Detección de serinocarbapenemasas de clase A y otros mecanismos de resistencia enzimática a β -lactámicos en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, aisladas de pacientes de un hospital universitario de Santiago, Chile

Virginia de la Lastra, Lina M. Rivas, Francisco Silva, M. Teresa Ulloa, M. Eugenia Pinto y Mario Vidal

Hospital Dipreca, Santiago.

Unidad de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (VDLL).

Universidad de Chile, Santiago.

Facultad de Medicina
Instituto de Ciencias Biomédicas.

Programa de Microbiología-
Micología (LMR, MTU)

Hospital Clínico de la
Universidad de Chile.

Comité de Infecciones
Intrahospitalarias (FS).

Laboratorio Clínico (MEP, MV).

Establecimiento donde se realizó el
trabajo: Hospital Clínico Universidad
de Chile e Instituto de Ciencias
Biomédicas de la Universidad de
Chile.

Los autores declaran no tener
conflictos de interés en relación con
el contenido de este trabajo

Fuente de financiamiento: Hospital
Clínico Universidad de Chile a
través del Concurso Interno de
Investigación en temas libres 2010.
OAIC N° 406/10

Recibido: 2 de diciembre de 2013
Aceptado: 9 de septiembre de 2014

Correspondencia a:

María Teresa Ulloa Flores
mtulloa@med.uchile.cl

Detection of serinocarbapenemases Class A and other mechanisms of enzymatic resistance to β -lactams in enterobacteria strains with diminished susceptibility to carbapenems isolated of patients in a university hospital

Background: The emergence of carbapenemase mediated resistance in *Enterobacteriaceae* has a strong clinical impact. This study aimed to do a genotypic and phenotypic characterization of the enzymatic resistance to β -lactams in clinical *Enterobacteriaceae* isolates with decreased susceptibility to carbapenems in a university medical center in Santiago. **Methods:** During April-September 2010 at Hospital Clínico Universidad de Chile, 23 isolates of carbapenem non susceptible *Enterobacteriaceae* were collected. We used PCR for the detection of class A carbapenemases (SME, IMI, NMC, GES and KPC) and the modified Hodge with the boronic acid test to phenotypically assess the presence of serine-carbapenemases. To assess extended spectrum β -lactamases (ESBLs) the CLSI phenotypic tests were performed. Metallo- β -lactamases (MBL) and AmpC were assessed with commercial tablets. **Results:** 18/23 were *Klebsiella pneumoniae* and 5/23 strains were *Enterobacter cloacae*. All PCR to class A carbapenemases were negative. 3/23 strains (all *E. cloacae*), were positive to the Hodge modified test and 1/23, a *K. pneumoniae*, was positive to the boronic acid test. ESBLs were detected in 14/23 of the strains and AmpC in 5/23. No MBL was detected. **Conclusion:** No class A serine-carbapenemase was detected. The decreased susceptibility to carbapenems is probably explained by the β -lactamase activity and due to porin loss.

Key words: Carbapenemases, carbapenems, β -lactamic resistance, enterobacteria, active surveillance.

Palabras clave: Carbapenemasas, carbapenémicos, resistencia β -lactámicos, enterobacterias, vigilancia activa.

Comentario Editorial en pág. 689

Introducción

La resistencia antimicrobiana es un problema creciente con impacto múltiple en la atención sanitaria ya que prolonga la duración de la enfermedad infecciosa, los tratamientos y la estadía hospitalaria; así mismo, aumenta las interacciones farmacológicas, los costos asistenciales, la carga económica sobre las familias y la sociedad y el riesgo de muerte^{1,2}.

En los últimos años, ha sido especialmente relevante la resistencia antimicrobiana mediada por β -lactamasas: β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y β -lactamasas AmpC, a las cuales se ha agregado la emergencia de carbapenemasas. Estas últimas enzimas, relevantes ya que son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos, con limitadas opciones terapéuticas⁵, se transfieren fácilmente de un organismo a otro y su prevalencia es cada vez mayor en aislados clínicos²⁻⁴.

En Chile, la menor susceptibilidad a carbapenémicos en enterobacterias, se encuentra en las cepas aisladas en las unidades de cuidados intensivos, principalmente en *Klebsiella pneumoniae*. La susceptibilidad de este agente a ertapenem en pacientes hospitalizados es de 75%. Por otra parte, los aislados de *Escherichia coli* aún tienen un buen nivel de susceptibilidad a carbapenémicos, sobre 99%; sin embargo, se ha observado una disminución en la sensibilidad y cada vez con mayor frecuencia, aparecen aislados no susceptibles, especialmente en urocultivos de pacientes hospitalizados (0,9% de resistencia a ertapenem). La susceptibilidad de *E. coli* a cefalosporinas, en pacientes ambulatorios ha disminuido en forma importante, mostrando una susceptibilidad a cefalotina de 62,4% y a cefotaxima de 92,2%⁶.

La resistencia a carbapenémicos en enterobacterias puede relacionarse con la producción de carbapenemasas, o a la producción de cefalosporinasas, como BLEE y/o AmpC, en combinación con una disminución de la per-

meabilidad de la membrana externa, debido a una pérdida, modificación y/o disminución de la expresión de porinas y/o a la sobreexpresión de bombas de expulsión⁷⁻⁹.

Las carbapenemasas son β -lactamasas que, además de degradar carbapenémicos, hidrolizan prácticamente todos los β -lactámicos; su espectro de hidrólisis de β -lactámicos es tan amplio, que hasta el día de hoy, no ha sido igualado por otras enzimas⁹. Según su naturaleza, se pueden clasificar en cuatro clases: A, B, C y D. Las clases A, C y D incluyen β -lactamasas con serina en su sitio activo, mientras que las β -lactamasas de clase B, corresponden a metalo-enzimas dependientes de zinc⁹⁻¹¹.

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*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*⁹. 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^{9,12-17}.

En los últimos años se han descrito enterobacterias productoras de carbapenemasas de clase A de tipo IMI, SME, NMC, GES y KPC⁹. Las carbapenemasas IMI SME y NMC están codificadas en el cromosoma, mientras que las carbapenemasas de tipo KPC y GES están codificadas en plásmidos, lo que las hace fácilmente transferibles^{9,18}. La rápida diseminación de estas enzimas ha limitado considerablemente la elección de antimicrobianos y constituye una seria amenaza de infecciones por enterobacterias panresistentes¹⁸. En las enterobacterias también se han detectado otras carbapenemasas como las metalo- β -lactamasas (MBL) de tipo IMP, VIM y SPM^{9,10}.

De las serinocarbapenemasas descritas, la enzima KPC ha tenido una diseminación más rápida en los últimos años. En áreas endémicas de carbapenemasas, más de un tercio de las *K. pneumoniae* posee el gen *bla*_{KPC}⁷. La presencia mundial de uno de los clones de *K. pneumoniae* ST258, indica que la mayor parte de la diseminación es clonal¹⁹, y, gran parte del éxito en su diseminación radica en su asociación a transposones, especialmente al transposón Tn4401¹⁹.

A la fecha, no existe un consenso sobre la mejor manera de realizar un diagnóstico sencillo de la presencia de carbapenemasas, ya que la mayoría de los estudios utiliza la detección de los genes que codifican para las distintas enzimas, mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC), lo cual es costoso y laborioso, ya que requiere la utilización de múltiples partidores según el número de genes que se desee detectar²⁰⁻²².

El *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) ha recomendado realizar el test de Hodge modificado en todas las cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos²³. Sin bien, la sensibilidad

de este test es buena, presenta falsos positivos en casos de alta prevalencia de enzimas tipo BLEE o AmpC con hiperproducción.

Estudios en Argentina han mostrado que en cepas con sospecha de resistencia a carbapenémicos, el test de Hodge tiene hasta 25% de falsos positivos, por lo que se han diseñado nuevos protocolos para mejorar la especificidad de estos ensayos²⁴. Una de las propuestas, es utilizar compuestos derivados del ácido borónico, el cual tiene la capacidad de inhibir la acción de las serinocarbapenemasas. En cepas productoras de serinocarbapenemasas, se determinó que una disminución en la concentración inhibitoria mínima (CIM) de tres diluciones de imipenem combinado con ácido borónico, frente a la CIM para imipenem no combinado, tiene una sensibilidad y especificidad cercanas a 100%²⁵. Lo mismo ocurre al aplicar este principio a técnicas de susceptibilidad por difusión en las que un aumento en el halo de inhibición de 4 mm, en un sensidisco de imipenem/borónico, frente a otro de imipenem, sería el mejor predictor de la presencia de una serinocarbapenemasa²⁵. Cabe aclarar, que estos ensayos se han realizado con cepas circulantes a nivel local, por lo que sus resultados podrían no ser aplicables a otras regiones geográficas, donde el tipo de enzimas de las cepas resistentes puede variar o tener expresiones distintas.

Debido a estos antecedentes, el conocimiento de la epidemiología local y la caracterización de la resistencia, se ha convertido en una necesidad imperiosa, que es muy importante de considerar al indicar terapia empírica.

El objetivo de este estudio fue caracterizar genotípica y fenotípicamente la resistencia enzimática a β -lactámicos en enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos en cepas aisladas de pacientes de un hospital universitario de Santiago, Chile, durante el año 2010, con especial énfasis en la detección de serinocarbapenemasas de clase A de los tipos SME, IMI, NMC, GES y KPC. Así mismo, se evaluó fenotípicamente la presencia de otras enzimas, como MBL, BLEE y AmpC, que expliquen esta susceptibilidad disminuida a carbapenémicos.

Materiales y Métodos

Durante el periodo de estudio se aislaron 1.524 enterobacterias provenientes de pacientes hospitalizados, de las cuales se incluyeron en este estudio 23 cepas (18 *K. pneumoniae* y 5 *E. cloacae*) que presentaron susceptibilidad intermedia o resistente por lo menos a uno de los siguientes carbapenémicos: ertapenem (ERP), imipenem (IMP) o meropenem (MRP). Las cepas se recolectaron en forma prospectiva entre los meses de abril y septiembre de 2010 y provenían de pacientes internados (una cepa por paciente, la primera cepa aislada) en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. De cada uno de los aislados, se consignó la fecha de aislamiento y el tipo de muestra.

La identificación de los aislados y el estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó utilizando el equipo VITEK® 2 (bioMérieux). La identificación de las cepas fue corroborada con las pruebas bioquímicas convencionales y la determinación de la susceptibilidad *in vitro* por el método de difusión de Kirby Bauer con las recomendaciones del CLSI 2009¹⁹. Se utilizó la recomendación del CLSI 2009, ya que en el periodo de recolección de las cepas éste era el vigente en nuestro hospital.

Detección fenotípica de serinocarbapenemasas de clase A

Se empleó el test de Hodge modificado con los discos de ERP e IMP y el método con ácido 3-aminofenilborónico (APB) propuesto por Pasterán y cols.²⁴, para detectar fenotípicamente la presencia de estas enzimas; éste último, sólo se realizó en cepas de *K. pneumoniae*. Se emplearon como controles las cepas *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 y *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Detección genotípica de las serinocarbapenemasas de clase A

La detección de los genes que codifican para las serinocarbapenemasas de clase A de los tipos KPC, GES, IMI, NMC y SME se realizó mediante RPC utilizando los oligonucleótidos reportados por Queenan y Bush (2007)²⁶. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL utilizando 25,75 µL de H₂O dd, 10 µL de RPC buffer 5x (Promega®), 6 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega®), 1 µL dNTPs 10 mM, 1 µL de cada partidor, 0,25 µL GoTaq flexi ADN polimerase (Promega®) y 1 µL de ADN. El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 94° por 10 min; 35 ciclos de 94°C para la

denaturación y 72°C para la extensión, la temperatura de *annealing* para KPC, GES y SME fue de 50°C; en cambio para IMI y NMC fue de 52 y 56°C, respectivamente. Los productos de la RPC fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos en solución de TAE 0,5X con bromuro de etidio durante 15 min. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz UV (Spectroline UC 312-R) y fotografiados en un sistema de captura Kodak (EDAS 2009 KODAK, Software KODAK 1D3.6). Se utilizó como estándar de peso molecular ADN ladder de 1Kb (New England Biolabs®).

Detección fenotípica de BLEE, AmpC y MBL

La detección de las enzimas BLEE se realizó empleando el método de disco combinado, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI 2009. Para la detección de AmpC y MBL se utilizaron las tabletas comerciales de Rosco Diagnostica® AmpC Confirmative ID Pack y Carbapenemases/Metallo-B-Lactamase Confirmative ID Pack®, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

De las 23 cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos aisladas durante el período abril-septiembre de 2010, 18 cepas correspondieron a *K. pneumoniae* y 5 a *E. cloacae*. Las muestras clínicas de las cuales se aislaron estas cepas fueron: urocultivo (14/23), hemocultivo (3/23), cultivo de punta de catéter (3/23) y secreciones respiratorias (3/23).

El estudio de susceptibilidad de los aislados clínicos evidencia resistencia a varios antimicrobianos. El 100% (23/23) de las cepas fue resistente a nitrofurantoína, cefalosporinas de primera generación (cefalotina y cefazolina) y cefoxitina. El 95,7% (22/23 cepas) fueron no susceptibles a cefotaxima, ceftazidima o ciprofloxacina; 91,4% (21/23) no susceptible a amikacina; (87%) 20/23 a gentamicina; y (78,3%) 18/23 no susceptibles a cotrimoxazol. En cuanto a los carbapenémicos, 100% de los aislados fue no susceptible a ertapenem, siendo 87% (20/23) resistentes y 13% restante intermedio (3/23), el 8,7% (2/23) y 4,3% (1/23) fueron resistentes a meropenem e imipenem, respectivamente (Figura 1).

En cuanto a la detección fenotípica de serinocarbapenemasas de clase A, el test de Hodge con ertapenem e imipenem fue positivo para 3/23 cepas, las 3 *E. cloacae*; sin embargo, sólo una de ellas fue positiva para ambos carbapenémicos. Por su parte, la prueba con ácido borónico con el disco de ertapenem fue positiva en 1/18 cepas analizadas y correspondió a *K. pneumoniae*. La detección genotípica de KPC, GES, NMC, SME e IMI mediante RPC fue negativa para todas las cepas en estudio.

Figura 1. Susceptibilidad de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos aislados de pacientes hospitalizados del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, abril-septiembre 2010 (n = 23). F: Nitrofurantoína, CIP: ciprofloxacino, AN: amikacina, GM: gentamicina, SXT: trimetropin-sulfametoxazol, CF: cefalotina, CZ: cefazolina, FOX: cefoxitina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, ERT: ertapenem, MER: meropenem, IMP: imipenem.

Tabla 1. Resultados de test fenotípicos y genotípicos en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, aisladas de pacientes internados en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Abril-septiembre 2010

Identificación	Test de Hodge ERP	Test de Hodge MRP	APB	RPC serinocarpenemasas clase A	BLEE CLSI	Discos Rosco AmpC	Discos Rosco MBL
<i>E. cloacae</i>	-	-	nr	-	-	+	-
<i>E. cloacae</i>	+	+	nr	-	-	+	-
<i>E. cloacae</i>	+	-	nr	-	-	+	-
<i>E. cloacae</i>	-	-	nr	-	-	+	-
<i>E. cloacae</i>	-	+	nr	-	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
nr: no realizado. +: positivo. -: negativo. ERP: ertapenem. MRP: meropenem.							

Respecto a la detección fenotípica de BLEE en los aislados, 14/23 cepas (60,8%) fueron positivas, (13 *K. pneumoniae* y 1 *E. cloacae*); ésta última cepa presentó test de Hodge con meropenem positivo. La detección fenotípica de AmpC mediante las tabletas de Rosco Diagnóstica® resultó positiva para 5/23 (21,7%) cepas, todas correspondientes a *E. cloacae*. Finalmente, no se detectó la presencia de MBL mediante el test Carbapenemasas/Metallo-B-Lactamase Confirmative ID Pack en las enterobacterias estudiadas (Tabla 1).

Discusión

Durante el período (año 2010) ninguno de los aislados analizados presentó genes que codifican serinocarbenemasas de clase A de los tipos KPC, GES, IMI, NMC y SME mediante RPC, si bien 87% de las cepas eran resistentes al ertapenem.

Por otro lado, es necesario tener presente que las cepas incluidas en este estudio fueron seleccionadas con los puntos de corte del CLSI 2009, que eran más altos para carbapenémicos que los utilizados actualmente; y que la presencia de carbapenemasas no siempre define resistencia a carbapenémicos, pudiendo mostrar incluso un fenotipo susceptible a ellos¹¹.

Hasta el año en que se realizó este estudio, no se habían detectado enterobacterias productoras de carbapenemasas en nuestro país, a pesar de la vigilancia realizada en diversos centros asistenciales incluido el nuestro²⁸. En Chile, sólo en marzo del 2012 se detectó la primera serinocarbenemasa de tipo KPC en un caso importado²⁹, en abril se detectó el primer caso autóctono de KPC, y en junio del mismo año, se notificó la presencia de la cepa epidémica *K. pneumoniae* KPC-2 ST258³².

Respecto a la detección fenotípica de serinocarbenemasas, en nuestro estudio 3/23 cepas analizadas,

presentaron el test de Hodge positivo, y una cepa de *K. pneumoniae* dio positivo la prueba con ácido borónico (Tabla 1). Sin embargo, estos resultados fueron considerados falsamente positivos, teniendo en cuenta que en nuestras cepas no se detectaron los genes que codifican para serinocarbenemasas. Además, en la literatura científica, se describe que el test de Hodge puede arrojar resultados erróneos como consecuencia de la producción de BLEE acoplado a la pérdida de porinas, especialmente en áreas geográficas en la cuales existe una alta prevalencia de BLEE³⁰.

Las pruebas para detectar MBL también fueron negativas; no obstante, se debe mantener su búsqueda, ya que han aumentado en forma importante y se han asociado a brotes con diseminación clonal^{11,31}. En el año 2008 se detectó en Suecia por primera vez una enterobacteria productora de NDM-1 en un paciente indio proveniente de Nueva Delhi. Desde mediados del año 2010 se han detectado enterobacterias productoras de esta metaloenzima en todos los continentes y en junio 2013 ya se detectó en Argentina³².

La presencia de BLEE se encontró en 14/23 (60,8%) de las cepas. Estos datos son similares a los encontrados en otros estudios, donde la prevalencia de BLEE en enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos es de alrededor de 50%^{6,28}. La mayoría de las cepas BLEE positivas (13/14) se asociaron a *K. pneumoniae*. Solo se detectó AmpC en cepas de *E. cloacae*, situación que es prevalente. En este estudio, sólo una cepa de *E. cloacae* presentó ambas enzimas. Estos resultados son consistentes con otros estudios^{9,33}. La resistencia en *K. pneumoniae*, se asoció a BLEE; sin embargo, la ausencia de AmpC, podría estar subestimada, ya que en este estudio no se buscaron AmpC plasmidiales, siendo la CMY-2 en particular, prevalente a nivel mundial, tanto en cepas de pacientes hospitalizados como en ambulatorios^{34,35}. Por otra parte, *E. cloacae* se asocia principalmente a sobreexpresión de AmpC, aunque es posible encontrar cepas con BLEE y AmpC simultáneamente.

Respecto del estudio de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos, entre las limitantes, es necesario señalar que en este estudio, no se realizó la detección de carbapenemasas de tipo OXA, cierre de porinas y bombas de expulsión; mecanismos de resistencia cada vez más frecuentes en enterobacterias. En este sentido, se han descrito aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* resistentes a ertapenem debido a la ausencia o reducción en la expresión de las porinas OmpK35 y OmpK36 y OmpC y OmpF, respectivamente, en combinación con la producción de β -lactamasas como BLEE, AmpC, CTXM-2 y OXA-48^{33,36,37}. En contraste, la alteración en las bombas de expulsión no es frecuente y su rol en la resistencia a carbapenémicos en estos dos agentes es menor³⁷.

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. Este estudio constituye un aporte a dilucidar los mecanismos involucrados en la susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos, problema emergente que cada día cobra más importancia. Hasta noviembre 2013 sólo, se han confirmado 18 aislados portadores de KPC en Chile: *K. pneumoniae*, una cepa de *E. coli* y una de *K. oxytoca*³⁸, por lo que probablemente los mecanismos que explican la susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, involucran mecanismos de resistencia enzimática a β -lactámicos evidenciados en este estudio combinados con cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana (pérdida, modificación y/o disminución de la expresión de porinas) y/o hiperexpresión de bombas de flujo^{33,36,37,39}.

Además, las enterobacterias productoras de carbapenemasas pueden dar un bajo nivel de resistencia e incluso susceptibilidad a carbapenémicos *in vitro*¹¹, por lo que representan un desafío clínico, diagnóstico y terapéutico. Por este motivo, se debe continuar con la vigilancia activa de estas enzimas en cualquier aislado de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a cualquier carbapenémico. Conocer nuestra realidad local, permite tomar las medidas adecuadas y estar alertas ante la llegada de nuevas carbapenemasas.

Agradecimientos. Los autores agradecen a Helia Bello, Gerardo González y Sergio Mella de la Universidad de Concepción, su colaboración en este estudio.

Resumen

Introducción: La emergencia de resistencia a β -lactámicos por carbapenemasas en enterobacterias tiene gran importancia clínica. El objetivo de este estudio fue caracterizar genotípica y fenotípicamente la resistencia enzimática a β -lactámicos en enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, en cepas aisladas de pacientes de un hospital universitario de Santiago. **Metodología:** Durante abril-septiembre 2010, en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile se recolectaron 23 aislados. Se detectaron serinocarbenemasas clase A (SME, IMI, NMC, GES y KPC) mediante RPC. Se empleó el test de Hodge modificado y ácido fenil-borónico (APB) para la detección fenotípica de serinocarbenemasas. Se detectó la presencia de β -lactamasas de espectro extendido según CLSI y AmpC y MBL mediante tabletas comerciales. **Resultados:** 18 cepas (78,26%) correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* y 5 cepas (21,74%) a *Enterobacter cloacae*. Todas las RPC para serinocarbenemasas fueron negativas, en tanto, el test de Hodge fue positivo para 3/23 cepas,

todas *E. cloacae*. Una cepa de *K. pneumoniae* fue positiva para APB. Se detectó BLEE en 14/23 cepas, AmpC en 5/23 cepas y no se detectó MBL. **Conclusiones:** En las cepas estudiadas no se detectaron serinocarbenemasas

clase A. Probablemente los mecanismos que explican la susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, involucran resistencia enzimática, combinados con cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana.

Referencias bibliográficas

- Organización Mundial de la Salud [www.who.int]. Washington D.C.: Farmacoresistencia; 2011. Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública. Disponible en: http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/index.html.
- Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28 (Supl 4): 4-9.
- Thomson K S. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (4): 1019-25.
- Hawkey P M, Jones A M. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64 Suppl 1: i3-10.
- Paterson D. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000; 6 (9): 460-3.
- Cifuentes M, Silva F, García P, Bello H, Briceño I, Calvo M, et al. Grupo Colaborativo de Resistencia. Susceptibilidad Antimicrobiana en Chile 2012. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31 (2): 123-30.
- Kaczmarek F, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz T. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla (ACT-1) β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3396-406.
- Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 470-82.
- Wozniak A, Villagra N, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, et al. Porin alterations present in non carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate-level of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol* 2012; 61: 1270-9.
- Tafur D, Torres J, Villegas V. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2008; Volumen 12 N° 3.
- Nordmann P, Nass T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791-8.
- Grundmann H, Livermore D M, Giske C G, Canton R, Rossolini G M, et al. CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: Conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010; 18; 15.
- 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 Medicine* 2005; 165: 1430-5.
- Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber M J, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3026-9.
- Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4423-4.
- Peirano G, Seki L M, Val Passos V L, Pinto M C, Guerra L R, Asensi M D. Carbapenem-hydrolysing {beta}-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 265-8.
- 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* 2008; 14.
- Ellington M J, Kistler J, Livermore D M. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 321-2.
- CLSI Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically- Eighth Edition. M07-A8. Wayne. 2009.
- Anderson K F, Lonsway D R, Rasheed J K, Biddle J, Jensen B, Mc Dougal L K, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2723-5.
- Hindiye 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.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M-100-S20. 20th informational supplement. Wayne. 2010.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M-100-S23. 23th informational supplement. Wayne. 2013.
- Pasteran F, Méndez 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.
- Pasteran F, Méndez 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.
- Queenan A, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 142 (20): 440-58.
- Endimiani A, Hujer A, Perez F, Bethel C R, Hujer K M, Kroeger J, et al. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 427-37.
- Gallardo N, Wosniak A, Roman JC, Garate C, Kalergis A. Búsqueda de cepas de carbapenemasas en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos en un hospital universitario. Libro de resúmenes XXV Congreso Chileno de Infectología 2008 página 64. Jueves 6 de noviembre poster 8.
- Cifuentes M, García P, San Martín P, Silva F, Zúñiga J, Reyes S, et al. Primer caso de detección de bla KPC en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Rev Chilena Infectol* 2012; 29: 224-8.
- Carvalhoes C G, Picão R C, Nicoletti A G, Xavier D E, Gales A C. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65 (2): 249-51.
- Heller I, Grif K, Orth D. Emergence of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in Tyrol, Austria. *J Med Microbiol* 2012; 61: 567-71.
- Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología. Alerta epidemiológica: Emergencia de Carbapenemasa de tipo NDM en Argentina. Boletín Informativo N° 3 Junio 2013. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/07/Alerta-epidemiologica-NDM-Arg-v11.pdf> (accedido agosto 2013).

- 33.- Zhou T, Zhang X, Guo M, Ye J, Lu Y, Bao Q, Chi W. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* from a teaching hospital in Wenzhou, Southern China. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(2): 96-102.
- 34.- Mammeri H, Guillon H, Eb F, Nordmann P. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (11): 4556-60.
- 35.- Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27 (10): 915-21.
- 36.- Little M L, Qin X, Zerr D M, Weissman S J. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39 (1): 52-7.
- 37.- Doumith M, Ellington M J, Livermore D M, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63 (4): 659-67.
- 38.- Comunicado ISP: Instituto de Salud pública de Chile confirma aislamiento de una cepa de *Klebsiella oxytoca* productora de carbapenemasa (KPC-2), con CIM en rango sensible a carbapenémicos. 29 de Noviembre 2013 <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Comunicado%20KPC%20oxytoca%2029112013.pdf> (accedido diciembre de 2013).
- 39.- Gröbner S, Linke D, Schütz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, et al. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J Med Microbiol* 2009; 58 (Pt 7): 912-22.