been described the emergence of serine-carbapenemases (Class A carbapenemases). In our country carbapenemases has been reported only in non-fermentative Gram-negative bacilli. There are still no reports of enterobacteria with these enzymes, but their rapid spread makes surveillance a major priority. Therefore tests able to detect the first carbapenemase producing enterobacteria are needed. It has been proposed to use the modified Hodge Test, but this test has too many false positive results in areas with high prevalence of ESBLs, which is the reality of our country. Boronic acid (BA) compounds were recently reported to be reversible inhibitors of KPC serine-carbapenemases. Tests using BA has been used with success for the accurate identification of KPC carbapenemases. With this threat, to watch the local epidemiology has become a matter of great importance.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno creciente y está comprobado que aumenta la morbimortalidad, la estadía hospitalaria y los costos de tratamiento<sup>(1)</sup>. Entre las primeras líneas en el tratamiento antimicrobiano se encuentran los betalactámicos y dentro de éstos, las cefalosporinas muy utilizadas por su amplio espectro de acción y buen perfil de seguridad. La principal causa de re-

sistencia a las cefalosporinas en enterobacterias es la resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)<sup>(2)</sup>. Durante los últimos años con el extenso uso de cefalosporinas de amplio espectro, las enterobacterias productoras de BLEE se han convertido en un problema alarmante que va en aumento.

Los carbapenémicos, por otra parte, son los antibióticos de primera línea recomendados para

infecciones graves hospitalarias o de la comunidad, causadas por enterobacterias multiresistentes productoras de BLEE o de  $\beta$ -lactamasa AmpC y frecuentemente son la única opción terapéutica disponible<sup>(3)</sup>, por lo que es inquietante que la susceptibilidad a carbapenémicos en enterobacterias ya no esté garantizada. Hoy en día hay varios reportes de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a ellos, lo que amenaza seriamente el uso clínico de estos antibióticos.

El objetivo de esta revisión es describir la epidemiología, importancia y métodos de detección de las serinocarapenemasas más frecuentemente reportadas en enterobacterias.

### EPIDEMIOLOGÍA

El país donde las enterobacterias han mostrado una mayor resistencia a carbapenémicos es Grecia donde el año 2007 *K. pneumoniae* mostraba 46% de resistencia<sup>(4)</sup>. En Chile, la mayor resistencia a carbapenémicos se encuentra en las unidades de cuidados intensivos y está dada principalmente por *K. pneumoniae* con un 23,4% de resistencia a ertapenem. Los aislados de *E. coli* aún tienen un nivel de resistencia bajo, con un 0,5% de resistencia a ertapenem en las que provienen de hemocultivos y un 3% de resistencia a ertapenem en las que provienen de urocultivos en pacientes hospitalizados. La susceptibilidad de *E. coli* en pacientes ambulatorios ha disminuido en forma importante, mostrando una susceptibilidad a cefalotina de un 77,1% y se ha comenzado a detectar resistencia a cefalosporinas de tercera generación aproximadamente en el 5,5%. La resistencia a carbapenémicos en aislamientos ambulatorios si bien es baja, cercana al 0,7%, es preocupante ya que las opciones terapéuticas están mucho más limitadas, sobre todo en lo que se refiere a las vías de administración de los antibióticos de última línea<sup>(5)</sup>.

### MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS

Uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia observados en enterobacterias no susceptibles a carbapenémicos es la producción de cefalosporinasas, como BLEE o AmpC, en combinación con una disminución de la permeabilidad de la membrana externa debido a una pérdida o menor expresión de porinas<sup>(6,7,8)</sup>.

Sin embargo, en el mundo ya se han descrito enterobacterias con susceptibilidad disminuida a estos antibióticos por carbapenemasas,  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar carbapenémicos. Estas enzimas además de degradar carbapenémicos, están capacitadas para hidrolizar casi todos los betalactámicos, representando la familia más versátil de las  $\beta$ -lactamasas con un espectro de hidrólisis de betalactámicos tan amplio que hasta el día de hoy no ha sido igualado por otras enzimas<sup>(8)</sup>. Según la secuencia molecular, las betalactamasas se pueden clasificar en cuatro clases moleculares llamadas A, B, C y D. Las clases moleculares A, C y D incluyen betalactamasas con serina en su sitio activo, mientras que las betalactamasas de clase molecular B son todas metaloenzimas que requieren zinc como cofactor enzimático.

Las carbapenemasas de clase A parecieran ser la clase más diversa y ampliamente distribuida, ya que los genes que las codifican se han encontrado en varios phyla bacterianos tales como actinobacteria, bacteroidetes, cianobacteria, firmicutes y proteobacteria.

Se han descrito enterobacterias productoras de carbapenemasas de clase A de tipo IMI, SME, NMC, GES y KPC<sup>(8)</sup>. Las carbapenemasas SME, NMC e IMI están codificadas en el cromosoma mientras que las carbapenemasas de tipo KPC y GES están codificadas en plasmidios lo que las hace fácilmente transferibles de manera horizontal.

El aumento del uso de carbapenémicos ha llevado a una presión selectiva, donde la resistencia mediada por serinocarbapenemasas es cada vez más frecuente y hoy en día se está produciendo una diseminación mundial de cepas con este mecanismo de resistencia. Se han descrito brotes de alta mortalidad asociados a *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC, por ejemplo, los ocurridos en Nueva York a partir del año 2001<sup>(12)</sup>.

Se han detectado KPC también en *Klebsiella oxytoca*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter freundii*, y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>(13)</sup>. Los microorganismos productores de carbapenemasas de clase A se han continuado diseminando y se han reportado en muchos países del mundo incluyendo Israel<sup>(14)</sup>, Francia<sup>(15)</sup>, Brasil<sup>(16)</sup> y Argentina<sup>(17)</sup>.

Si bien es un mecanismo más raramente descrito, se ha detectado también en enterobacterias la presencia de metalo-beta-lactamasas (MBL) de tipo IMP, VIM y SPM<sup>(8,9)</sup>.

El problema ha comenzado a tener prevalencias alarmantes. El año 2009 un estudio de vigilancia en China en 14 hospitales reportó un 32,6% de enterobacterias productoras de carbapenemasas<sup>(6)</sup>. En Chile un estudio retrospectivo de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos recolectadas entre los años 2005 y 2008 no detectó la presencia de serinocarbapenemasas ni de MBL<sup>(18)</sup>. (Gallardo N *et al.* Búsqueda de cepas de carbapenemasas en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos en un hospital universitario. XXV Congreso Chileno de Infectología. Jueves 6 noviembre, póster 8).

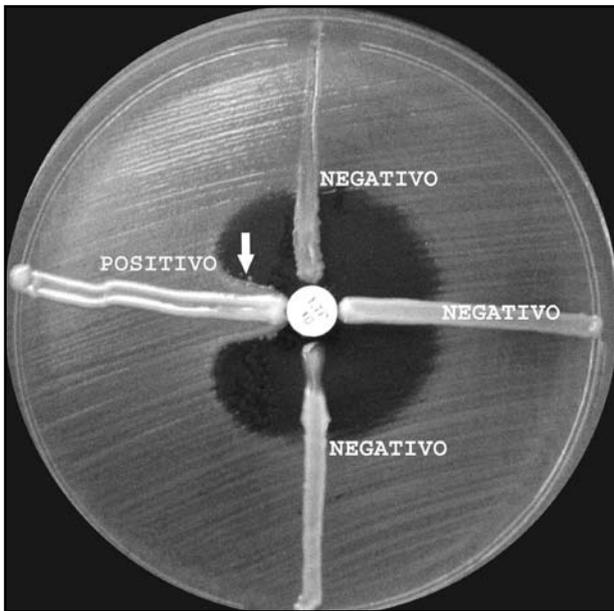
Sin embargo, éste es un fenómeno cambiante con una propagación mundial rápida y una prevalencia en aumento que hace imperioso el contar con métodos de detección y de vigilancia adecuados en nuestro país. En clínicas y hospitales ha aumenta-

do el uso de carbapenémicos en los últimos años, especialmente en las unidades de cuidados intensivos. El mayor uso de estos antibióticos junto con la presencia de estas enzimas en nuestras fronteras hace pensar que es posible que las enterobacterias productoras de carbapenemasas ya estén en nuestro país y que sean responsables en una muy pequeña proporción de una susceptibilidad disminuida a carbapenémicos.

## DETECCIÓN EN LABORATORIO

A la fecha no existe un consenso sobre la mejor manera de hacer un diagnóstico sencillo de la presencia de carbapenemasas. La mayoría de los estudios utilizan técnicas de reacción de polimerasa en cadena para la detección de los genes que codifican para las diferentes carbapenemasas. Esto tiene la desventaja de la baja disponibilidad de esta tecnología en la mayoría de los laboratorios de nuestro país y los costos asociados a la detección de múltiples variantes enzimáticas.

El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en sus últimas guías recomienda realizar el test de Hodge modificado en todas las cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos<sup>(18)</sup>. Este test consiste en demostrar el crecimiento de una bacteria susceptible a carbapenémicos alrededor de otra sospechosa de producir carbapenemasas por la difusión de ésta al medio de cultivo en el cual se ha colocado un disco con una concentración estandarizada de alguno de los carbapenémicos (Figura 1). Si bien la sensibilidad de este test es buena, presenta falsos positivos en casos de altas prevalencias de enzimas tipo BLEE o AmpC con hiperproducción, que es lo que ocurre en nuestro país. De la misma manera en Argentina se ha demostrado que en cepas con sospecha de resistencia a carbapenémicos, el test de Hodge tiene hasta un 25% de falsos positivos, por lo que se han diseñado nuevos protocolos para mejorar la especificidad de estos ensayos<sup>(19)</sup>. Una de



**Figura 1.** Test de Hodge modificado. Nótese la deformación del halo de inhibición que se produce en torno a una cepa productora de carbapenemasas (flecha) mientras que en las cepas no productoras el halo mantiene su forma circular. En este caso se trata de una cepa productora de KPC-2.

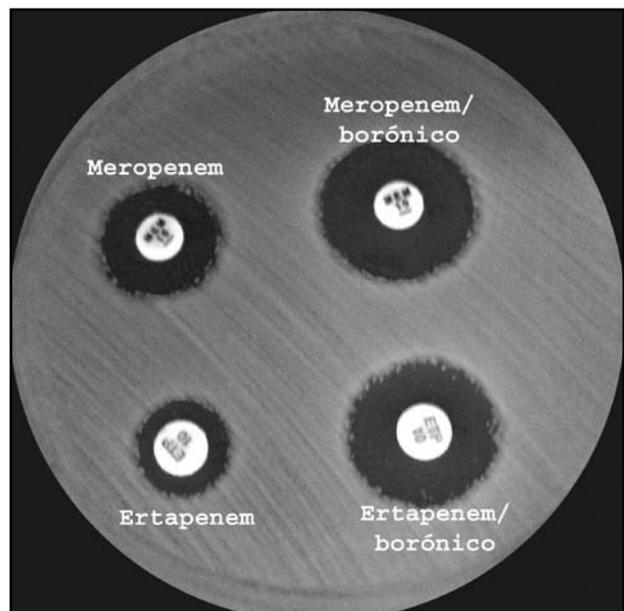
las propuestas es utilizar compuestos derivados del ácido borónico que tiene la capacidad de inhibir la acción de las serinocarbenemasas. En este sentido en cepas productoras de KPC y otras serinoenzimas se determinó que una disminución en la concentración inhibitoria mínima (CIM) de tres diluciones (8 veces) de imipenem combinado con ácido borónico frente a la CIM para imipenem no combinado, tiene una sensibilidad y especificidad cercanas al 100% para la detección de carbapenemasas<sup>(20)</sup>. De la misma manera se puede recurrir a técnicas de determinación de susceptibilidad por difusión, método más económico y disponible dentro de la rutina de los laboratorios clínicos. En este sentido, un aumento en el halo de inhibición de 4 mm entre un sensidisco de imipenem/borónico frente a otro de imipenem sería el mejor predictor de la presencia de una serinocarbenemasa<sup>(21)</sup> (Figura 2). Cabe aclarar que estos ensayos se han realizado con cepas circulantes en Argentina por lo que sus resultados podrían no ser del todo aplicables a otras regiones geográficas donde el tipo de enzimas de las cepas

resistentes puede variar o tener expresiones distintas, por lo que se hace fundamental contar con esta información en nuestro país.

## CONCLUSIONES

La aparición de enterobacterias resistentes a carbapenémicos constituye un serio problema de salud pública que afecta a todo tipo de instituciones y a la comunidad en general. La rápida diseminación de estas enzimas de resistencia a carbapenémicos ha limitado gravemente la elección de antibióticos y constituye una amenaza de aparición de infecciones con enterobacterias panresistentes.

Conocer nuestra realidad local permite tomar las medidas adecuadas y estar alertas ante la inminente llegada de las carbapenemasas, por lo que el conocimiento epidemiológico y la caracterización de la resistencia se ha convertido en una necesidad imperiosa que es aún más importante al considerar la necesidad de definir terapias empíricas en hospitales.



**Figura 2.** Test de ácido borónico. Se han colocado discos de ertapenem y meropenem puros e impregnados con ácido borónico (AB). Nótese el aumento del halo de inhibición en torno a los discos impregnados con AB, efecto que es más marcado para los discos con ertapenem.

En nuestro país no se han publicado estudios que hayan demostrado la presencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas, las cuales ya han sido encontradas en Argentina, por lo que son necesarios

estudios pilotos de vigilancia y de estandarización de pruebas de laboratorio para la correcta identificación que permitan detectar los primeros casos y así tomar las medidas de control de su diseminación.

## REFERENCIAS

1. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemoth* 2009;64:i3-i10.
2. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y on Behalf of ReAct—Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Ch* 2008;52:813-21.
3. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000;6:460-3.
4. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008;13:pii:19045.
5. Datos de Susceptibilidad en Chile, Período 2007-Junio 2008. Grupo Chileno de Susceptibilidad. Noviembre, 2008.
6. Yang Q, Wang H, Sun H, Chen H, Xu Y. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: Results from Large Hospital-Based Surveillances in China. *Antimicrob Agents Ch* 2009 Oct 5. [Epub ahead of print]
7. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, TD Gootz. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla (ACT-1)  $\beta$ -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoe. *Antimicrob Agents Ch* 2006;50:3396-406.
8. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;142:440-58.
9. MJ Ellington, J Kistler. Livermore Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemoth* 2007;59:321-2.
10. Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C *et al.* Chromosome-encoded class D  $\beta$ -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Ch* 2002;46:2004-6.
11. Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y *et al.* Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:523-6.
12. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M *et al.* Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005;165:1430-5.
13. Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F *et al.* Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46:2879-83.
14. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Ch* 2007;51:3026-9.

15. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Ch* 2005;49:4423-4.
16. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing {beta}-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemoth* 2009;63:265-8.
17. Pasteran F, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiore R, Rapoport M *et al.* *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina (letter). *Emerg Infect Dis* (serial on the Internet) 2008;14.
18. CLSI/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. M-100-S20.
19. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic acid. *J Clin Microbiol* 2010;48:1323-32.
20. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009;47:1631-9.

#### **CORRESPONDENCIA**

Dr. Francisco Silva Ojeda  
Laboratorio Clínico  
Hospital Clínico Universidad de Chile  
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago  
Fono: 978 8070  
E-mail: fsilva@redclinicauchile.cl

