

## Trabajo de revisión

### Resistencia a carbapenemes por metalo- $\beta$ -lactamasas

RECIBIDO: 5/7/07

ACEPTADO: 19/7/07

Radice, M. • Gutkind, G.

Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Universidad de Buenos Aires, mradice@ffyb.uba.ar

**RESUMEN:** La introducción de los carbapenemes, en los años 80, constituyó un gran avance en el tratamiento de las infecciones severas producidas por bacterias gram-negativas multiresistentes, sin embargo la resistencia a estos compuestos ha sido descripta en enterobacterias, *Acinetobacter* spp. y resulta frecuente en *Pseudomonas aeruginosa*. La emergencia de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) adquiridas en microorganismos patógenos ha sido descripta en diversas regiones del mundo y actualmente constituye un problema global emergente. Todas las MBLs, IMP, VIM, SPM-1, GIM-1 y SIM-1, independientemente de su diversidad, hidrolizan a prácticamente la totalidad de los  $\beta$ -lactámicos y son inhibidas por EDTA y otros agentes quelantes. La mayoría de los genes codificantes de MBLs se encuentran como genes en cassette en integrones de clase 1, aunque algunos se encuentran en integrones de clase 3. La rápida diseminación de las MBLs, su amplia diversidad y el número de especies bacterianas involucradas, ha complicado la estandarización de métodos de detección

y ha dificultado la comprensión de su implicancia clínica y epidemiológica.

**PALABRAS CLAVE:** metalo- $\beta$ -lactamasas, resistencia a carbapenemes, carbapenemasas

**SUMMARY:** *Carbapenem resistance due to metallo- $\beta$ -lactamases*

Therapeutic introduction of carbapenems in the 80s constituted a great advance in the treatment of serious infections, although carbapenem resistance is now observed in enterobacteria, *Acinetobacter* spp. and is becoming more common in *Pseudomonas aeruginosa* and other species. Emergence of acquired metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) in gram-negative pathogens has clinical and epidemiological implications and becomes a worrisome problem worldwide, being reported from either individual isolates or nosocomial outbreaks. All MBLs, IMP, VIM, SPM-1, GIM-1 and SIM-1, despite their diversity, hydrolyze virtually all  $\beta$ -lactams and are inhibited by EDTA. Most encoding genes are found as gene cassettes on class 1 integrons, although some are also found on class 3 integrons. The rapid spread of MBLs, their broad structural variety and the number of involved host

species has complicated standardization of detection methods, thus the lack of final epidemiological knowledge and clinical impact understanding.

**KEY WORDS:** metallo- $\beta$ -lactamasas, carbapenem resistance, carbapenemasas

### Introducción

La introducción de los carbapenemes, en los años 80, constituyó un gran avance en el tratamiento de las infecciones severas producidas por bacterias gram-negativas multiresistentes, debido a la buena estabilidad de estos agentes frente a la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas producidas por dichos microorganismos. Sin embargo, la emergencia de microorganismos patógenos resistentes a estos compuestos ha sido descrita en diversas regiones del mundo y actualmente constituye un problema global emergente.

Los bacilos gram-negativos han desarrollado distintas estrategias por las cuales son capaces de evadir la acción de los carbapenemes. Estos mecanismos incluyen: la disminución en la captación droga, mediada por alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa (ausencia o disminución en la expresión de las proteínas de membrana externa, OMPs) o la presencia de sistemas activos de extrusión del antibiótico (bombas de flujo), la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC y la adquisición de  $\beta$ -lactamasas con capacidad de hidrolizar carbapenemes. Las carbapenemasas adquiridas representan la mayor amenaza frente a la utilización clínica de los carbapenemes (1).

Las carbapenemasas representan un grupo heterogéneo de  $\beta$ -lactamasas pertenecientes a diferentes clases moleculares denominadas A, B y D (2). Las enzimas de clase A y D pertenecen a las serino-enzimas

mientras que las de clase B son metalo-enzimas zinc-dependientes. Estas últimas han sido descritas principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. y en menor medida en enterobacterias, mientras que las de clase A y D sólo han sido descritas en enterobacterias y *Acinetobacter*, respectivamente (3).

#### *Carbapenemasas de clase A*

Las carbapenemasas de clase molecular A pertenecen al grupo 2f de la clasificación de Bush *et al.* (4). NMC-A fue la primer carbapenemasa de clase A identificada a partir de *Enterobacter cloacae* en 1990, en Francia (5). La cepa productora de esta enzima presentaba sensibilidad disminuida a imipenem, aztreonam y en menor medida a meropenem, mientras que resultaba completamente sensible a las oximino cefalosporinas (cefotaxima, ceftacidima). NMC-A hidroliza aminopenicilinas, carboxipenicilinas, cefalotina, imipenem y aztreonam, y su actividad es parcialmente inhibida por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. El gen *nmc-A* está en el cromosoma, precedido de un gen regulador del tipo LysR (similar al gen regulador de las enzimas de tipo AmpC) siendo la expresión de NMC-A inducible (5). SME-1 fue la primer enzima de este grupo identificada en un aislamiento de *Serratia marcescens*. Este germen fue recuperado en Londres, en 1983, previo a la comercialización de los carbapenemes (6). El gen

codificante de SME-1 está localizado en el cromosoma y su expresión depende de un regulador de tipo LysR. Si bien SME-1 comparte sólo un 68% de identidad en aminoácidos con NMC-A, presenta similar perfil de hidrólisis de sustratos y de inhibición. SME-2 y SME-3 son mutantes puntuales de SME-1 identificadas también en *S. marcescens*, en EEUU (7). Es posible que aquellas *S. marcescens* portadoras del gen *sme* constituyan una subespecie que posea naturalmente este marcador de resistencia. IMI-1 fue identificada en dos cepas de *E. cloacae* aisladas en 1984, en EEUU (8); comparte un 95 % de identidad en aminoácidos con NMC-A y presenta similares perfil de hidrólisis y mecanismo de inducción. Más recientemente, en el 2001, en EEUU fue reportada una nueva carbapenemasa de clase A en *Klebsiella pneumoniae*, KPC-1, que confiere resistencia a carbapenemes, aztreonam y oximino cefalosporinas. A diferencia de las anteriores su actividad es mejor inhibida por ácido clavulánico y tazobactam. El gen *kpc-1* fue localizado en un plásmido, lo cual constituye una ventaja en la evolución de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos mediada por enzimas (9). En el 2001 fue descrita una variante puntual de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido GES-1 con actividad de carbapenemasa en *P. aeruginosa*, en Sudáfrica (10). GES-2, de codificación también plasmídica, presenta una eficiencia de hidrólisis de imipenem 100 veces superior a la de GES-1. Sin embargo su actividad es 1000 veces inferior a la de otras carbapenemasas de clase A como SME-1 y NMC-A. Posteriormente fueron reportadas 4 variantes de enzimas de tipo KPC y 9 de enzimas tipo GES ([www.lahay.org/studies](http://www.lahay.org/studies)).

La resistencia a carbapenemes en enterobacterias es un hecho infrecuente aún, en nuestro país. En el 2003 fue descrita por

primera vez una carbapenemasa de clase A en Argentina, que correspondió a la enzima NMC-A (11). Posteriormente a través del Programa Whonet-Argentina fueron identificadas, Sme-2 en *S. marcescens*, GES-3 en *E. cloacae* y una enzima tipo KPC en *K. pneumoniae* (Pasterán *et al.*, comunicación oral, X Congreso Argentino de Microbiología, 2004).

#### *Carbapenemasas de clase D*

La resistencia a carbapenemes en *Acinetobacter baumannii* ha alcanzado niveles alarmantes en nuestro país y en el resto del mundo ([www.aam.org.ar](http://www.aam.org.ar)). Esta resistencia frecuentemente se asocia a la producción de oxacilinasas con actividad hidrolítica sobre los carbapenemes (12). OXA-23 fue la primer enzima de tipo OXA-carbapenemasa descrita en *A. baumannii* y sucesivamente fueron reportadas en este germen otras enzimas de este tipo. En general presentan una débil actividad hidrolítica de carbapenemes pero son capaces de conferir resistencia en esta especie bacteriana, y son débilmente inhibidas por el ácido clavulánico (13). Las OXA-carbapenemasas han sido agrupadas en 4 "clusters": tipo OXA-23, tipo OXA-24, tipo OXA-58 y tipo OXA-51 (13). Se sugiere que la enzima OXA-51 es intrínseca de *A. baumannii* ya que se la encontró en todos los aislamientos analizados, tanto sensibles como resistentes a imipenem, siendo variable su nivel de expresión (14).

#### *Carbapenemasas de clase B:*

##### *Metallo- $\beta$ -lactamasas*

Las metallo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) son enzimas de clase molecular B de Ambler (2), pertenecientes al grupo funcional 3 de la clasificación de Bush *et al.* (4). Tienen la capacidad de hidrolizar a la mayoría de los compuestos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo a los

carbapenemes, y no son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas clásicos como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Su actividad catalítica depende del zinc por lo que los agentes quelantes pueden inhibir dicha actividad (4). La tasa de hidrólisis de los compuestos  $\beta$ -lactámicos es variable entre las distintas MBLs y puede o no correlacionar con resistencia a carbapenemes en los microorganismos productores. En base a la afinidad por los distintos sustratos, las MBLs se dividen en tres grupos: las enzimas del grupo 3a presentan un amplio perfil de sustratos, las del grupo 3b tienen afinidad preferencial por los carbapenemes y en el grupo 3c se agrupan las enzimas que hidrolizan pobremente a los carbapenemes respecto de otros  $\beta$ -lactámicos (15). A nivel molecular, las MBLs, forman un grupo muy heterogéneo cuya clasificación resulta engorrosa. Se ha propuesto la división de las enzimas de clase B en dos grupos: B1/B2 y B3. Estos dos grupos son tan distantes entre sí, que no se detectan secuencias homólogas entre proteínas pertenecientes a distintos grupos, sin embargo presentan homología a nivel estructural. La presencia de genes codificantes de MBLs en *Eubacteria*, *Archaeobacteria* y *Eukaryota* es consistente con un origen muy antiguo de esta familia (16). Las enzimas tipo IMP, VIM, SPM, GIM y SIM corresponde al grupo B1/B2, en cuyo motivo principal de unión al zinc poseen HHHC (H=histidina, C=cisteína).

Las MBLs pueden estar codificadas en genes de localización cromosómica o genes transferibles. Muchos bacilos infrecuentes presentan carbapenemasas cromosómicas, probablemente en forma ubicua, como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp. y *Aeromonas hydrophila* entre

otros (1, 3). Estas enzimas presentan una amplia diversidad, tanto en secuencia como en actividad. L-1 de *S. maltophilia* presenta cuatro subunidades idénticas mientras que las otras son polipéptidos simples (15). Las enzimas de *Aeromonas* hidrolizan eficientemente sólo a los carbapenemes, imipenem y meropenem, mientras que la mayoría de las MBLs hidroliza eficientemente a todos los  $\beta$ -lactámicos, excepto monobactámicos, aztreonam (17). Una misma especie, como en el caso de *Chryseobacterium meningosepticum* puede producir distintas enzimas o variantes de una misma que alcanzan hasta un 14% de divergencia (18). Existe escasa evidencia de que estas especies productoras de carbapenemasas cromosómicas tengan implicancia clínica. *Aeromonas*, *Flavobacterias* y *Bacillus* spp. resultan patógenos infrecuentes y sólo *S. maltophilia* es encontrado regularmente como colonizante.

Las MBLs adquiridas han sido reportadas principalmente en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y otros bacilos gram-negativos no fermentadores; también han sido reportadas, con menor frecuencia, en enterobacterias (3, 19). Estas enzimas comprenden cinco familias distintas: IMP, VIM, SPM, GIM y SIM. Las familias IMP y VIM presentan múltiples variantes alélicas, mientras que las familias SPM, SIM y GIM presentan un único miembro. Las enzimas tipo IMP y VIM son las más ampliamente diseminadas en el mundo. Los genes codificantes de estas enzimas se encuentran en su mayoría en elementos móviles lo que representa una real posibilidad de diseminación intra y entre especies y géneros. Este hecho determina la necesidad de detectar tempranamente su presencia a fin de prevenir una mayor diseminación, la cual parece estar conducida por el consumo regional de carbapenemes y oximino cefalosporinas (3, 19).

Los genes codificantes de MBLs tipo IMP, VIM, GIM y SIM, pero no SPM-1, se encuentran como genes en "cassette" localizados en integrones en su mayoría de clase 1, algunos genes *imp* se encuentran en integrones de clase 3 (19, 20). A su vez, estos integrones se encuentran en estructuras genéticas móviles como plásmidos y transposones (20). Los integrones son elementos genéticos capaces de capturar genes en "cassette" por un evento de recombinación sitio específico. Se define como gen en "cassette" a piezas de DNA circular de aproximadamente 1 kb que comprenden un gen de resistencia precedido por un sitio de unión al ribosoma y que posee un sitio de recombinación, denominado elemento de 59 pb localizado corriente abajo. Los integrones constan de una región variable, que corresponde a los distintos genes reclutados, flanqueada por dos regiones conservadas 5' y 3'. La región conservada 5' consiste en el gen de la integrasa, el sitio de recombinación *attI* y un promotor que facilita la expresión de los genes presentes en la región variable. En el extremo conservado 3' se encuentra un gen *qac* parcialmente deletado y el gen *sul1*, los cuales confieren resistencia a antisépticos y sulfonamidas respectivamente (20). En la mayoría de los casos los genes codificantes de MBLs están acompañados de genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, en consecuencia tanto aminoglucósidos como  $\beta$ -lactámicos pueden seleccionar aislamientos que portan estos genes de resistencia (19). Los genes en "cassette" pueden moverse libremente de un integrón a otro pero no pueden moverse entre distintos organismos, para ello requieren de otros elementos móviles como plásmidos o transposones (20).

La rápida diseminación de las MBLs, su

amplia diversidad y el número creciente de especies involucradas ha complicado la estandarización de métodos de detección adecuados y no ha permitido aún una completa comprensión de su epidemiología y su implicancia clínica (16).

#### *MBLs tipo IMP*

IMP-1 fue la primer carbapenemasa adquirida descrita a partir de una cepa de *P. aeruginosa* aislada en Japón, en 1988 (21), cuyo gen codificante se encontró en un plásmido conjugativo capaz de transferirse a otras *Pseudomonas*. Al igual que el resto de las metalcarbapenemasas su espectro de hidrólisis comprende a todos los  $\beta$ -lactámicos a excepción de los monobactámicos. IMP-1 ha sido caracterizada en diversas bacterias gram-negativas principalmente en *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *A. baumannii* y en algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae como *S. marcescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *C. freundii* (19). IMP-3, IMP-6 e IMP-10 son pequeñas variantes de IMP-1, también descritas en Japón (22-24). IMP-3 fue identificada en *S. flexneri* y presenta dos cambios en aminoácidos respecto de IMP-1, pero estos cambios parecen afectar su actividad ya que no hidroliza significativamente aminopenicilinas, ceftacidima e imipenem (22). IMP-2 fue identificada en Italia en 1997, a partir de una cepa de *A. baumannii* (25); si bien sólo comparte un 85% de identidad con IMP-1, los parámetros cinéticos de ambas son similares. IMP-4 fue caracterizada a partir de aislamientos de *Acinetobacter* resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, recuperados entre 1994 y 1998 en Hong Kong (26). Subsecuentemente fueron descritas nuevas variantes de enzimas tipo IMP (19) y en la actualidad esta familia consta de 24 miem-

bros, cuyas secuencias están depositadas en base de datos ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), [www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)).

Las enzimas de tipo IMP son principalmente reportadas en Corea y Japón, y ocasionalmente en Europa. En Corea se observó un 35 % de prevalencia de MBLs tipo IMP en aislamientos resistentes a carbapenemes, incluyendo *P. aeruginosa*. La presencia de MBLs fue detectada en el 60% de los hospitales coreanos, correspondiendo el 41.7% a enzimas tipo IMP. (27). Son escasos los reportes en América; en Brasil se ha reportado la presencia de IMP-1, IMP-6 e IMP-16 en *Acinetobacter* spp. (28, 29), y en México fue identificada IMP-18 (Hanson et al. Abstract C1-291, 44th ICCAC Program). En Argentina, se han encontrado dos enzimas de la familia IMP en *P. aeruginosa*: IMP-13 (Cuirolo et al., Abstract C2-415, pag. 109, en 46th. ICCAC Program), e IMP-16 (Andrés P. et al., Resumen: 16612, en Programa Congreso Sadebac 2006). Mientras que en el año 2006 fue identificada por primera vez en nuestro país una MBL en *A. baumannii*, la cual correspondió a una enzima tipo IMP (Fiorilli, et al. Resumen: 16583 en Programa Congreso Sadebac 2006).

#### MBLs tipo VIM

El segundo grupo dominante de MBLs, es el de las enzimas tipo VIM. El perfil de sustratos de estas enzimas es típico de las enzimas de clase B, y su actividad es inhibida por EDTA. VIM-1 fue reportada inicialmente en Italia, en 1997, en *P. aeruginosa* (30). Posteriormente fue descrita en *Achromobacter xylosoxydans* y *P. putida*, en Italia; y en *E. coli* y *K. pneumoniae* en Grecia y Francia, respectivamente (3). Recientemente, VIM-1 fue reportada en *P. mirabilis* y *C. koserii* en Brasil (Desphande et al. Abstract C2-88, p98, en 46th. ICCAC Program). La

resistencia a carbapenemes en enterobacterias resulta variable y las CIMs no siempre superan los puntos de corte de resistencia. VIM-2 fue identificada en el sur de Francia a partir de un aislamiento de *P. aeruginosa* recuperado en 1996 y comparte un 90% de identidad con VIM-1 (3, 31). VIM-2 fue subsecuentemente identificada en *P. aeruginosa* en España, Grecia, Portugal, Bélgica, Japón, Corea, Chile, Venezuela, Colombia, Argentina y recientemente en EEUU (3). Además de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, se ha reportado su presencia en Enterobacteriaceae como *S. marcescens*, *E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* (19). VIM-3 difiere en un solo aminoácido de VIM-2 y fue identificada en *P. aeruginosa* en Taiwan, mientras que VIM-4 fue identificada en Grecia (32, 33).

Actualmente la familia VIM consta de 14 miembros, agrupados en tres linajes evolutivos representados por VIM-1, VIM-2 y VIM-7 ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). La enzima VIM-12 está ubicada entre los grupos VIM-1 y VIM-2 (34).

*Pseudomonas aeruginosa* constituye el principal reservorio conocido de estas enzimas. En Italia el 20% de los aislamientos de esta especie y el 70% de los aislamientos resistentes a carbapenemes son productores de VIM-1 o VIM-2. Estos no corresponden a la diseminación de clones particulares y conllevan distintos determinantes de resistencia (35). Por otro lado estudios realizados en Corea indican que el 9% de los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes son productores de VIM-2. En Sudamérica, VIM-2 fue identificada en Chile y Venezuela en *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* respectivamente (19). En Argentina, la búsqueda de MBLs comenzó en el año 2002; hasta la fecha se han encontrado las enzimas VIM-2 y VIM-11 en

*P. aeruginosa* (36, 37). En el año 2006 VIM-2 fue también reportada en *P. putida* (38) y *P. fluorescens* (Bucca *et al.*, resumen: 16560, en Programa Congreso SADEBAC 2006)

#### MBLs SPM-1, GIM-1 y SIM-1

SPM-1 fue descrita a partir de *Pseudomonas aeruginosa* aislada en Brasil, en 1997 (39). La secuencia de SPM-1 difiere significativamente de las enzimas IMP y VIM. A diferencia del resto de los genes codificantes de las MBLs, el contexto genético de *spm-1* es único, no está asociado a integrones o transposones. Tanto *spm-1* como los genes adyacentes son parte de un islote de patogenicidad localizado en un plásmido, y los genes inmediatamente adyacentes a *spm-1* no están relacionados con resistencia a otros antibióticos (39). SPM-1 hidroliza preferentemente penicilinas: aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, y cefalosporinas. Recientemente esta enzima fue reportada en *P. aeruginosa*, en Argentina (Pasterán *et al.* resumen: 15561 pag. 16 en Programa Congreso SADEBAC 2006)

La enzima GIM-1 fue descrita en aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados en Alemania, en el año 2002 (40). Presenta aproximadamente un 43 % de identidad con las enzimas tipo IMP, sólo un 30% con las VIM y un 29% con SPM-1. Al igual que el resto de los genes codificantes de MBLs, *spm-1* se encontró en un integrón de clase 1, junto con otros tres genes de resistencia (*aacA4*, *aadA1*, *bla<sub>oxa</sub>-2*), localizado en un plásmido. Esto indicaría que tanto los aminoglucósidos como  $\beta$ -lactámicos serían buenos seleccionadores.

La última familia de MBLs adquiridas fue encontrada en *A. baumannii* en Corea, en el año 2005. Esta enzima denominada SIM-1 comparte entre un 64-69% de identidad en aminoácidos con las enzimas tipo IMP (41).

#### Métodos de detección de MBLs

Habitualmente se sospecha la presencia de una MBL en un aislamiento clínico cuando se observa una CIM elevada a carbapenemes (o un halo de inhibición reducido). Entre las *P. aeruginosa* productoras de enzimas tipo IMP, VIM, GIM, SIM y SPM han sido reportados valores de CIMs de imipenem 8 a >128  $\mu\text{g/ml}$  (42). Sin embargo, cuando estas enzimas están presentes en enterobacterias, las CIMs de imipenem resultan mucho más bajas, de hasta 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Esto demuestra que en *P. aeruginosa* y en otros no fermentadores, factores como la impermeabilidad intrínseca y los sistemas de eflujo contribuyen a esta resistencia. Debido a que los datos convencionales de susceptibilidad no resultan sensibles ni específicos para detectar todos los microorganismos productores de MBLs, los microbiólogos clínicos deben estar prevenidos que aislamientos de bacilos gram-negativos con CIMs por debajo de los puntos de corte de resistencia habituales (pero superiores a los poblacionales) pueden ser verdaderos productores de MBLs (3, 16). En este sentido la Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC-AAM ha recomendado investigar la presencia de MBLs en aislamientos que presenten halos de inhibición de imipenem y/o meropenem menores a 21 mm, y colocar los discos de antibiótico, en el antibiograma, de manera de poder analizar distintos mecanismos de resistencia presentes ([www.aam.org.ar](http://www.aam.org.ar)). Los métodos automatizados han demostrado problemas de interpretación de susceptibilidad en microorganismos productores de MBLs (43).

Las medidas espectrofotométricas de la inhibición de la hidrólisis de carbapenemes en presencia de EDTA (30) resulta el método de referencia en la confirmación de la producción de MBLs, pero no es aplicable a

los laboratorios de microbiología clínica.

En contraste numerosos métodos basados en la difusión han sido propuestos para el "screening" de las MBLs en el laboratorio clínico, basados principalmente en la sinergia entre un inhibidor de MBLs (en general EDTA o ácido 2-mercaptopropiónico) y una oximino cefalosporina o un carbapenem (44-47). Cabe destacar que la mayoría de los métodos han sido validados principalmente con *P. aeruginosa* y en menor medida con *Acinetobacter* spp., pero es escasa la experiencia con otros bacilos gram-negativos no fermentadores y mucho más limitada con *Enterobacteriaceae*. Algunos estudios indican que la sensibilidad del ensayo de aproximación imipenem-EDTA en *Pseudomonas* y *A. baumannii* fue de 100% y 95.7%, respectivamente. Las tiras de Etest (Imipenem-imipenem/EDTA) resultan apropiadas en *P. aeruginosa*, pero no en *Enterobacterias*, presentando una sensibilidad de 94% y una especificidad de 95% en microorganismos productores de MBLs (48). Algunos métodos propuestos como el ensayo microbiológico EDTA-imipenem (EIM) ha mostrado una mayor especificidad y sensibilidad que los ensayos de aproximación de discos, pero estos métodos que utilizan extractos celulares, si bien más eficaces, resultan menos prácticos (47). Cabe mencionar que el EDTA en algunos casos puede disminuir la CIM de imipenem a expensas de la inhibición de OprD, dando falsos positivos (49).

Los métodos moleculares (PCR ó hibridación con sondas) son necesarios para confirmar la presencia de genes codificantes de MBLs, pero no están disponibles a la mayoría de los laboratorios clínicos. Para la identificación del gen codificante de las MBLs presentes es necesaria la secuenciación completa del mismo. La caracterización de

una nueva enzima debe incluir tanto el análisis molecular como un análisis funcional de los perfiles de hidrólisis e inhibición realizados con la enzima purificada (42).

A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados por diversos grupos de investigación en todo el mundo, el desarrollo de metodologías seguras y adecuadas para la detección de MBLs, el conocimiento completo de su epidemiología y la comprensión de su impacto clínico ha sido superado por la rápida diseminación de estas enzimas, su amplia diversidad y el número de especies bacterianas involucradas. La introducción de un "screening" sistemático de productos de MBLs en la rutina del laboratorio resulta en la actualidad necesario, tanto con fines diagnósticos como de vigilancia epidemiológica, especialmente en regiones donde han sido identificadas cepas productoras de MBLs.

## Bibliografía

1. Livermore, D.; Woodford N. 2000. Carbapenemases: a problem in waiting?. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:489-495.
2. Ambler, R. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**: 321-331.
3. Nordmann, P; Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:321-331.
4. Bush, K.; Jacoby, G.; Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211-1233.
5. Nordmann, P; Mariotte, S.; Naas, T.; Labia, R.; Nicolas, M. 1993. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents*



Chemother. **37**: 939-946.

6. Yang, Y.; Wu, P.; Livermore, D. 1990.

Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **34**: 755-758.

7. Queenan, A.; Torres-Viera, C.; Gold, H.; Carmeli, Y.; Eliopoulos, G.; Moellering, R.; Quinn, J.P.; Hindler, J.; Medeiros, A.A.; Bush K. 2000. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 3035-3039.

8. Rasmussen, B.; Bush, K.; Keeney, D.; Yang, Y.; Hare, R.; O'Gara, C.; Medeiros, A.A. 1996. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**: 2080-2086.

9. Yigit, H.; Queenan, A.; Anderson, G.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J.; Steward, C.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F.C. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 1151-1161.

10. Poirel, L.; Weldhagen, G.; Naas, T.; De Champs, C.; Dove, M.; Nordmann, P. 2001. GES-2, a Class A  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 2598-2603.

11. Radice, M.; Power, P.; Gutkind, G.; Fernández, K.; Vay, C.; Famiiglietti, A.; Ricover, A.; Ayala, J. A. 2004. First Class A Carbapenemase Isolated from Enterobacteriaceae in Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 1068-1069.

12. Woodford, N.; Ellington, M.; Coelho, J.; Turton, J.; Ward, M.; Brown, S.; Amyes, S.G.; Livermore, D.M. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents **27**: 351-353.

13. Brown, S.; Amyes, S. 2006. OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. J. Antimicrob. Chemother. **57**:1-3

14. Heritier, C.; Poirel, L.; Fournier, P.; Claverie, J.; Raoult, D.; Nordmann, P. 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 4174-9.

15. Rasmussen, B.; Bush, K. 1997. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. **41**: 223-232

16. Cornaglia, G.; Akova, M.; Amicosante, G.; Cantón, R.; Cuda, R.; Docquier, J-D.; Edelstein, M.; Frere, J.M.; Fuzi, M.; Galleni, M.; Giamarellou, H.; Gniadkowski, M.; Koncan, R.; Libisch, B.; Luzzaro, F.; Miriagou, V.; Navarro, F.; Nordmann, P.; Pagani, L.; Peixe, L.; Poirel, L.; Souli, M.; Tacconelli, E.; Vatopoulos, A.; Rossolini, G.M. 2007. Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. Int. J. Antimicrob. Agents. **29**: 380-8.

17. Shanon, K.; King, A.; Phillips, I. 1986. Beta-lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. J. Antimicrob. Chemother. **17**: 45-50.

18. Woodford, N.; Papelou, M.; Babini, G.; Livermore, D. 2000. Carbapenemases of *Chryseobacterium meningosepticum*: distribution of *blaB* and characterization of novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *blaB3*, in the type strain, NCTC 10016. Antimicrob. Agents. Chemother. **44**: 1448-1452.

19. Walsh, T.; Toleman, M.; Poirel, L.; Nordmann, P. 2005. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm?. Clin. Microbiol. Reviews **18**: 306-325.

20. Bennet, P. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J. Antimicrob. Chemother. **43**: 1-4.

21. Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

- Antimicrob. Agents. Chemother.* **35**: 147-151.
22. Iyobe, S.; Husadokoro, A.; Ozaki, J.; Matsumura, N.; Minami, S.; Haruta, S.; Sawai, T.; O'Hara, K. 2000. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **44**: 2023-2029.
23. Yano, H.; Kuga, A.; Okamoto, R.; Kitasato, H.; Kobayashi, T.; Inoue, M. 2001. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**: 1343-1348.
24. Iyobe, S.; Husadokoro, A.; Takahashi, A.; Yomoda, S.; Okubo, T.; Nakamura, A.; O'Hara, K. 2002. Detection of a variant metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**: 2014-2016.
25. Cornaglia, G.; Riccio, M.; Mazzariol, A.; Lauretti, L.; Fontana, R.; Rossolini, G. 1999. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* **353**: 899-900.
26. Chu, Y.; Afzal-Shah, M.; Houang, E.; Palepou, M.; Lyon, D.; Woodford, N.; Livermore D. 2001. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected from Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**: 710-714.
27. Oh, E.; Lee, S.; Park, Y.; Park, J.; Park, K.; Kim, S.; Kang, M.W.; Kim, B.K. 2003. Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Korean university hospital and comparison screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Microbiol. Methods* **54**: 411-418.
28. Gales, A.; Tognim, M.; Reis, O.; Jones, R.; Sader, H. 2003. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from Brazilian teaching hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**: 77-79.
29. Mendes, R.; Toleman, M.; Ribeiro, J.; Sader, H.; Jones, R.; Walsh, T. 2004. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla imp-16*: a highly divergent *bla imp* with a unique genetic context. Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**: 4654-4661.
30. Lauretti, L.; Riccio, M.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante, G.; Fontana, R.; Rossolini, G.M. 1999. Cloning and characterization of *blavim*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**: 1584-90.
31. Poirel, L.; Collet, L.; Nordmann, P. 2001. Carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 84-85.
32. Yan, J.; Hsueh, P.; Ko, W.; Luh, K.; Tsai, S.; Wu, H.; Wu, M. 2001. Metallo- $\beta$ -lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of VIM-e enzyme. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**: 2224-28.
33. Pournaras, S.; Tsakris, A.; Maniatis, M.; Tzouveleki, L.; Maniatis, N. 2002. Novel variant (*blavim-4*) of metallo- $\beta$ -lactamase gene *blavim-1* in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**: 4026-28.
34. Pournaras, S.; Ikonomidis, A.; Tzouveleki, T.; Tokatlidou, D.; Spanakis, N.; Maniatis, A.; Legakis, N.J.; Tsakris, A. 2005. VIM-12, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- $\beta$ -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae* That Resembles a VIM-1/VIM-2 Hybrid. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **49**: 5153-5156.
35. Lagatolla, C.; Tonin, E.; Monti-Bragadin, C.; Dolzani, L.; Gombac, F.; Bearzi, C.; Edalucci E.; Gionchetti, E.; Rossolini, G.M. 2004. Endemic carbapenem-resistance *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- $\beta$ -lactamase determinants in European hospital. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 535-538.
36. Pagniez, G.; Radice, M.; Cuirolo, A.; Rodríguez, O.; Rodríguez, H.; Vay, C.; Famiglietti,

- A.; Gutkind, G 2006. Prevalencia de metallo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. Rev. Argent. Microbiol. **38**: 33-37.
- 37.** Pasterán, F.; Faccone, D.; Petroni, A.; Rapoport, M.; Galas, M.; Vazquez, M.; Procopio A. 2005. Novel variant (blaVIM-11) of the metallo-beta-lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum-(beta)-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 474-5.
- 38.** Almuzara, M.; Radice, M.; De Gárate, N.; Kossman, A.; Cuirolo, A.; Santella, G.; Famiglietti, A.; Gutkind, G.; Vay V. 2007. First VIM-2 producing *P. putida* isolated in Buenos Aires. Emerg Infect Dis. **13**: 668-9.
- 39.** Toleman, M.; Simm, A.; Murphy, T.; Gales A.; Biedenbach, D.; Jones, R.; Walsh, T.R. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. J. Antimicrob. Chemother. **50**: 673-679.
- 40.** Castanheira, M., Toleman, M., Jones R., Schmidt, F., Walsh, T. 2004. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, bla<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 4654-4661.
- 41.** Lee, K.; Yum, J.; Yong, D.; Lee, H.; Kim, H.; Docquier, J.; Rossolini, G.M.; Chong Y. 2005. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla<sub>SIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 4485-449.
- 42.** Queenan, A.; Bush, A. 2007. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. **20**: 440-458.
- 43.** Giakkoupi, P.; Tzouveleki, T.; Daikos, G.; Miriagou, V.; Petrikos, G.; Legakis, N.; Vatopoulos A.C. 2005. Discrepancies and Interpretation Problems in Susceptibility Testing of VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. J. Clin. Microbiol. **43**: 494-496.
- 44.** Arakawa, Y.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Yagi, T.; Fujiwara, H. 2000. Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. J. Clin. Microbiol. **38**: 40-43.
- 45.** Yong, D.; Lee, K.; Yum, J.; Shin, H.; Rossolini, G.; Chong, Y. 2002. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. **40**: 3798-3801.
- 46.** Walsh, T.; Bolmström, A.; Qwörnström, A.; Gales, A. 2002. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- $\beta$ -Lactamases in Routine Clinical Testing. J. Clin. Microbiol. **40**: 2755-2759.
- 47.** Marchiaro, P., Mussi, M., Ballerini, V., Pasteran, F., Viale, A., Vila, A., Limansky, A. S. 2005. Sensitive EDTA-Based Microbiological Assays for Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamases in Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. J. Clin. Microbiol. **43**: 5648-5652.
- 48.** Walsh, T.; Bolmström, A.; Qwörnström, A.; Gales, A. 2002. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- $\beta$ -Lactamases in Routine Clinical Testing. J. Clin. Microbiol. **40**: 2755-2759.
- 49.** Chu, Y.; Cheung, J.; Ngan, J.; Kam, K. 2005. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and imipenem-EDTA disk method. Int. J. Antimicrob. Agents. **26**:340-341.