



“ENZIMAS IMP Y VIM EN PANAMÁ, EVIDENCIA DE METALO-β-LACTAMASAS EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA”

J. Moreno¹, J. Morán¹, M. Fernández¹, R. Ramos¹ y R. Bolaños¹

¹ Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (LCRSP)-Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES)

Resumen

Introducción: Las resistencias bacterianas son un problema de salud pública a nivel mundial; en P. aeruginosa las metalo-β-lactamasas son los mecanismos mejor asociados a multiresistencia en no fermentadores, en Panamá no se conocen cuales variantes genéticas son las circulantes ni qué tipo de resistencias asociadas presentan.

Metodología: Se procesaron 15 cepas de P. aeruginosa multiresistentes, se procesaron utilizando metodologías como kirby-bauer, método epsilométrico, equipo vitek 2 compact, sinergias cualitativas y per múltiplex de punto final. Todas las metodologías de antimicrobianos fueron hechas en base a la norma CLSI M100-S22, y el análisis de datos fue realizado con el software Whonet 5.6 de OPS-OMS, según cada tipo de gen de MBL.

Resultados y conclusiones: Se encontraron 11 cepas con gen IMP, 8 con gen VIM y dentro de las mismas 4 con genes coexistentes VIM-IMP. 14 cepas fueron sensibles a colistín y 1 intermedia, 2 fueron sensibles a gentamicina. Las cepas con genes VIM fueron más sensibles a que las que poseían IMP, todas las cepas fueron resistentes a β-lactámicos, quinolonas y monobactams. Se excluyó la presencia de enzimas de la clase KPC.

Introducción y Objetivos

Las enfermedades infecciosas, son un problema de salud pública a nivel mundial. De las cuales, aquellas causadas por bacterias son un serio problema dentro y fuera de los centros de atención a la salud, pues aumentan la morbimortalidad, estadías en camas/paciente e inflan los costos globales del tratamiento. La emergencia de nuevos mecanismos enzimáticos como las MBL son un reto para los microbiólogos hoy en día. Las β-lactamasas son enzimas hidrolasas (EC 3.5.2.6) muy versátiles en su acción, se conocen dos grupos principales, las denominadas serinas y aquellas de núcleo metálico activo (metaló-β-lactamasas-MBL-). Las MBL son una superfamilia con representantes como la verona integron encoded metalo-β-lactamase (VIM), e imipenem active metalo-β-lactamase (IMP) que a su vez se asocian a resistencias en no fermentadores como la bacteria P. aeruginosa. las MBL tienen como característica principal un átomo de zinc en su sitio catalítico, que a su vez las hace ser inactivadas por quelantes de iones divalentes como el ácido dietilenaminotetrasódico (EDTA) y no por el tradicional ácido clavulánico u otros inhibidores de β-lactamasas(8) Tales enzimas son capaces de hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenems pero tiene la cualidad especial a ser sensibles a los monobactams. En Panamá la multiresistencia en P. aeruginosa a los β-lactámicos es históricamente conocida, sin embargo el definir cuál mecanismo era el responsable de la misma fue complicado, hasta que se descubrió que las causantes son MBL.

Los objetivos de este estudio son describir que tipo de MBL circulan en nuestro país y que tipo de resistencias asociadas poseen, además indicar cuales son los antimicrobianos más activos frente a ellas.

FOTO N1: EFECTOS SINÉRGICOS EN TRIANGULO, INDICATIVO DE PRESENCIA DE ENZIMAS TIPO MBL.



FOTO N2: METODO EPSILOMÉTRICO PARA DETECTAR ENZIMAS MBL, MÁS DE DOS DILUCIONES ES INDICATIVO DE POSITIVIDAD.

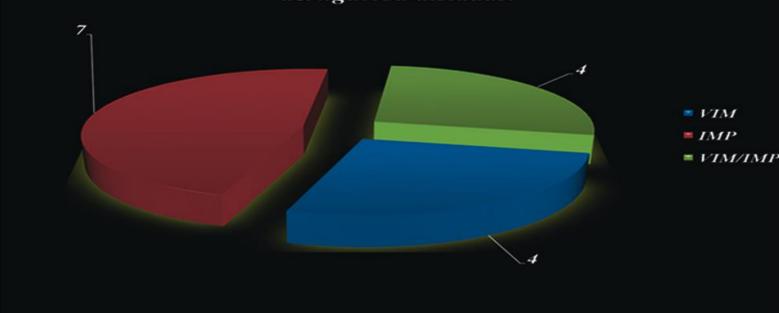


Métodos y Materiales

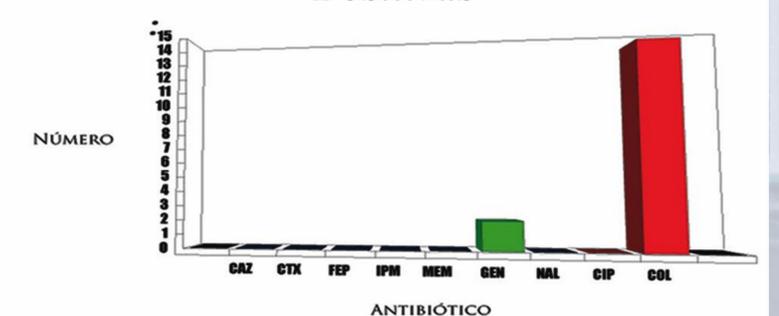
En este estudio se procesaron 15 cepas de P. aeruginosa multiresistentes, en la sección de microbiología clínica del LCRSP del ICGES, se utilizaron metodologías automatizadas, manuales y moleculares como el equipo Vitek 2 Compact Biomerieux, Francia tarjetas GN y AST N082, difusión por disco mediante la técnica de kirby-bauer, se realizó un ajuste al integrar a los discos de Cefotaxima (CAZ), meropenem (MEM) e imipenem (IMP) 10 uL de EDTA-Na ajustada a 750 ug/disco, seguido de colocaciones estratégicas para buscar sinergias cualitativas entre antibióticos e inhibidores, las mismas fueron incubadas de 20-24 horas a 35°C. Aquellas cepas que presentaron CIM a CAZ≥32 ug/mL e IPM/MEM≥16, en el equipo Vitek 2 y que tuviera un aumento del diámetro de los discos con EDTA o alguna sinergia con los discos testigos sin inhibidor, fue considerada positiva por MBL. Se utilizaron las metodologías estándares de la CLSI M100-S22, utilizando como cepas control la P. aeruginosa ATCC 27853 y la E. coli ATCC 25922. Se utilizó simultáneamente el método epsilométrico por E-test®, considerándose positiva cada cepa con más de 2 diluciones en la tira, según las especificaciones del fabricante.

Se obtuvo ADN a partir de un método de lisado bacteriano por calor descrito por el CDC anteriormente. Seguido se realizó una PCR múltiplex para los genes de MBL tipo blaVIM, blaIMP, blaSPM respectivamente, y luego se descartaron por KPC mediante blaKPC-2 por metodología de PCR punto final, fueron reveladas mediante geles de agarosa al 1% y un transiluminador UV.

Gráfica N1: Distribución de enzimas MBL en las cepas de P. aeruginosa aisladas.



GRÁFICA N2: Sensibilidades de cepas MBL Positivas



Resultados

- Todas las cepas fueron resistentes a penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems y quinolonas.
- En todas las cepas ensayadas se observó la sinergia cualitativa triangular entre carbapenems y EDTA.
- La mayoría de los aminoglicósidos tuvieron sensibilidades intermedias, con un MIC 90 bastante alto de 8.0 ug/mL.
- No se observó sensibilidad alguna a monobactams.
- El alto nivel de resistencia a quinolonas puede indicar mecanismos membranales.
- Solo se detectó sensibilidad a Colistín (14/15).
- A pesar de la sensibilidad al colistín, el MIC 90 demuestra una aumento de lo esperado (0.5 ug/mL vs 4.0 ug/mL).
- El gen más predominante fue IMP (11/15), seguido de VIM (8/15), se detectó la presencia de variantes de MBL coexistentes VIM/IMP (4/15).
- La coexistencia de variantes VIM/IMP favoreció la capacidad catalítica de una de las cepa frente a todos los sustratos ensayados, con extrema-resistencia (XDR).
- Las cepas con presencia de IMP, fueron por lo general más resistentes que aquellas que sólo poseían VIM.
- Dos cepas (2/4) VIM fueron sensibles a gentamicina (2ug/mL).
- No se detectaron genes de clase A, 2f (KPC).

Tabla N1: SENSIBILIDADES RELATIVAS DE LAS CEPAS DE P. AERUGINOSA MBL POSITIVAS

Nombre del antibiótico	Clase de antibiótico	CIM50	CIM90	R	I	S
Ceftazidima	Cephems	64	64	15	0	0
Cefotaxima	Cephems	64	64	15	0	0
Cefepima	Cephems	64	64	14	1	0
Imipenem	Penems	16	16	15	0	0
Meropenem	Penems	16	16	15	0	0
Gentamicina	Aminoglicósido	8	8	0	13	2
Acido nalidixico	Quinolonas	32	32	15	0	0
Ciprofloxacina	Quinolonas	4	4	15	0	0
Colistín	Lipopeptides	2	2	0	1	14

Conclusiones

- Mediante este estudio se evidencia la circulación en P. aeruginosa de las variantes de MBL VIM e IMP en Panamá.
- Las cepas con presencia del gen IMP poseen MICs a carbapenems más altos que aquellas con el gen VIM.
- Tanto el E-test como las sinergias cualitativas con EDTA, son buenos métodos para detectar la presencia de MBL en P.aeruginosa.
- El antibiótico más efectivo frente a las cepas MBL positivas tanto IMP como VIM es el colistín, seguido de la gentamicina, sin embargo ambos empiezan a demostrar MIC 90 altos, lo que sugiere que su efecto bacteriostático poblacional sobre estas bacterias esta disminuyendo.
- La inusual resistencia a monobactamas en estas cepas MBL, se puede explicar mediante la presencia de una beta-lactamasa de espectro extendido coexistente, con eficaz hidrólisis frente a este grupo de antibióticos.
- El alto nivel de resistencia a quinolonas es compatible a bombas de eflujo bacteriano, común en resistencias acompañantes de gérmenes XDR.
- Los altos niveles de resistencia en P.aeruginosa, no siempre se asocian a serinas muy activas como la KPC (en nuestro caso, ninguna fue positiva), lo que nos indica que es necesario mejorar la discriminación de resistencias importantes implementando métodos más precisos.
- La resistencia en P. aeruginosa es un problema creciente, depende de las estrategias de los laboratorios clínicos en detectarlas, y mejorar el tratamiento antibiótico por parte de los clínicos, ya que se está demostrando la circulación de cepas XDR.

FOTO N3: PCR MULTIPLEX DE TIEMPO FINAL PARA MBL, LAS BANDAS DE APROXIMADAMENTE 290 PB EQUIVALEN A VIM Y 400 PB DE IMP.

