Caracterización molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales de Venezuela

Armando Guevara, Carmen I. Sierra R. y Jacobus de Waard.

Universidad de Oriente.
Venezuela.

Escuela de Ciencias de la Salud
"Dr. Francisco Batisttini"
Departamento de Parasitología y
Microbiología
Instituto de Investigaciones en
Biomedicina y Ciencias Aplicadas
Laboratorio de Resistencia
Bacteriana (AG).

Universidad de los Andes.
Mérida, Venezuela.

Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Microbiología (CS).
Instituto de Biomedicina, Caracas,
Venezuela.
Laboratorio de Tuberculosis (JdW).

Establecimientos donde se realizó
el trabajo:
Laboratorio de Microbiología.
Unidad de Infectología y
Microbiología Médica. Complejo
Hospitalario "Ruiz y Páez". Ciudad
Bolívar, Venezuela.
Laboratorio de Tuberculosis.
Instituto de Biomedicina, Caracas,
Venezuela.

Conflictos de intereses: Ninguno
Esta investigación fue parcialmente
financiada con recursos
provenientes del proyecto CI-5-
040605-1622-09 del Consejo de
Investigación de la Universidad de
Oriente, Venezuela y por el Proyecto
LOCTI de Duty Free Americas C.A.

Recibido: 28 de marzo de 2012
Aceptado: 29 de octubre de 2012

Correspondencia a:

Armando Guevara
agvillefort@yahoo.com

Molecular characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from four hospitals of Venezuela

We analyzed 17 strains of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenems isolated in four hospitals in eastern and southern Venezuela collected between 2007 and 2010. Combined disk method showed production of metallo- β -lactamases (MBLs) in all strains. PCR and sequencing of genes encoding IMP, VIM and SPM metallo- β -lactamase families confirmed the presence of VIM-2 MBL in all strains. Pulsed field gel electrophoresis classified the strains into three similarity groups. The largest group, group A included 13 strains with over 83% similarity between them and was found in four hospitals. Two strains of Cumana hospital formed the group B and other two the Group C with similarity of 73% and 65% respectively with Group A. These results confirmed that hospitals in eastern and southern Venezuela, circulating strains of *P. aeruginosa* producing VIM-2 type MBLs with a common clonal origin. On the other hand, carbapenem-resistant *P. aeruginosa* circulating in Cumana city hospital had polyclonal origin.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo- β -lactamases, clonal dissemination.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, metalo- β -lactamasas, diseminación clonal.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa, es un patógeno oportunista responsable de 10 a 15% de las infecciones asociadas a los cuidados de salud en todo el mundo¹. La producción de metalo- β -lactamasas (MBLs) es uno de los principales mecanismos de resistencia con alta implicancia epidemiológica en *P. aeruginosa* debido a su capacidad de diseminación horizontal². Estas enzimas se caracterizan por presentar un amplio perfil de sustratos, que incluye penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, pero no hidrolizan a los monobactámicos (aztreonam) y su actividad es inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y otros quelantes de iones metálicos, limitando las opciones terapéuticas y favoreciendo el aumento de la morbi-mortalidad²⁻⁴.

Las MBLs pertenecen a la clase molecular B de Ambler y se subdividen en tres subclases: la subclase B1, que agrupa a las MBLs transferibles, inducibles o asociadas a plásmidos, y las subclases B2 y B3 que agrupan las MBLs cromosómicas derivadas de *Aeromonas* spp, *Serratia fonticola* y *Stenotrophomonas maltophilia*⁵. Dentro de las MBLs transferibles, se distinguen nueve grupos: IMP, VIM, SPM, GIM, AIM, NDM, SIM, DIM y KHM. Las primeras seis han sido encontradas en *P. aeruginosa*, siendo las IMP y VIM las más diseminadas en el mundo^{6,7}. En Venezuela, las MBLs reportadas hasta ahora son de tipo VIM-2. El primer caso de infección por *P. aeruginosa*

productor de MBL de tipo VIM-2 se publicó en el año 2004, en aislados de Caracas, en el marco del programa internacional de vigilancia SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program)⁸. Posteriormente, en el año 2009, se publicó el primer reporte donde se confirmó la presencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de tipo VIM-2 en el interior del país⁹.

Actualmente, en varios hospitales de Venezuela se siguen detectando cepas de *P. aeruginosa* con un perfil fenotípico compatible con la producción de MBLs¹⁰. Sin embargo, en pocos centros hospitalarios se ha hecho la confirmación molecular de este tipo de enzimas. Así mismo, se desconoce si existe una diseminación clonal de *P. aeruginosa* multi-resistente entre los diferentes servicios de un mismo centro hospitalario y, más grave aún, entre diferentes hospitales de una región o del país. Por tal motivo, en este estudio se analizaron 17 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales del oriente y sur de Venezuela colectados entre los años 2007 y 2010, con el fin de determinar la producción de MBLs y establecer su relación clonal.

Material y Métodos

Cepas bacterianas

Se analizaron 17 cepas de *P. aeruginosa* con resistencia a los carbapenémicos, aisladas de pacientes con infecciones asociadas a los cuidados de salud, hospitalizados en dife-

rentes servicios del Hospital “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) de Cumaná, Hospital Industrial “Dr. Tulio Briceño M.” (HITB) de San Tomé, Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez” (CHRP) de Ciudad Bolívar y Hospital “Raúl Leoni” (HRL) de San Félix, durante los años 2007 al 2010 (Figura 1). Las cepas procedentes de los distintos centros correspondieron a aislados derivados de manera espontánea por los centros para confirmación de mecanismos de resistencia al Hospital de Ciudad de Bolívar.

Susceptibilidad antimicrobiana

Fue determinada mediante el método de difusión con discos siguiendo los lineamientos descritos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹¹. Se probaron los siguientes antimicrobianos: piperacilina (100 µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg), ceftazidima (30 µg), cefoperazona (75 µg), cefepima (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (30 µg), amikacina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) y colistina (10µg). Como control de calidad se utilizó la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Detección fenotípica de las metalo-β-lactamasas

Se realizó mediante el método de discos combinados, utilizando discos de imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) solos e impregnados con una solución de ácido etilendiaminotetraacético/mercaptoacético de sodio (EDTA/SMA) (0,5M/300 ml)¹². La solución de EDTA/SMA se preparó de acuerdo a lo descrito por Lee et al¹³ y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización.

La detección de las MBLs se realizó inoculando placas con agar Mueller-Hinton (HiMedia®), con suspensiones de las cepas ajustadas a una turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland, luego se colocó dos discos de imipenem y dos discos de meropenem en cada placa, a un disco de cada carbapenémico se le agregó 10 µl de la solución EDTA/SMA preparada previamente, las placas se incubaron a 35°C en aerobiosis durante 24 h y posteriormente se procedió a la lectura e interpretación de la prueba. Se consideró la prueba como positiva para la producción de MBLs, cuando el halo de inhibición de los carbapenémicos que contenían la solución de EDTA/SMA fue al menos 5 mm mayor con respecto al halo de los carbapenémicos sin dicha solución¹². Como control de calidad de la solución EDTA/SMA y de las pruebas de detección fenotípica de las metalo-enzimas, se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 como control negativo y *P. aeruginosa* 77297 productora de MBL de tipo VIM-2 como control positivo.

Detección de genes que codifican para las metalo-β-lactamasas mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC)

Extracción del ADN cromosomal de las cepas de *P. aeruginosa*. A partir de un cultivo puro de 18 h en agar

tripticasa soya (Hi Media®) se tomaron varias colonias, se resuspendieron en 200 µl de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) y se sometieron a ebullición en baño de María por 10 min. Posteriormente, por centrifugación, se separó el sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano, el cual se transfirió a tubos para microcentrífuga y se almacenó a -20°C⁹.

La presencia de los genes que codifican para las MBLs de las familias SPM, VIM e IMP se realizó a través de la RPC utilizando los iniciadores mostrados en la Tabla 1. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl y la mezcla estuvo compuesta por 1 µl de cada iniciador (5 pmol/ml); 20,5 ml agua bidestilada ultrapura; 25 µl LPU (Fundaim®) y 2,5 µl de ADN. Las condiciones de amplificación fueron la descritas anteriormente^{3,14,15}. Los productos obtenidos de las amplificaciones por RPC fueron observados en corridas electroforéticas en geles

Figura 1. Ubicación geográfica de los cuatro hospitales participantes en el estudio.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores en los ensayos de amplificación por reacción de polimerasa en cadena

Iniciador	Secuencia	Gen amplificado	Tamaño del producto esperado	Referencia
SPM F	5'-CCTACAATCAACGGCGA CC-3'	<i>bla_{SPM}</i>	786 pb	14
SPM R	5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'			
IMP F	5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	<i>bla_{IMP}</i>	587 pb	15
IMP R	5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'			
VIM 2004A	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'	<i>bla_{VIM}</i>	382 pb	3
VIM 2004B	5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'

de agarosa al 1,5% (Promega®), teñidos con bromuro de etidio (Sigma®) y fotografiados con una cámara digital PowerShot A700 (Canon®). Como marcador del tamaño molecular se utilizó Ladder 50 pb (Promega®).

Secuenciación de los productos amplificados. Los productos de la RPC que resultaron positivos para la detección de genes que codifican para las MBLs se purificaron utilizando el kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega®). Posteriormente, las secuencias nucleotídicas fueron determinadas por el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas-Venezuela, mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ácidos nucleicos modelo ABI 3130XL (Applied Biosystems®), utilizando los mismos iniciadores utilizados en la RPC. Las secuencias nucleotídicas resultantes fueron analizadas mediante el uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y comparadas con las secuencias génicas incluidas en la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Tipificación molecular de los aislados de *P. aeruginosa*. Se realizó la tipificación molecular de los aislados mediante la electroforesis de campos pulsantes (ECP) en el equipo Guefast-06® (NEURONIC, S.A) según lo publicado anteriormente¹⁶ con algunas modificaciones.

Preparación del ADN inmovilizado. Las cepas de *P. aeruginosa* fueron crecidas en agar Mueller-Hinton (HiMedia®), luego fueron recolectadas y lavadas con una solución de NaCl al 0,5% pH 8,0; posteriormente, se suspendieron en 50 µl de la solución de lavado y se mezclaron con 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%, fundida y atemperada a 45 °C y utilizando el molde para la fabricación de bloques, se prepararon minibloques de 3 mm x 3 mm x 0,7 mm (largo, ancho y grosor). La concentración final de células bacterianas en cada minibloque fue de $2,1 \times 10^9$ céls/ml aproximadamente.

Una vez elaborados los minibloques, las células fueron sometidas a un proceso de lisis y desproteización colocándolas en solución que contenía 0,01M Tris; 0,1M EDTA; 1% sarcosyl; 1% nonident P40 y 4M urea pH 9,5 y se incubaron por 18 h a 43 °C, posteriormente se eliminó esta solución y se lavaron con agua destilada y con una solución 0,01M Tris-HCL y 0,1M EDTA pH 8, donde se conservaron a 4°C hasta el momento de la digestión.

Digestión del ADN inmovilizado con enzimas de restricción. Cada minibloque fue lavado tres veces en solución 0,01M Tris-HCL y 0,05 M EDTA pH 8; a 4°C

por 10 min, luego se incubaron con 100 µl de tampón de digestión D 1X de la enzima proporcionado por el fabricante (Promega®) a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, cada minibloque fue transferido a 100 µl de tampón de digestión fresco y se colocó 1 µl de la enzima de restricción *Xba*I (Promega®), se incubó durante 4 h a 37°C, la reacción se detuvo reemplazando el tampón por 1 ml de 0,01M Tris-HCL: 0,1M EDTA pH 8,0.

Electroforesis de campo pulsado de los fragmentos de macrorestricción del ADN de *P. aeruginosa*. La electroforesis se realizó en una cámara minichief del equipo Guefast-06® (NEURONIC, S. A), en un gel de 7 cm x 5 cm x 0,5 cm (largo, ancho, grosor); se utilizaron 400 ml de tampón Tris-Borato EDTA 0,5X a 20 °C. Los fragmentos de ADN fueron separados a 10 V/cm durante 4 h, 57 min y 30 s en un gel de agarosa al 1,5% sumergido en el tampón de electroforesis. Los fragmentos de restricción fueron resueltos programando las siguientes rampas con diferentes números de pulsos y tiempos de pulso: 5 pulsos por 20 s, 15 pulsos por 15 s, 320 pulsos por 10 s, 1.020 pulsos por 5 s y 100 pulsos por 3 s. El gel se coloreó durante 30 min en una solución 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®), luego se visualizó en un transiluminador UV y se fotografió con una cámara digital PowerShot A700 (Canon®). El tamaño de los fragmentos de restricción en kilopares de bases (Kb), se calculó al comparar la posición de las bandas con la co-migración de un marcador de peso molecular como el fago lambda concatamerizado de 48,5 Kb (Sigma-Aldrich®).

El análisis de los perfiles obtenidos por ECP y la construcción del dendrograma fueron realizados mediante el análisis computarizado, utilizando el software GuefaScan® (NEURONIC S.A.), acorde con el coeficiente de similaridad de Dice y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). Las cepas que presentaron índice de similaridad igual o mayor a 80% se consideraron clonalmente relacionadas¹⁷.

Resultados

Se evaluaron 17 cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico con resistencia a los carbapenémicos, procedentes de cuatro hospitales del oriente y sur de Venezuela, cuyo perfil de susceptibilidad demostró siete patrones diferentes designados por orden alfabético de la A hasta la G. El patrón más frecuente fue el A (8/17), caracterizado por resistencia a los β-lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, sensibilidad intermedia a aztreonam y sensibilidad a colistina. Seguido del patrón B (4/17), el cual se diferenció del A por demostrar sensibilidad a aztreonam. El patrón A se observó en dos cepas del CHRP, dos del HITB y cuatro del HUAPA, mientras que el patrón

B se presentó en una cepa de cada hospital en estudio. Los patrones C, D, E, F y G fueron los menos frecuentes, observándose cada uno en una cepa. Independientemente del patrón de susceptibilidad que presentaron las cepas de *P. aeruginosa*, todas fueron fenotípicamente productoras de MBLs por el método de discos combinados y a través de la RPC y posterior secuenciación, se detectó MBLs de tipo VIM-2 en todas las cepas (Tabla 2).

El análisis de los productos de restricción obtenidos al digerir el genoma de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de tipo VIM-2 con la enzima *Xba*I, permitió identificar tres grupos de similitud designados como A, B y C. El grupo dominante (A) estuvo constituido por 13 cepas con similitud superior a 83%, a su vez este grupo se subdividió en cuatro subgrupos: El A1, subgrupo dominante, estuvo conformado por dos cepas del CHRP, dos del HUAPA y tres del HITB, indistinguibles entre sí; el subgrupo A2, compuesto por todas las cepas del HRL, presentando 97% de similitud con el subgrupo A1; A3 conformado por dos cepas del CHRP con 86% de similitud con A1 y el subgrupo A4 con una cepa del CHRP que presentó 83% de similitud con A1. Dos cepas del HUAPA conformaron el Grupo B y otras dos cepas de este mismo centro, el Grupo C con similitud de 73 y 65%, respectivamente, en relación al Grupo A.

Al comparar los patrones de similitud que se presentaron en cada hospital, se observó que todas las cepas de *P. aeruginosa* del CHRP (5/5) pertenecían a un mismo grupo de similitud (A). Sin embargo, se encontró que dependiendo del servicio hospitalario de donde provenía el aislado, se ubicaron en diferentes subgrupos; las cepas de UCI y del servicio de medicina pertenecen al subgrupo A1, mientras que las cepas de cirugía (2) y pediatría (1) se ubicaron en los subgrupos A3 y A4 respectivamente. Las cepas de *P. aeruginosa* del HRL (3/3), presentaron el mismo patrón de bandas, por tanto, pertenecían al mismo subgrupo de similitud (A2) independientemente del servicio evaluado. En el HITB, las cepas de *P. aeruginosa* (3/3) fueron indistinguibles entre sí formando parte del subgrupo A1; sin embargo, todas las cepas provenían de la UCI, por lo que no se pudo evaluar si existía una relación entre las cepas de *P. aeruginosa* provenientes de la UCI con respecto a otros servicios.

Las cepas de *P. aeruginosa* del HUAPA fueron las que presentaron mayor variabilidad en los patrones de bandas obtenidos en la ECP, distribuyéndose en los tres grupos de similitud encontrados. Dos cepas, una de la UCI de adultos y otra del servicio de medicina se ubicaron en el grupo de similitud A (subgrupo A1). Una cepa de la UCI pediátrica y otra de la UCI de adultos conformaron el grupo B, mientras que el último grupo de similitud (C) estuvo constituido por una cepa de retén y otra del servicio de medicina (Figura 2).

Figura 2. Dendrograma de las cepas de *P. aeruginosa* con base en sus patrones de la electroforesis de campos pulsantes. HUAPA: Hospital Universitario “Antonio Patricio Alcalá”, CHRP: Hospital Universitario “Ruiz y Páez”, HRL: Hospital “Raúl Leoni”, HITB: Hospital Industrial “Tulio Briceño”. UCI; Unidad de Cuidados Intensivos, UCI Ped: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

Discusión

Las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs frecuentemente están relacionadas a las infecciones asociadas a los cuidados de salud, y generalmente presentan otros mecanismos de resistencia, que reducen aún más las opciones terapéuticas disponibles para tratar dichas infecciones. En este estudio se evaluaron 17 cepas de *P. aeruginosa*, provenientes de diferentes servicios de cuatro hospitales de Venezuela con el fin de describir el comportamiento de uno de los mecanismos de resistencia más importantes que se presenta en nuestros hospitales.

Las pruebas de susceptibilidad demostraron que todas las cepas de *P. aeruginosa* presentaron un perfil de susceptibilidad compatible con la producción de MBLs, y que en la mayoría (16/17), la resistencia a los β -lactámicos de amplio espectro estuvo asociada a la resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina, lo cual podría deberse a la presencia de otros mecanismos de resistencia como: las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de expulsión, alteraciones de la permeabilidad de la pared celular, entre otros, ya que *P. aeruginosa* presenta una marcada capacidad para adquirir y expresar diferentes mecanismos de resistencia simultáneamente^{2,7,18}.

Aztreonam no se encuentra dentro del perfil de hidrólisis de las MBLs, por lo cual representa una opción terapéutica para el tratamiento de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* productoras de este tipo de enzimas. Sin embargo, en este estudio, sólo 5/17 cepas fueron

Tabla 2. Características epidemiológicas y microbiológicas de las cepas de *P. aeruginosa*

Procedencia	n cepa	Servicio	Año de aislamiento	Edad (años)	Sexo	Tipo de muestra	Perfil de susceptibilidad	Patrón de susceptibilidad	DC	Detección de genes que codifican para MBLs	Grupo de similitud (patrón electroforético)	
Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" Cdad. Bolívar	333-A	Cirugía	2007	26	F	Secreción de herida quirúrgica	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	A
	698-A	Cirugía	2007	78	F	Secreción de herida quirúrgica	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	A
	467-O	Pediatría	2008	9	M	Orina	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	B	+	+	-	A
	64-A	Medicina	2009	68	F	Secreción de pie diabético	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	C	+	+	-	A
	738-A	UCI	2009	30	M	Secreción intra-abdominal	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	D	+	+	-	A
Hospital "Raúl Leoni" San Félix	788-A	Traumatología	2007	33	M	Secreción de herida quirúrgica	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	B	+	+	-	A
	944-M	Cirugía	2007	27	M	Secreción de herida quirúrgica	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	E	+	+	-	A
	952-M	Medicina	2007	46	F	Sangre	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	F	+	+	-	A
	23773	UCI	2009	83	F	Secreción traqueal	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	B	+	+	-	A
Hospital Industrial "Dr. Tulio Briceño M" San Tomé	24552	UCI	2010	44	M	Secreción traqueal	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	A
	865-A	UCI	2007	40	F	Lavado bronquial	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	A
	6887,1	Medicina	2009	53	M	Punta de catéter	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	A
Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" Cumaná	4903	UCI pediátrico	2009	4	F	Secreción bronquial	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	B	+	+	-	B
	6886.3	UCI adulto	2009	71	M	Secreción de herida quirúrgica	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	B
	6925	Medicina	2009	65	F	Secreción de pie diabético	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	C
	7842	Retén	2009	0	F	Secreción ocular	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	A	+	+	-	C
	6898	UCI pediátrico	2009	1	M	Sangre	PIP ^r TZP ^r CAZ ^r CFP ^r FEP ^r IMP ^r MER ^r ATM ^r G ^r AK ^r CIPI ^r CL ^s	G	+	+	-	A
M: masculino; F: femenino; PIP: piperacilina; TZP: piperacilina/tazobactam; CAZ: ceftazidima; CFP: cefepime; IMP: imipenem; MER: meropenem; ATM: aztreonam; G: gentamicina; AK: amikacina; CIPI: ciprofloxacina; CL: colistina; DC: prueba de discos combinados.												

M: masculino; F: femenino; PIP: piperacilina; TZP: piperacilina/tazobactam; CAZ: ceftazidima; CFP: cefoperazona; FEP: cefepime; IMP: imipenem; MER: meropenem; ATM: aztreonam; G: gentamicina; AK: amikacina; ClP: ciprofloxacina; Cl: colistina; DC: prueba de discos combinados.

sensibles al aztreonam, lo cual coincide con estudios realizados en los últimos años en diferentes regiones de Venezuela donde se han venido reportando, cada vez con mayor frecuencia, la presencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs con resistencia al aztreonam. Esta resistencia generalmente se debe a la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar y causar resistencia a los β -lactámicos incluyendo aztreonam^{10,19}.

Al hacer un análisis del comportamiento de la susceptibilidad a aztreonam en los hospitales estudiados, se encontró que, de las cinco cepas procedentes del CHRP, dos presentaron susceptibilidad intermedia a aztreonam y dos fueron resistentes, lo cual difiere al estudio realizado en el año 2009, donde las diez cepas de *P. aeruginosa* evaluadas procedentes de la UCI de dicho hospital presentaron susceptibilidad a este fármaco⁹, lo cual podría indicar que con el transcurso del tiempo las cepas de *P. aeruginosa* del CHRP han adquirido nuevos mecanismos de resistencia, quizás por el uso indiscriminado de los antimicrobianos. En el HRL una cepa fue resistente a aztreonam mientras que en el HITB y el HUAPA se observaron cepas con susceptibilidad intermedia a este antimicrobiano. En estos hospitales no hay estudios anteriores que permitan evaluar cómo ha evolucionado la resistencia a este antimicrobiano.

Estudios previos refieren que colistina presenta una potente actividad frente a cepas de *P. aeruginosa* multi-resistentes, por lo que ha surgido como una alternativa terapéutica para las infecciones causadas por este microorganismo^{18,20-22}. Sin embargo, se ha reportado resistencia a colistina en algunos aislados²³⁻²⁵. En este estudio, todas las cepas de *P. aeruginosa* (17/17) fueron susceptibles a colistina, lo cual coincide con evaluaciones previas realizadas en cepas nosocomiales y de la comunidad en Mérida-Venezuela¹⁸. Sin embargo, se debe mantener una vigilancia constante a dicho antimicrobiano, ya que es una de las pocas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos multi-resistentes.

En Venezuela, la primera detección de MBL de tipo VIM-2 fue en el año 2004 en tres cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico provenientes de un hospital de Caracas⁸. Posteriormente, se reportaron cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de la familia VIM en hospitales de Caracas y Ciudad Bolívar¹⁰ y luego se confirmó la presencia de MBL de tipo VIM-2 en cepas de *P. aeruginosa* en el sur del país⁹, lo cual coincide con nuestro estudio donde todas las cepas de *P. aeruginosa* fueron productoras de MBL de tipo VIM-2.

Al evaluar los resultados de la relación clonal mediante ECP se confirmó que en los hospitales de Cumaná, San Tomé, Ciudad Bolívar y San Félix, circulan cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de tipo VIM-2, con un

origen clonal común, lo cual es atribuible a la transferencia entre hospitales de pacientes colonizados o infectados, debido a la cercanía que existe entre ellos. Resultados similares han sido reportados en estudios previos en hospitales de Japón, Taiwan, Hungría y Brasil donde se ha evaluado y comprobado la diseminación clonal de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs entre hospitales de una o de diferentes regiones²⁶⁻³⁰. La presencia de la diseminación clonal de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de tipo VIM-2 en hospitales de diferentes regiones de Venezuela indica prácticas inadecuadas de control de las infecciones asociadas a los cuidados de salud, posiblemente por la falta de adherencia a los protocolos de control de infecciones.

En este estudio, además de las cepas de origen clonal común, se observó la presencia de tres clones diferentes en uno de los hospitales, lo que podría indicar no sólo la diseminación de una cepa resistente, sino la diseminación horizontal de este mecanismo de resistencia, lo cual puede deberse a la difusión de plásmidos de resistencia producto de la presión selectiva ejercida por el abuso y mal uso de los antimicrobianos, tal como ha sido reportado por otros autores³¹.

En el CHRP, se observó que las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de tipo VIM-2 pertenecían a un mismo grupo clonal con subgrupos de similaridad diferentes, dependiendo del servicio hospitalario donde fueron aisladas, lo que hace presumir que todas estas cepas provienen de un ancestro común, que posiblemente adquirió un determinante de resistencia y posteriormente se diseminó por los diferentes servicios. Estos hallazgos son similares a los reportados en Colombia, donde se encontró que algunas cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs con diferentes perfiles de resistencia, pertenecían a un mismo grupo clonal³².

En el HRL se encontró que todas las cepas pertenecían al mismo subgrupo de similaridad independientemente del servicio de aislamiento, lo cual indica una clara diseminación clonal de *P. aeruginosa* productora de MBL de tipo VIM-2 en los servicios de dicho hospital. Resultados similares han sido reportados en España⁴. En el HITB todas las cepas fueron indistinguibles entre sí y conformaron un mismo subgrupo de similaridad, pero, a diferencia del HRL, pertenecían sólo al servicio de la UCI por lo que se sugiere realizar investigaciones posteriores donde se evalúe si existe una diseminación clonal de estas cepas en los diferentes servicios del hospital de San Tomé.

En el HUAPA se evidenció la presencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL de tipo VIM-2 de origen policlonal. En diferentes servicios se encontró cepas de *P. aeruginosa* de los grupos clonales A, B y C. Coincidiendo con estudios realizados en Argentina y España donde demuestran la diseminación de varios grupos clonales de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs en un mismo

hospital^{2,22}. Es importante destacar que el grupo clonal B se observó en cepas provenientes de la UCI de adultos y de la UCI pediátrica, mientras que el clon C provenía de cepas de los servicios de reten y medicina y que además estos grupos clonales presentan una similaridad de 92% entre ellos, lo cual podría indicar que conforman un solo grupo clonal, debido a la similitud que existe entre ellos y la relación que existe entre los servicios de donde proceden los aislados.

Finalmente, este estudio permitió evidenciar que existe una diseminación clonal de *P. aeruginosa* productoras de MBL de tipo VIM-2 en los hospitales del oriente y sur de Venezuela, implicando un impacto significativo en las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por este tipo de microorganismo. Por ello, en los laboratorios de microbiología se deben implementar métodos microbiológicos que provean información sobre los mecanismos de resistencia que permitan garantizar el control de las infecciones causadas por esta bacteria y la introducción oportuna de las medidas de prevención. Así mismo, se deben implementar programas de vigilancia epidemiológica que permitan racionalizar el uso de antimicrobianos de amplio espectro basados en la epidemiología local y el mecanismo de resistencia presente, así como aplicar técnicas de biología molecular para la identificación de genes de resistencia y la tipificación de microorganismos, para reducir el surgimiento y difusión de mecanismos de resistencia.

Agradecimientos. A Elsa Salazar, Benito Campos, Yamin Rodríguez y Margarita Echeverría por facilitarnos las cepas usadas en este estudio.

Resumen

Se analizaron 17 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas en cuatro hospitales del oriente y sur de Venezuela colectadas entre los años 2007 y 2010. En todas las cepas se demostró la producción de metalo- β -lactamasas (MBLs) por el método de discos combinados. Mediante la amplificación por la reacción de polimerasa en cadena (RPC) de los genes que codifican para las metalo- β -lactamasas de las familias IMP, VIM y SPM, y su posterior secuenciación, se confirmó la presencia de MBLs de tipo VIM-2 en todas las cepas. Mediante la electroforesis de campos pulsantes (ECP), las cepas se clasificaron en tres grupos de similaridad. El grupo dominante (A) estuvo constituido por 13 cepas provenientes de los cuatro hospitales, con similaridad superior al 83% entre ellas. Dos cepas del hospital de Cumaná conformaron el Grupo B y otras dos el Grupo C con similaridad de 73 y 65%, respectivamente, con el Grupo A. Estos resultados confirmaron que en los hospitales del oriente y sur de Venezuela, circulan cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBLs de tipo VIM-2, con un origen clonal común. Asimismo, en el hospital de Cumaná circulan cepas de origen policlonal.

Referencias bibliográficas

- 1.- Driscoll J, Brody S, Kollet M. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67: 351-68.
- 2.- Cejas D, Almuzara M, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figueroa S, et al. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Rev Arg Microbiol* 2008; 40: 238-45.
- 3.- Pitout J, Chow B, Gregson D, Laupland K, Elsayed S, Church D. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: Emergence of VIM-2 producing isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 294-8.
- 4.- Rodríguez M, Ruiz B, Rodríguez C, Romo M, Monteagudo I y Martínez L. Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de la metalo- β -lactamasa VIM-2 en Cantabria, España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28: 99-103.
- 5.- Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamasas: the quiet before the storm?. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
- 6.- Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3929-31.
- 7.- Nicolau J, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28: 19-28.
- 8.- Mendes R, Costanheira M, García P, Guzmán M, Toleman M, Walsh T, et al. First isolation of blaVIM-2 in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1433-4.
- 9.- Guevara A, Waard J, Araque M. Detección del gen blaVIM-2 de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasa aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela. *Rev Chilena Infectol* 2009; 26: 336-41.
- 10.- Sánchez D, Marcano D, Spadola E, León L, Payares D, Ugarte C, et al. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. *Rev Inst Nac Hig "Rafael Ángel"* 2008; 39: 17-22.
- 11.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; tenth edition informational supplement. M02-A10. Pensilvania, USA: 2010.
- 12.- Guevara A, Gamboa A, Machado M, Vera M. Evaluación del ácido etilendiaminotetraacético y del mercaptoacético de sodio en la detección de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* mediante la técnica del disco combinado. *Rev Soc Venez Microbiol* 2010; 30: 11-7.
- 13.- Lee K, Lim Y S, Yong D, Yum J H, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4623-9.
- 14.- Gales A, Menezes L, Silbert S, Sader H. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 200; 52: 699-702.
- 15.- Senda K, Arakawa Y, Ichihama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. RCP detection of metallo- β -lactamase gene (bla_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2909-13.

- 16.- López-Cánovas L, Sánchez-Alonso A, Higginson D, Ariosa C, Clark H, Riverón A M. Nonenzymatic protocol for *Pseudomonas aeruginosa* DNA preparation and rapid subtyping by mini pulsed-field gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2003; 24: 1152-8.
- 17.- Van Belkum A, Tassios P, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry N, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1-46.
- 18.- López F, Culebras E, Bonilla I, Gómez M, Picazo J. Actividad *in vitro* de terapia combinada con colistina frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en unidad de cuidados intensivos. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21: 189-93.
- 19.- Salazar P, Araque M, Mosqueda N. Análisis fenotípico del gen *bla_{VIM}* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo-β-lactamasas aisladas en Mérida, Venezuela. *Rev Fac Farm* 2010; 52: 12-7.
- 20.- Salinas C, Hernández A, Oropeza R, Olvera C, Poblano M, Franco J. Colistín en el tratamiento de infección por *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int* 2010; 24: 173-7.
- 21.- Durakovic N, Radojcic V, Boban A, Mrcic M, Sertic D, Serventi R, et al. Efficacy and safety of colistin in the treatment of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with hematologic malignancy: a matched pair analysis. *Intern Med* 2011; 50: 1009-13.
- 22.- Jimeno A, Alcalde M, Blázquez A. Detección de un brote epidémico por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa. *Rev Clin Esp* 2011; 1-5.
- 23.- Laupland K, Parkins M, Church D, Gregson D, Louie T, Conly J, et al. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary health region: Importance of metallo-β-lactamase (MβL) producing strains. *J Infect Dis* 2005; 192: 1606-12.
- 24.- Fica A, Céspedes I, Gompertz M, Jalón M, Sakurada A, Sáez E. Colistín en infecciones nosocomiales por bacilos gramnegativos pan-resistentes. *Rev Chilena Infectol* 2007; 24: 360-7.
- 25.- Samonis G, Matthaiou D, Kofteridis D, Maraki S, Falagas M. *In vitro* susceptibility to various antibiotics of colistin-resistant gram-negative bacterial isolates in a general tertiary hospital in Crete, Greece. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1689-91.
- 26.- Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minárovits J, Knausz M, Watine J, et al. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4220-3.
- 27.- Huang Y, Changa S, Lauderdaleb T, Yanga A, Wang J. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-β-lactamase genes in Taiwan. *Diag Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 211-6.
- 28.- Ohara M, Kouda S, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Molecular characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 271- 7.
- 29.- Scheffer M, Gales A, Barth A, Rodrigues J, Dalla L. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. *Braz J Infect Dis* 2010; 14: 508-9.
- 30.- Souza A, Rodrigues M, Dorn G, Souza M, Pereira N, Garcia B, et al. Metallo-β-lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011; 15: 195-9.
- 31.- Peleg A, Franklin C, Bell J, Spelman D. Dissemination of the metallo-β-lactamase gene *bla_{IMP}-4* among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1549-56.
- 32.- Martínez P, Espinal P, Máttar S. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β-lactámicos de amplio espectro en el hospital San Jerónimo de Montería. *Infectio* 2007; 11: 6-15.