

# Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a $\beta$ -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería

Molecular epidemiology of broad-spectrum  $\beta$ -lactams resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hospital San Jerónimo, Montería

PEDRO MARTÍNEZ<sup>1</sup>

PAULA ESPINAL<sup>2</sup>

SALIM MÁTTAR<sup>1</sup>

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* ha emergido como uno de los principales patógenos hospitalarios causantes de infecciones graves y productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) inusuales, como PER-1, OXA y carbapenemasas.

**Objetivo.** Caracterizar los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro por investigación de los genotipos por rep-PCR y su diseminación en este hospital.

**Métodos.** Se obtuvieron 26 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro del Hospital San Jerónimo de enero a agosto del 2002. La resistencia a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro se estableció con el sistema MicroScan® ESBL plus™. Se utilizó la técnica de rep-PCR para la tipificación molecular de los microorganismos.

**Resultados.** Los aislamientos mostraron resistencia a la fluoroquinolona ciprofloxacina (15/26, 57,6%) y aminoglucósidos, como gentamicina (14/26, 53,8%) y amikacina (9/26, 34,6%). También se observó resistencia a meropenem e imipenem (3/

26, 11,5%). La tipificación molecular por rep-PCR mostró dos clones A y B de 15 y 3 aislamientos, respectivamente y 8 aislamientos no relacionados. El clon A con 15 aislamientos incluía dos subclones idénticos de 8 y 2 aislamientos, y 5 aislamientos estrechamente relacionados. El clon B incluyó 3 aislamientos estrechamente relacionados con similitud mayor del 90%

**Conclusiones.** La relación de los fenotipos de resistencia expresados por estos aislamientos, posiblemente, indique la existencia de plásmidos de resistencia causantes de la infección hospitalaria en este hospital y responsables de codificar la resistencia a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro. Asimismo, el análisis molecular por rep-PCR mostró la diseminación de dos clones de *P. aeruginosa* en el hospital, de los cuales el clon A presentó aislamientos idénticos diseminados en diferentes servicios de la institución, lo que sugiere una transmisión horizontal.

**Palabras clave.** *P. aeruginosa*, epidemiología,  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, resistencia, rep-PCR.

*Infectio* 2007; 11(1): 6-15

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba.

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Sinú, Montería, Colombia.

**Correspondencia:** Salim Máttar V., Ph. D., Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Montería (Córdoba), Colombia. Teléfono: (094) 756 0710; mattarsalim@hotmail.com.

**Fecha de recepción:** 13/03/2006; **fecha de aceptación:** 23/07/2006

**ABSTRACT**

*Pseudomonas aeruginosa* has emergence as nosocomial pathogen mean causing several illnesses and producer of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) unusual as PER-1, OXA and carbapenemases.

**Objetives:** Characterized isolates of broad-spectrum  $\beta$ -lactams resistant *P. aeruginosa* by research of genotype rep-PCR and spread in this hospital. **Methods:** 26 clinical isolates of broad-spectrum  $\beta$ -lactams resistant *P. aeruginosa* were obtained from Hospital San Jeronimo (HSJ), between January and August 2002. Broad-spectrum  $\beta$ -lactams resistant was established with system MicroScan® ESBL plus™ (Dade Inc). Assays by rep-PCR were utilized for molecular typing of microorganisms.

**Results:** Those isolates showed resistance to fluoroquinolone as ciprofloxacin (15/26, 57.6%) and aminoglicosides as gentamicin (14/26, 53.8%) and amikacin (9/26, 34.6%). Also showed resistance to meropenem and imipenem (3/26, 11.5%). Molecular typing by rep-PCR showed 2 clusters of 15 and 3 strains, and 8 strains unrelated. Cluster of 15 strains included two clons of 8 and 2 strains, and 5 strains related. Cluster of 3 strains showed isolates related.

**Conclusions:** Relation of resistance phenotypic expressed for this isolates indicating possibly the existence resistance plasmids causing of nosocomial infections in this hospital and responsible encoding broad-spectrum  $\beta$ -lactams resistant, moreover molecular assays by rep-PCR showed spread of 14 cluster of *P. aeruginosa* in HSJ, the clusters 1, 3 y 6 showed the biggest number of isolates, the remained clusters corresponded to single isolates that suggest an horizontal transmission.

**Keywords:** *P. aeruginosa*, epidemiology, broad-spectrum  $\beta$ -lactams, resistance, rep-PCR.

*Infectio* 2007; 11(1): 6-15

**INTRODUCCIÓN**

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa infecciones del aparato urinario y respiratorio, de los tejidos blandos, endocarditis y una variedad de infecciones sistémicas, particularmente en pacientes quemados, con cáncer, fibrosis quística o compromiso del sistema inmune. *Pseudomonas aeruginosa* ha emergido como uno de los más importantes patógenos hospitalarios causantes de infecciones graves (1). El tratamiento es a menudo complicado, debido a que este microorganismo puede adquirir genes de resistencia y hábilmente se adapta a nuevas condiciones ambientales (2,3).

El mecanismo de resistencia más frecuente a las oximino-cefalosporinas en *P. aeruginosa* es la ausencia de represión de las enzimas cromosómicas AmpC y a las bombas de salida (4). La resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidime y cefepime) también puede resultar de la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). *P. aeruginosa* ha sido la mayor fuente de BLEE inusuales, como PER-1 (5) y muchas  $\beta$ -lactamasas mutantes clase D de espectro extendido, que incluyen las enzimas OXA (6-8).

Por otro lado, la producción de BLEE tipos TEM y SHV en *P. aeruginosa* es rara (9); entre tanto, el incremento del uso de los carbapenems para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram negativas resistentes a otros agentes  $\beta$ -lactámicos ha causado la emergencia de la resistencia a estos antibióticos por producción de metalo- $\beta$ -lactamasas, que pueden ser codificadas en los cromosomas o mediadas por plásmidos (10-12).

Los aislamientos de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas se han detectado en Europa, Asia, Estados Unidos y Suramérica; esto sugiere que este mecanismo de resistencia puede convertirse en un problema global. En Colombia, se han obtenido aislamientos de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas (13). Los aislamientos multiresistentes de *P. aeruginosa* productores de BLEE y causantes de infección hospitalaria en el Hospital San Jerónimo son preocupantes, debido a que los fenotipos de resistencia expresados por estos gérmenes en muchos casos no son fáciles de tratar; además, no se conoce con certeza si existe una movilidad de clones de *P. aeruginosa* entre los diferentes servicios del Hospital San Jerónimo.

Los estudios anteriores realizados en el mismo hospital han mostrado tasas de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro en *P. aeruginosa* de 38% (14). El objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, para examinar su circulación hospitalaria en el principal hospital de Montería.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio, lugar de estudio y aislamientos bacterianos.** Se llevó a cabo un estudio descriptivo, en el cual se estudiaron veintiséis aislamientos no repetitivos de *P. aeruginosa* multirresistentes y recuperados de diferentes pacientes. Los microorganismos se obtuvieron en el Hospital San Jerónimo de Montería (Colombia), en el periodo de enero a agosto de 2002. Los aislamientos no pertenecían a un brote: se aislaron de casos consecutivos que se presentaron durante el periodo de estudio.

El Hospital San Jerónimo pertenece al segundo nivel de atención y cuenta con 204 camas. Los servicios de donde se obtuvieron los aislamientos fueron la unidad de cuidado intensivo (UCI), medicina interna, pediatría y cirugía. Las muestras en las que se aislaron los microorganismos fueron de orina, sonda vesical, sangre, catéter y secreción bronquial. La identificación de las especies se confirmó mediante el uso de los sistemas API 20 NE (Biomérieux, S.A., Marcy l'Etoile, France).

**Pruebas de susceptibilidad.** Para las pruebas de susceptibilidad se emplearon el método de difusión en disco (15) y el de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de MicroScan® Neg Combo Panel Type 32 (Dade Behring, CA, USA) (16). Para la determinación de las CIM expresadas por los aislamientos resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y carbapenems, se emplearon los métodos Etest® MBL (Biodisk, Solna, Sweden) y MicroScan® ESBL plus® (Dade Behring, CA, USA) (16).

**Difusión en disco.** La susceptibilidad antibiótica de los aislamientos se determinó primero por el método de difusión en disco (15) en agar *Isosensitest*® (Oxoid, Basingstoke, UK), con sensibilizadores de ceftazidime de 30  $\mu$ g; ceftazidime/clavulonato, 30/10  $\mu$ g; aztreonam, 30  $\mu$ g; cefepime 30  $\mu$ g; imipenem,

10  $\mu$ g; gentamicina, 10  $\mu$ g; amikacina, 30  $\mu$ g, y ciprofloxacina, 5 $\mu$ g (Oxoid, Basingstoke, UK). Aunque aún no está estandarizada la difusión en disco para gérmenes no fermentadores, la aproximación inicial de producción de BLEE en *P. aeruginosa* se hizo con la prueba de difusión en disco de ceftazidima y ceftazidima/clavulonato (14,17).

**Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM<sub>90</sub>).** Se usaron los sistemas MicroScan® Neg Combo Panel Type 32, MicroScan® ESBL plus® (Dade Behring, CA, USA) y Etest® MBL (Biodisk, Solna, Sweden), aprobados por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (16). Se compararon los siguientes antibióticos para evaluar la actividad de enzimas u otros mecanismos de resistencia: ceftazidima, aztreonam, cefepima, imipenem, meropenem, gentamicina, amikacina y ciprofloxacina. La potencia de estos antibióticos se calculó por medio de CIM<sub>90</sub> mayores de 90% de sensibilidad. Los puntos de corte de sensibilidad para los antibióticos probados fueron ceftazidima, cefepima y aztreonam = 8  $\mu$ g/ml, imipenem, meropenem = 4 $\mu$ g/ml, gentamicina = 4  $\mu$ g/ml, amikacina = 16  $\mu$ g/ml y ciprofloxacina = 1  $\mu$ g/ml.

**MicroScan®.** La resistencia a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro se estableció como recomienda el CLSI (15), con el sistema MicroScan® Neg Combo Panel Type 32 y MicroScan® ESBL plus™ (Dade Behring, CA, USA), que contenían concentraciones dobles seriadas de ceftazidime [0,5-128  $\mu$ g/ml], ceftazidime/ clavulonato (0,12/ 4-16/ 4  $\mu$ g/ml), aztreonam (0,5-64  $\mu$ g/ml), cefepime (1-32  $\mu$ g/ml), imipenem (0,5-16  $\mu$ g/ml), meropenem (0,5-16  $\mu$ g/ml), gentamicina (1-8  $\mu$ g/ml), amikacina (4-32  $\mu$ g/ml) y ciprofloxacina (1-2  $\mu$ g/ml); los resultados se interpretaron luego de un periodo de incubación de 20 horas a 37 °C de acuerdo con las guías del CLSI (16). La disminución de la CIM de ceftazidima cuando se asocia a clavulonato sugiere la presencia de BLEE en *P. aeruginosa* (18).

**Etest®.** La CIM de imipenem en los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes se determinó mediante la tira Etest® MBL (Biodisk, Solna, Sweden), imipenem (4-256  $\mu$ g/ml] e imipenem/EDTA (1-64  $\mu$ g/ml]; los resultados se interpretaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

**Tipificación molecular por rep-PCR.** Todos los aislamientos se cultivaron en caldo LB (10 g/L tripton, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L NaCl) a 37 °C, a 250 rpm, toda la noche. El ADN total fue extraído de cada aislamiento de *P. aeruginosa*, con un kit comercial de reactivos (Bacterial BarCodes Inc, Houston, Tx). El ADN genómico se purificó con Wizard® genomic DNA Purification Kit (Promega, Wi, USA). La pureza y concentración del ADN se estimaron en un espectrofotómetro de luz ultravioleta Beckman DU 530 Uv/V, operando a una longitud de onda en que la diferencia en los valores de extinción de la hidrólisis de la molécula fue máxima.

Para la rep-PCR, se usó el repPRO-PCR™ DNA Fingerprinting (Bacterial BarCodes Inc, Houston, Tx), para comparar los genotipos de los aislamientos, usando el oligonucleótido Uprime-B1 (Bacterial BarCodes Inc, Houston, Tx). Para la amplificación se dispuso de una mezcla que contenía 1  $\mu$ l (100 ng) de ADN de *P. aeruginosa*, 0,36  $\mu$ g del oligonucleótido Uprime-B1, 0,2 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), 2,5% de dimetilsulfóxido, nucleótidos en una concentración de 10 mM (cada uno) y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Promega, Wi, USA) en volúmenes de 25  $\mu$ l de reacción.

La reacción se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), bajo las siguientes condiciones: 2 segundos a 95 °C como desnaturalización inicial, seguidos por 31 ciclos realizados por 3 segundos a 94 °C, 30 segundos a 92 °C como el paso de desnaturalización combinada, 1 minuto a 50 °C como alineamiento y 8 minutos a 65 °C como paso de elongación; un paso de elongación final fue incluido a 65 °C por 8 minutos.

**Análisis de la huella genómica por electroforesis.** Los fragmentos de ADN se separaron a 120 v por 6 horas. El ADN del bacteriófago lambda de 1 kb se usó como marcador de peso molecular (Promega, Wi, USA). El ADN se separó por electroforesis en gel de agarosa 1% (w/vol) usando tampón tris-acetato EDTA 1X (40 mM tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0  $\pm$  0,2). El gel se coloreó con bromuro de etidio (3  $\mu$ g) y se fotografió bajo luz ultravioleta (19). Los patrones de *P. aeruginosa* producidos por electroforesis generaron una matriz de presencia o ausencia de bandas representadas por 0 y 1 (0: ausencia y 1: presencia) y se analizó mediante el uso del software NTSYS pc. Versión 2.0. Se generó un dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA.

**Interpretación de la rep-PCR.** La interpretación de los patrones de rep-PCR se realizaron según lo sugerido por Malathum *et al.* (20). Los aislamientos se consideraron idénticos si mostraban patrones de bandeo iguales. Básicamente, los aislamientos que mostraron diferencias de una banda se clasificaron como relacionados en un mismo grupo de clones. Los aislamientos que mostraron diferencias de dos o más bandas se categorizaron como grupos de clones diferentes.

## RESULTADOS

**Patrones de susceptibilidad de los aislamientos clínicos.** Los aislamientos analizados mostraron diferentes niveles de resistencia a ceftazidime, aztreonam y carbapenems (tabla 1). Todos los aislamientos de *P. aeruginosa* mostraron resistencia a agentes no  $\beta$ -lactámicos, incluso fluoroquinolonas como ciprofloxacina (15/26, 57,6%) y aminoglucósidos, como gentamicina (14/26, 53,8%) y amikacina (9/26, 34,6%). La resistencia mostrada por estos aislamientos a los carbapenems (meropenem e imipenem) se observó en 3/26, 11,5% (tabla 1).

No todos los aislamientos mostraron resistencia conjunta a ceftazidima (CIM: rango 4 a = 128  $\mu$ g/ml) y aztreonam (CMI rango 4 a > 64  $\mu$ g/ml). Por lo tanto, el análisis de las CIM mostró aislamientos que expresan sensibilidad a ceftazidima y resistencia a aztreonam o sensibilidad a aztreonam y resistencia a ceftazidima (tabla 1).

**Análisis molecular por rep-PCR.** Se generaron fragmentos con un peso molecular de 298 a 4.072 pb. Los aislamientos que mostraron patrones con diferencias de dos o más bandas se consideraron diferentes; se identificaron dos clones representativos cuando se hizo el análisis con un coeficiente de similitud del 90% entre los 26 aislamientos (tabla 1; figura 1). La similitud de muchos de los patrones rep-PCR indica un alto grado de relación entre las aislamientos. Muchos aislamientos con patrones similares de bandeo rep-PCR se agruparon en un mismo grupo de clones (figura 1). De esta forma, se identificaron dos clones A y B de 15 y 3 aislamientos, respectivamente y 8 aislamientos no relacionados. El clon A con 15 aislamientos incluía dos subclones idénticos A1 de 8 y A2 de 2 aislamientos,

**Tabla 1**

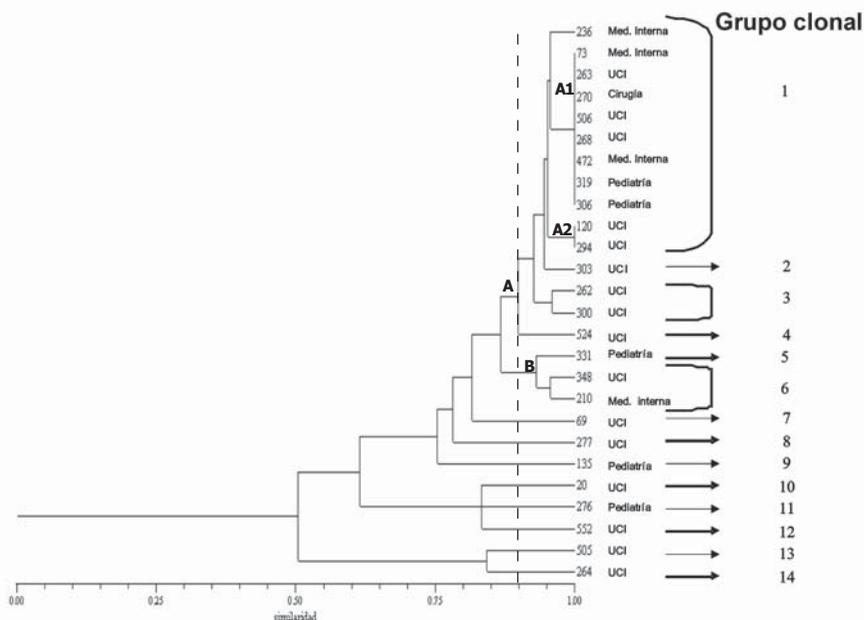
**Aspectos clínicos de las aislamientos de *P. aeruginosa* productoras de BLEE**

AISLA MIENTOS	FUENTE	PABELLÓN	DATO DE AISLAMIENTO	PATRÓN REP-PCR	CIM (µg/mL)								
					CAZ	*CAZ/CLA	AZT	FEP	IMP	MER	CN	AK	CP
<b><i>P. aeruginosa</i></b>													
20	Sangre	UCI	10-01-02	10	>128	1	>64	>32	<0,5	<0,5	8	32	>2
69	Secreción de herida	UCI	20-02-02	7	16	1	32	16	<0,5	<0,5	>8	32	>2
73	Catéter	Medicina interna	21-02-02	1B	>128	2	>64	32	<0,5	<0,5	>8	>32	<1
120	Orina	UCI	03-04-02	1C	>128	0,5	8	16	<0,5	<0,5	>8	8	>2
135	Sangre	Pediatría	13-04-02	9	32	2	>64	>32	<0,5	<0,5	<1	16	>2
210	Orina	Medicina interna	17-05-02	6B	>128	1	4	8	<0,5	<0,5	2	4	<1
236	Sonda vesical	Medicina interna	24-06-02	1A	16	1	>64	4	<0,5	<0,5	8	8	<1
262	Secreción bronquial	UCI	29-06-02	3A	>128	2	4	>32	<0,5	<0,5	4	2	>2
263	Orina	UCI	29-06-02	1B	128	0,5	8	>32	<0,5	<0,5	<1	4	>2
264	Secreción bronquial	UCI	30-06-02	14	128	1	8	>32	<0,5	<0,5	<1	4	>2
268	Orina	UCI	30-06-02	1B	8	<0,12	>64	4	<0,5	<0,5	8	2	<1
270	Secreción bronquial	Cirugía	30-06-02	1B	>128	2	>64	>32	128	>16	>8	>32	>2
276	Secreción de herida	Pediatría	31-06-02	11	>128	4	>64	32	<0,5	<0,5	4	16	>2
277	Secreción bronquial	UCI	31-06-02	8	16	0,25	>64	4	<0,5	<0,5	8	2	<1
294	Sonda vesical	UCI	02-07-02	1C	8	<0,12	>64	8	<0,5	<0,5	>8	>32	>2
300	Catéter	UCI	03-07-02	3B	>128	4	32	32	<0,5	<0,5	8	32	<1
303	Catéter	UCI	04-07-02	2	64	1	>64	>32	<0,5	<0,5	>8	8	<1
306	Sangre	UCI	04-07-02	1B	16	0,5	>64	>32	<0,5	<0,5	4	8	>2
319	Secreción de herida	Pediatría	07-07-02	1B	32	1	>64	>32	<0,5	<0,5	2	16	>2
331	Secreción de herida	Pediatría	11-07-02	5	16	0,12	>64	8	<0,5	<0,5	<1	16	>2
348	Secreción bronquial	Pediatría	12-07-02	6A	4	<0,12	>64	2	<0,5	<0,5	>8	2	<1
472	Absceso	Medicina interna	11-08-02	1B	>128	4	>64	32	<0,5	<0,5	<1	>32	<1
505	Sangre	UCI	20-08-02	13	>128	2	>64	>32	16	16	>8	>32	>2
506	Orina	UCI	20-08-02	1B	64	2	64	16	<0,5	<0,5	<1	8	<1
524	Secreción bronquial	UCI	24-08-02	4	>128	2	>64	>32	32	>16	>8	>32	>2
552	Absceso	UCI	30-08-02	12	128	4	32	>32	<0,5	<0,5	2	4	<1

CAZ: ceftazidime; CN: gentamicina;  
 AZT: aztreonam; AK: amikacina;  
 FEP: cefepime; CP: ciprofloxacina;  
 IMP: imipenem; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol  
 MER: meropenem;

\*CAZ/CLA: sinergismo de ceftazidime en combinación con clavulonato 4 µg/ml.

**Figura 1**

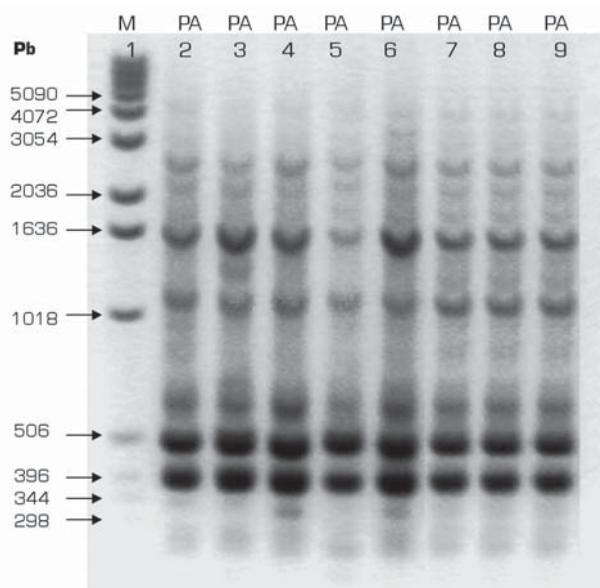


Dendrograma basado en el algoritmo UPGMA. *P. aeruginosa* productora de BLEE (n = 26), fueron genotipificados por rep-PCR. El agrupamiento de los perfiles de rep-PCR mostraron diferentes grupos electroforéticos con similitud > 95%. La línea punteada vertical indica el nivel de similitud 95%.

recuperados de diferentes servicios y 5 aislamientos estrechamente relacionadas. El clon B incluyó 3 aislamientos estrechamente relacionados con similitud mayor del 90%.

Los subclon A1 con 8 aislamientos idénticos (73, 263, 268, 270, 306, 319, 472, 506), se muestra en las Figuras 1 y 2; 3 (37,5%) de estos aislamientos se obtuvieron de pacientes de UCI. De igual forma, los aislamientos del subclon A2 (120 y 294). El clon B incluyó 3 aislamientos estrechamente relacionados con similitud mayor del 90% de los recuperados en los servicios de medicina interna, pediatría y UCI.

**Figura 2**



Perfiles de rep-PCR de *P. aeruginosa* productoras de BLEE (Clon A1). Línea 1, ladder lambda; línea 2, cepa 270; línea 3, cepa 73; línea 4, cepa 263; línea 5, cepa 60; línea 6, cepa 268; línea 7, cepa 472; línea 8, cepa 319; línea 9, cepa 306.

Los otros aislamientos mostraron perfiles electroforéticos diferentes, y se clasificaron como independientes, no relacionados con los otros clones.

## DISCUSIÓN

En este estudio, 26 aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, mostraron niveles de resistencia a ceftazidima  $CIM_{I_{90}}$  4 a >128  $\mu$ g/ml y aztreonam  $CMI_{90}$  de 4 a > 64  $\mu$ g/ml (26,9%). Esto podría sugerir la expresión de enzimas BLEE de los tipos OXA, PER y SHV, diseminadas ampliamente en los pabellones hospitalarios de Latinoamérica (5,7,21).

Por otro lado, la presunta existencia de estas enzimas en los aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados de la UCI, medicina interna, pediatría y cirugía del Hospital San Jerónimo, podría explicarse

por la alta presión selectiva que se ejerce con la excesiva utilización de antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, como ceftazidima e imipenem, y la combinación con otros agentes antibióticos empleados para el control de las infecciones causadas por estos organismos hospitalarios en los pabellones de este hospital; estos gérmenes son responsables del número de admisiones de los pacientes a la UCI (14,22).

Los hallazgos de los perfiles fenotípicos de resistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa* son similares a los de reportes previos (14). La resistencia a clases de antibióticos no relacionadas podría indicar la presencia simultánea de determinantes de resistencia adicionales, como enzimas modificantes de aminoglucósidos, mutaciones que regulen el sistema de salida o ambos mecanismos, que son comunes entre los aislamientos hospitalarios de *P. aeruginosa* (22-24).

Las variaciones en los niveles de resistencia presentada a los  $\beta$ -lactámicos en aislamientos genéticamente relacionados caracterizados en este estudio, podrían deberse a la expresión en estos aislamientos de diferentes tipos de BLEE o la codificación de dos o más BLEE en un mismo aislamiento. No obstante, esas variaciones también podrían depender de la cantidad de enzimas BLEE o a la posible adquisición de otros mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tales como la alteración en la permeabilidad mediada por porinas o la adquisición de bombas de expulsión (24,25).

No todos los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro son categorizados como resistentes a ceftazidima o aztreonam cuando se usan los puntos de corte de resistencia del CLSI (16),  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, debido a la disminución de la CIM de estos  $\beta$ -lactámicos en más de 3 diluciones cuando se acompañó de ácido clavulánico (tabla 1), indicamos la posible existencia en estos aislamientos de enzimas BLEE que expresan bajos niveles de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, debido a que el sinergismo mostrado del ácido clavulánico en combinación con ceftazidima sólo se potencia cuando el mecanismo de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam es producido por BLEE y no por otros mecanismos de resistencia, tales como alteración o disminución de las porinas de membrana o por bombas de salida (*pump efflux*) (18). No obstante, la diferencia en el coeficiente de permeabi-

lidad de cada  $\beta$ -lactámico puede jugar un rol importante en la resistencia de estos patógenos Gram negativos (26).

Existen métodos estándar para la detección de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli*. Sin embargo, para el resto de *Enterobacteriaceae* y no fermentadores, no existe estandarización de los métodos para la detección de las BLEE, por lo que es difícil detectar y reportar BLEE en esos microorganismos (15,18,27). Además, el uso incorrecto de estrategias de control de los antibióticos para confrontar el inminente tratamiento de las infecciones causadas por los aislamientos de no fermentadores resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y la falta de medidas de control de las infecciones que buscan limitar la diseminación de múltiples aislamientos (policlonales) de estos organismos resistentes, son el principal problema clínico y epidemiológico para contener los altos índices de BLEE en los bacilos Gram negativos no fermentadores.

Los aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes con infección hospitalaria, frecuentemente son resistentes a múltiples antibióticos, incluso cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (28). El imipenem es el agente más efectivo usado contra estos organismos. Sin embargo, el incremento del uso de éste y otros antibióticos (ciprofloxacina y amikacina), particularmente en instituciones que tienen un incremento en la incidencia de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE o hiperproductoras de enzimas AmpC, ha conllevado a la rápida y progresiva aparición de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems (14,22). Es importante el hallazgo en este estudio de 3 aislamientos, el 270, el 505 y el 524, que expresaron resistencia a carbapenems (tabla 1), porque evidencia la emergencia de resistencia a estos potentes antibióticos, presumiblemente, por expresión de enzimas metalo- $\beta$ -lactamasas en este hospital (22).

Entre tanto, el análisis de la terapia antibiótica recibida por los pacientes antes del aislamiento de las *P. aeruginosa* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, reveló que 6 pacientes recibieron terapia con imipenem, 13 recibieron terapia con cefalosporinas de amplio espectro y 7 recibieron terapia combinada de ciprofloxacina y gentamicina.

La fuerte presión selectiva ocasionada por el abuso de agentes  $\beta$ -lactámicos en este hospital, permite sugerir que *P. aeruginosa* resistente a  $\beta$ -lactá-

micos de amplio espectro puedan diseminarse y causar infecciones hospitalarias en quienes no reciben terapia de primera línea con  $\beta$ -lactámicos (12). Es importante mencionar que 2 de los 3 aislamientos resistentes al imipenem no fueron aislados durante terapia con imipenem (datos no mostrados), lo cual indica que no siempre se requiere el uso de carbapenems para seleccionar aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a estos antibióticos, cuando estos patógenos ya se encuentran circulando en el ambiente hospitalario.

Se han postulado diferentes mecanismos en los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a cefalosporinas y carbapenems, presencia de varios tipos de  $\beta$ -lactamasas y la pérdida de porinas de membranas (23). La aparición de resistencia a carbapenems, probablemente, ha sido causada por el excesivo uso de estos antibióticos en este hospital y la adquisición de diferentes mecanismos de resistencia por clones preexistentes. La CIM de las cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam para estos aislamientos de *P. aeruginosa* fueron ceftazidima  $>128 \mu\text{g/ml}$ , cefepime  $> 32 \mu\text{g/ml}$  y aztreonam  $> 64 \mu\text{g/ml}$  (tabla 1). La alta CIM expresada para aztreonam por estos aislamientos presumiblemente productores de MBL, también podría indicar la existencia conjunta de BLEE, debido a que estos aislamientos son sensibles a aztreonam y sólo se muestran resistentes cuando la producción de una BLEE se expresa conjuntamente (22).

Además, el común denominador entre muchos pacientes (19 de 26) consistió en haber sido admitidos una o más veces en la UCI antes del aislamiento de *P. aeruginosa* resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro. Esto sugiere que 3 de 19 pacientes de los que se obtuvieron las *P. aeruginosa*, que se encontraban en el servicio de medicina interna, probablemente fueron colonizados durante su estancia en la UCI. El análisis molecular de estos aislamientos mostró relación clonal en 10 de 19 aislamientos de pacientes que presentaron una o más admisiones a dicha unidad. La UCI es una habitación en donde los pacientes infectados no están aislados de los otros pacientes en estado crítico no infectados; esta puede ser la causa de difusión de muchos clones resistentes a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro entre los pacientes de ese servicio.

El análisis epidemiológico y molecular de las aislamientos de *P. aeruginosa* indica que se encuen-

tra ampliamente diseminada en diferentes servicios hospitalarios del Hospital San Jerónimo. La diseminación de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro en *P. aeruginosa* no ha sido favorecida por un aislamiento común, aunque muchos brotes hospitalarios han sido provocados por un mismo aislamiento de clones (10,12).

La tipificación molecular de los aislamientos de *P. aeruginosa* por rep-PCR demostró que 11 aislamientos (42,3% del total de aislamientos) mostraron estar estrechamente relacionados (clones A y B) y revelaron patrones de rep-PCR representativos (subclones A1 y A2); el subclón A1 fue mostrado idénticamente por 8 aislamientos obtenidos de la UCI, medicina interna, pediatría y cirugía, lo cual permite sugerir la existencia de diseminación de clones de este electroferotipo en el Hospital San Jerónimo. El subclon A2 con 2 aislamientos de idéntico patrón obtenidos de la UCI se encuentra estrechamente relacionado, en 95%, con los aislamientos del subclon A1, lo que permitiría presumir que un aislamiento común haya adquirido un determinante de resistencia que permitiera la supervivencia del aislamiento, su diseminación por los diferentes servicios del Hospital San Jerónimo y posterior diferenciación por mutaciones puntuales ejercidas probablemente por la agresiva combinación de agentes antibióticos usados para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en el Hospital San Jerónimo.

Sin embargo, de los 8 aislamientos que presentaron relación clonal en el subclon A1, sólo dos aislamientos mostraron idénticos fenotipos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos; estos aislamientos fueron *P. aeruginosa* 73 y 472 (tabla 1; figura1). El resto de aislamientos presentaron diferentes fenotipos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. No obstante, los aislamientos 306 y 319 mostraron fenotipos de resistencia similares a los de todos los antibióticos. Los aislamientos del electroferotipo 1C también presentaron diferencias en sus fenotipos de resistencia. Entre tanto, aislamientos con electroferotipos diferentes expresaron fenotipos de resistencia similares; posiblemente, esto indique que la diseminación de plásmidos de resistencia en estos aislamientos podría ser la responsable de la expresión de los diferentes fenotipos de resistencia (29,30).

Estos hallazgos son similares a los obtenidos por Arlet *et al.* (30), en hospitales franceses, en don-

de encontraron que algunos aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE tipo SHV-4 con idénticos perfiles de plásmidos y genomas, expresaron diferentes perfiles de resistencia. Aunque en este estudio no se realizó el análisis plasmídico, podría sugerirse la existencia de plásmidos en estos aislamientos, genéticamente diferentes pero que expresan similares fenotipos de resistencia.

De otra parte, el análisis de la identidad genética de los aislamientos por tipificación del ADN, determinó que 5 de 16 (31,2%) de los aislamientos obtenidos de la UCI están estrechamente relacionados con un mismo origen clonal en el clon A (figura 1). Los 5 aislamientos de la UCI muy relacionados, correspondientes a este clon, mostraron 2 patrones de rep-PCR (subclones A1 y A2) (tabla 1; figura 1). No obstante, 3 de 4 (75%) de los aislamientos obtenidos en el servicio de medicina interna estuvieron estrechamente relacionados con un origen clonal común. Estos aislamientos se agruparon en el subclon A1 y se relacionaron en un 95%, lo cual sugiere la evolución a partir de un clon preexistente en el Hospital San Jerónimo. Solamente un aislamiento de medicina interna, que representó el 25% (aislamiento 210), no se relacionó clonalmente con los otros (figura 1).

En conclusión, los aislamientos multirresistentes de *P. aeruginosa* a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y causantes de infección hospitalaria en este hospital son preocupantes. La relación de los fenotipos de resistencia expresados por estos aislamientos posiblemente indique la existencia de plásmidos de resistencia causantes de la infección hospitalaria y responsables de codificar las BLEE. Asimismo, la relación genética entre los aislamientos y la distinción entre los grupos por rep-PCR mostraron la diseminación de 2 grupos clonales de *P. aeruginosa*, de los cuales los subclones A1 A21, fueron los que presentaron mayor número de aislamientos. Los restantes correspondieron a aislamientos individuales, lo que sugiere que la transmisión horizontal pudo ser la responsable y las medidas de control de las infecciones fueron mínimas. La emergencia de aislamientos policlonales de *P. aeruginosa* resistentes a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro puede deberse a la presión selectiva de los antibióticos, como factor importante, y a la insuficiencia de las medidas de control de las infecciones.

## REFERENCIAS

- Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:229-33.
- De Freitas A, Barth A. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. *Braz J Infect Dis.* 2002;6:1-7.
- Howard DH, Scott II R, Packard R, Jones D. The global impact of drug resistance. *Clin Infect Dis.* 2003;36:S4-10.
- Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol.* 1995; 43:300-9.
- Nordman P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38:104-14.
- Danel F, May L, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2)  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1881-4.
- Danel F, Hall L, Gur D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:3117-22.
- Hall L, Livermore D, Gur D, Akova M, Akalin H. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2)  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1637-44.
- Mugnier P, Dubroust P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2488-93.
- Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou M, Babini G, Douboyas J, Livermore D. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1290-2.
- Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinical isolated strain of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:824-9.
- Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini G, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- $\beta$ -lactamase. *Clin Infect Dis.* 2000;31:1119-25.
- Crespo M, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann M, Turton J, Glover J, Velez J, Castañeda C, Recalde M, Livermore D. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5094-101.
- Martínez P, Mercado M, Máttar S. Determinación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb Med.* 2003;34:130-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Informational 8<sup>th</sup> ed. Supplement M100-S15 document M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Informational. 6<sup>th</sup> ed. Approved standard M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.
- De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, Nordmann P. Prospective survey of  $\beta$ -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3031-4.
- Weldhagen G, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2385-92.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.: 1989.
- Malathum K, Singh K, Weinstock G, Murray B. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of

- Enterococcus faecalis* at the subspecies level. J Clin Microbiol. 1998;36:211-5.
21. Danel F, Hall L, Gur D, Alkalin H, Livermore D. Transferable production of PER-1  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 1995;39:281-94.
  22. Martínez P, Mercado M, Máttar S. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productores de metalo- $\beta$ -lactamasas en el principal hospital de Córdoba. Infectio. 2005;9:6-15.
  23. Hsueh P, Teng L, Yang P, Chen Y, Ho S, Luh K. Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. J Clin Microbiol. 1998;36:1347-51.
  24. Livermore D. Of *Pseudomonas*, porins, pumas and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2001;47:247-50.
  25. Quinn J, Ddek E, DiVicenzo C, Lucks D, Lerner S. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Infect Dis. 1986;154:289-94.
  26. Matsumura N, Minami S, Watanabe Y, Iyobe S, Mitsuhashi S. Role of permeability in the activities of  $\beta$ -lactams against gram negative bacteria which produce a group 3  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2084-6.
  27. Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14:933-51.
  28. Hsueh P, Chen H, Sun C, Chen W, Pan H, Yang L, Chang S, Ho S, Lee C, Hsieh W, Luh K. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. Emerg Infect Dis. 2002;8:63-8.
  29. Martínez P, Espinal P, Bustos A, Máttar S. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. MedUNAB. 2005;8:15-22.
  30. Arlet G, Rov Veau M, Casin I, Bouret P, Lagrange P, Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4  $\beta$ -lactamases and which were isolated in 14 French hospital. J Clin Microbiol. 1994;32:2553-8.

# infectio

Publicación trimestral.  
Órgano oficial de la Asociación Colombiana de Infectología, **ACIN**



Valor suscripción anual **\$50.000.00**