

Comunicación breve

Aislados Clínicos de *Pseudomonas putida* portadores de Metallo- β -lactamasa en el Hospital de Niños "Dr. Orlando Alassia" de la ciudad de Santa Fe

RECIBIDO: 24.07.2012

ACEPTADO: 30.08.2012

Degiovanni, GE • Giusti, A. • Zurbriggen, ML. • Baroni, MR.

Laboratorio Bacteriología, Hospital de niños "Dr. Orlando Alassia".
Ciudad de Santa Fe Capital, Argentina. Mendoza 4151.
Teléfono: 0342- 4505900, int 279.
E-mail: gabidegiovanni@hotmail.com; bacterioalassia@gmail.com

RESUMEN: Existe un notable incremento de la resistencia a los antimicrobianos y el género *Pseudomonas* es capaz de adquirir mecanismos que presentan una alta tasa de diseminación entre bacilos gram negativos. El propósito del presente trabajo fue identificar los mecanismos de resistencia a los carbapenemes de tres aislamientos de *P. putida* multirresistente recuperados de muestras clínicas de pacientes pediátricos. Se determinó la sensibilidad antibiótica utilizando método automatizado, se realizó la prueba de sinergia con doble disco y E test a imipenem y meropenem en medio MH con y sin agregado de EDTA. Se realizaron los ensayos microbiológicos de Hodge modificado y Masuda. Las metodologías empleadas evidenciaron la posible presencia de metalo- β -lactamasa (MBL) y se confirmó por PCR la existencia de los genes *bla_{VM}*. La detección de estas enzimas es importante para la toma de medidas de control epidemiológico y su reconocimiento temprano

previene la propagación generalizada, en particular entre patógenos gram-negativos emergentes.

PALABRAS CLAVE: *Pseudomonas putida*, metalo- β -lactamasa, carbapenemes.

SUMMARY: *Clinical isolates of Pseudomonas putida carrying Metallo- β -lactamase at the Children's Hospital "Dr. Orlando Alassia" of Santa Fe.*

There is a significant increase of antimicrobial resistance and the genus *Pseudomonas* is capable of acquiring new mechanisms that present a high spreading rate among gram-negative bacilli. The purpose of the present study was to identify the resistance mechanisms to carbapenems from three isolates of MDR *P. putida* recovered from clinical samples of pediatric patients. Antibiotic sensitivity was determined using automatized methods and the double disk synergy test and the E test to imipenem and meropenem among MH with and

without EDTA were carried out. Microbiological trials of modified Hodge and Masuda were performed. The methodologies used showed the possible presence of MBL genes and the existence of genes *bla_{VIM}* was confirmed by PCR. The detection of these enzymes is important

in order to implement epidemiological control measures, and their early recognition prevents their generalized spreading, particularly, among emerging gram-negative pathogens.

KEYWORDS: *Pseudomonas putida*, metallo- β -lactamase, carbapenemes.

Introducción

La emergencia de carbapenemasas, tales como las metalo- β -lactamasas (MBL) y otras β -lactamasas adquiridas que afectan a los carbapenemes, constituyen un desafío terapéutico debido a que estas enzimas confieren un alto nivel de resistencia a la mayoría de los β -lactámicos, incluyendo carbapenemes, con la excepción de aztreonam, en el primer grupo **(1,2)**.

En base a estudios moleculares, se describen dos tipos de enzimas que hidrolizan carbapenemes: las serin enzimas que poseen una fracción serina en el sitio activo, y las MBL, que requieren cationes divalentes, por lo general de zinc, como cofactores metálicos para desarrollar su actividad enzimática **(1,3,4,5)**. Las MBL no son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam, ni por ácido 3-aminofenil borónico, (APB). En cambio, el EDTA es capaz de inhibir las MBL y por esta razón se utiliza para detectar la presencia de éstas enzimas **(6, 7)**.

La mayoría de los genes codificantes se encuentran en integrones localizados en plásmidos o transposones **(8)**.

El uso indiscriminado de cefalosporinas de espectro extendido o carbapenemes ha contribuido a la selección y diseminación de estos genes de resistencia. Las MBL

adquiridas fueron descritas por primera vez a principios de 1990 y en la actualidad han sido descritos diez tipos de carbapenemasas: IMP, VIM, SPM-1, GIM-1, NDM-1, SIM-1, KHM-1, AIM-1, DIM-1 y TMB-1 que no están relacionados entre sí, siendo las enzimas de tipo VIM e IMP las más prevalentes. Recientemente, la OPS ha comunicado el primer aislamiento de NDM en *Klebsiella pneumoniae*, en Latinoamérica **(1, 5, 8)**.

Se informó VIM-2 por primera vez en *Pseudomonas putida* en Taiwán, Corea, Japón, Francia y Argentina entre 2002 y 2007 **(2, 15)**.

P. putida es un bacilo gram negativo no fermentador que normalmente coloniza los ambientes hospitalarios y se considera de bajo nivel patógeno. Este microorganismo actúa como reservorio de genes de multiresistencia, en particular MBL y recientemente se han descrito cepas multiresistentes portadoras de estas beta lactamasas **(8, 9, 10)**. Se han reportado infecciones nosocomiales causadas por *P. putida* multiresistente con MBL en los pacientes gravemente enfermos o inmunocomprometidos con frecuencia hospitalizados en unidades de cuidados intensivos **(2)**.

El propósito del presente trabajo fue identificar los mecanismos de resistencia a los carbapenemes de tres aislamientos de *P. putida* multirresistente recuperados de muestras clínicas de pacientes pediátricos atendidos en el Hospital de Niños Dr. Orlando Alassia de Santa Fe.

Materiales y Métodos

Se estudiaron tres aislamientos de *P. putida* provenientes de muestras de pacientes atendidos en el Hospital de Niños "Dr. O Alassia" de Santa Fe durante el período 2006-2012. Las cepas provenían de tres pacientes (1, 2 y 3). El primero, internado en Unidad de Cuidados Intensivos y los 2 últimos, pacientes ambulatorios. Los aislamientos se recuperaron de catéter ventricular en el paciente 1 y de orina de los pacientes 2 y 3. Los aislamientos provenientes de los pacientes 1 y 2 fueron jerarquizados clínicamente, no ocurriendo lo mismo con el último aislamiento.

La identificación de las cepas se realizó mediante el Sistema Automatizado Vitek (bioMérieux) y pruebas bioquímicas manuales convencionales (Reducción de NO_3^- a NO_2^- , arginina dehidrolasa (ADH), prueba de oxidasa, prueba oxidativa-fermentativa (HUGH Y LEIFSON), crecimiento a 42°C e hidrólisis de la gelatina).

Pruebas de sensibilidad: CLSI no tiene normatizadas las pruebas de sensibilidad por difusión con discos para predecir sensibilidad en *P. putida*, por lo tanto se determinaron las CIMs (concentración inhibitoria mínima) por método automatizado Vitek (bioMérieux) y se tuvieron en cuenta, para el tratamiento, las drogas no afectadas por la presencia de la enzima: colistina, ciprofloxacina, amicacina.

Caracterización fenotípica de la resistencia: se utilizó como screening para detectar la presencia de MBL el algoritmo propuesto por el "Servicio de Antimicrobianos del INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán" y según sugerencia de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Asociación Argentina de Microbiología, que consiste en aproximar los discos de imipenem (10 μg) y meropenem (10 μg) con el disco de EDTA 5 μM en medio Mueller Hinton colocando los discos a 15 mm de distancia de borde a borde (7). La presencia de un agrandamiento de la zona de inhibición entre los dos discos se interpretó como sinergia positiva.

Se realizó el método epsilométrico (E test) en medio Mueller Hinton con y sin el agregado de EDTA 0,4 mM para los siguientes antimicrobianos: imipenem y meropenem. El test se realizó conforme a las indicaciones del fabricante (bioMérieux). Se interpretó como indicativo de la producción de MBL cuando se observó una reducción de la CIM de tres o más diluciones en presencia de EDTA. (12).

Ensayos microbiológicos:

- Masuda: se realizó el test para evaluar resistencia enzimática descrito por Marchiaro P. y cols (12), con algunas modificaciones: el extracto enzimático (EE) se obtuvo realizando una suspensión bacteriana en buffer fosfato 0,01M pH 7 y trasvasando dicho inóculo a un tubo conteniendo 300 mg de zirconio. Se "vortexeó" durante 3 min. y se centrifugó a 6000 rpm durante 1 min. El sobrenadante (EE) se usó para el ensayo. En el centro de una placa de Mueller Hinton hisopada con una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (bacteria indicadora) se colocaron discos de imipenem y

meropenem. Luego de 10 min. se colocaron 10 µl del EE en el borde interno del halo de sensibilidad registrado para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. Se incubó a 35°C durante 18-24 horas y se interpretó como positivo cuando se observó desarrollo de la bacteria indicadora alrededor de los EE. Se usaron controles positivo (*P.putida*), cedida por el Servicio de Antimicrobianos del INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", control negativo (*P. aeruginosa* ATCC 27853).

- Hodge modificado: En el centro de una placa de agar Mueller Hinton inoculada a partir de un cultivo ajustado a 10⁸ bacterias/ml de un microorganismo indicador (*E. coli* ATCC 25922), se colocó un disco con el antibiótico (imipenem 10µg). Luego se sembró una ansada densa del microorganismo en estudio dentro de la zona de inhibición esperada para la droga ensayada. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se incubó toda la noche a 35 °C. Una deformación del halo de inhibición (efecto D o achatamiento o crecimiento del microorganismo indicador por dentro del halo de inhibición) se interpretó como un ensayo positivo. (7).

Caracterización genotípica de la resistencia: se realizó en el "Servicio de Antimicrobianos del INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán" mediante PCR con cebadores específicos para amplificar genes que codifican para metaloenzimas.

Resultados

Los tres aislamientos estudiados fueron identificadas como *P. putida* mediante el sistema automatizado Vitek y pruebas bioquímicas manuales convencionales.

Los valores de las CIMs de colistina: ≤0,5 µg/ml; ciprofloxacina: ≤ 0,25 µg/ml; ampicilina ≤2 µg/ml, fueron interpretados como sensibles para los tres aislamientos, no ocurriendo lo mismo para los carbapenemes: imipenem y meropenem (CIM > 64 µg/ml).

En los tres aislamientos se observó un incremento en los halos de imipenem y meropenem en cercanías del disco de EDTA (método de aproximación de discos), lo cual convirtió el aislamiento en sospechoso de la presencia de MBL (Figura 1).

Los valores de las CIMs (método epsilométrico) para imipenem y meropenem en medio Mueller Hinton sin y con el agregado



Figura 1: Ensayo de sinergia por aproximación de discos

de EDTA 0,4 mM, se muestran en la **tabla 1** y fueron indicativos, en los tres aislamientos, de alta sospecha de la existencia de MBL.

Con el fin de detectar el mecanismo enzimático de resistencia a carbapenemes, se realizó el método de Masuda, utilizando

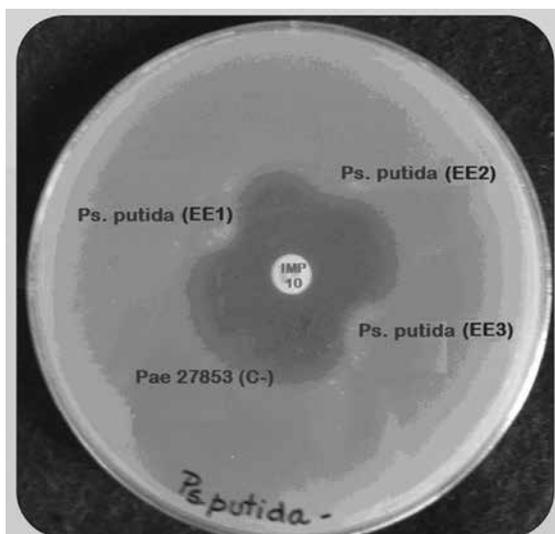
Tabla 1. Valores de CIMs ($\mu\text{g/ml}$) en medio M. Hinton con y sin el agregado de EDTA.

CIM Cepa de paciente	IMIPENEM		MEROPENEM	
	M.HINTON	M.HINTON + EDTA	M.HINTON	M.HINTON + EDTA
1	>32	1,5	>32	1,5
2	>32	1	>32	2
3	>32	0,75	>32	2

los extractos enzimáticos (EE), obtenidos a partir de los cultivos de las bacterias provenientes de los tres aislamientos, resultando positivo (Figura 2).

También se realizó el método de Hodge modificado, usando los aislamientos recuperados de los tres pacientes en estudio,

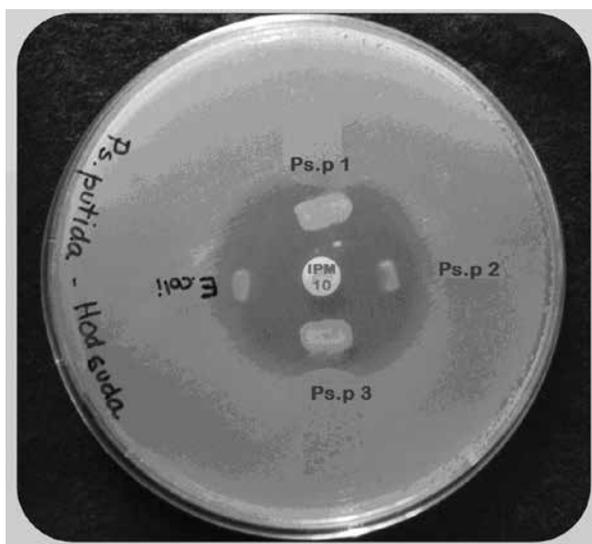
Figura 2. Ensayo Microbiológico de Masuda



observándose una deformación en el halo de inhibición, test (+) (Figura 3).

Se confirmó mediante PCR, que los tres aislamientos eran portadores del gen *bla*_{VIM}

Figura 3. Ensayo de Hodge Modificado.



que codifica para una metalo- β -lactamasa del tipo VIM.

Discusión

P. putida, es un microorganismo que tiene un bajo potencial patógeno para la mayoría de los pacientes, con la excepción de aquellos que presentan algún tipo de inmunocompromiso (9), habitualmente se encuentra como microbiota colonizante de pacientes que han recibido un prolongado esquema con antibióticos en las unidades de cuidados intensivos o han permanecido hospitalizados por largos períodos de tiempo (2).

En el presente trabajo, los pacientes no eran inmunocomprometidos, pero poseían factores de riesgo relacionados al inmuno-

compromiso: corta edad, y además otros factores como múltiples cursos de antibióticos, presencia de catéteres de larga permanencia y cirugías previas con disrupción y pérdida de integridad de la piel.

El primer aislamiento de *P. putida* con MBL recuperado en el año 2006 (paciente 1), se obtuvo a partir de un catéter ventricular de una paciente con craneofaringioma, que luego de ser sometida a cirugía, desarrolló hidrocefalia y posterior pioventriculitis. No se han reportado en la bibliografía internacional pioventriculitis por *P. putida* con MBL, pero sí se han descrito casos en la literatura mundial de hemocultivos positivos y sepsis relacionadas a catéteres de corta permanencia en pacientes con cáncer (14).

Los aislamientos de los pacientes 2 y 3

ocurridos en los años 2011 y 2012, fueron recuperados de muestras de orina recogidas posteriores al alta hospitalaria de estos pacientes, quienes, fueron atendidos por consultorio externo. Merece destacar que ambos pacientes permanecieron hospitalizados, en nuestra institución, por largo tiempo ya que sufrían malformaciones del árbol urinario y fueron sometidos a múltiples cirugías reconstructivas, lo que hace sospechar el origen hospitalario de los aislamientos. **(2, 10,15, 16).**

Si bien la caracterización fenotípica y la portación de la MBL tipo VIM en los 3 aislamientos, hace pensar, que podría tratarse de cepas relacionadas genéticamente, no podemos asegurarlo, debido a que no hemos realizado estudios de clonalidad en el presente trabajo.

Hasta la fecha no hemos detectado este mecanismo de resistencia en otras especies distintas de *P. putida*, siendo estos 3 casos, los primeros encontrados en nuestra institución.

Los tres aislamientos de *P. putida* fueron productores de MBL. Resultando, para nosotros, el ensayo de sinergia por aproximación de discos una técnica de screening de gran utilidad debido al bajo costo, su fácil realización, la rapidez y la elevada sensibilidad; sin embargo, algunos autores han comunicado que no resultan absolutamente sensibles **(7).**

El método microbiológico para detectar mecanismos de resistencia enzimática a partir de extractos celulares (EE) resultó, en nuestra experiencia, más fácil de visualizar que el método de Hodge modificado **(13).**

Conclusiones

La resistencia a los carbapenemes que presentaron los tres aislamientos de *P. putida* fue debida a la presencia de una MBL tipo VIM, siendo el ensayo de sinergia por aproximación de discos, un screening de gran utilidad para detectar este mecanismo.

La detección de estas enzimas fue importante para la toma de medidas de control epidemiológico debido a que las mismas se hallan codificadas en elementos genéticos móviles. El reconocimiento temprano de estos mecanismos de resistencia previene su propagación generalizada, en particular entre los patógenos emergentes gram-negativos, no fermentadores de glucosa como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter baumannii*.

El tratamiento antimicrobiano oportuno y adecuado se realizará en base a las CIMs de los antimicrobianos no afectados por este mecanismo y tiene por objeto lograr una mejor sobrevida del paciente.

Agradecimientos

Laboratorio Central de Referencia de la Provincia de Santa Fe. Especialista en Bacteriología Clínica: Daniela Jordán.

Servicio de Antimicrobianos del INEI-ANLIS, Dr. "Carlos G. Malbrán".

Bioquímico Fernando G. Pasterán.

Referencias bibliográficas

1. Walsh T.; Toleman M.; Poirel L.; Nordman P., 2005. Metallo- β -Lactamases: The quiet before the Storm? Clin. Microbiol. Rev. **18**, 2: 306-325
2. Treviño M.; Moldes L.; Hernández M.; Martínez Lamas L.; García Riestra C.; Regueiro B., 2010. Nosocomial Infection by VIM-2, Metallo- β -Lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital.

mase-producing *Pseudomonas putida*. J .Med. Microbiol. **59**, 853-855

3. Gary D.; Overtuf M.D., 2010. Carbapenemases, A brief review for pediatric infectious disease specialists. *Pediatr. Infect. Dis. J* **29**, 1: 68-70
4. Wang Z.; Fast W.; Valentine A.; Benkovic S., 1999. Metallo- β -Lactamase: Structure and mechanism. *Current opinion in chem. biol.* **3**: 614 – 622.
5. Nicolau J.C.; Oliver A., 2010. Carbapenemases en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm. Infecc. Microbiol .Clin.* **28**, 1: 19 -28.
6. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, *et al.* A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:1612-1615.
7. Radice M., Marin M., Giovanakis M., Vay C., Almuzara M., Limansky A., Casellas J., Famiglietti A., Quinteros M., Bantar C., Galas M., Kovensky Pupko J., Nicola F., Pasteran F., Soloaga R., Gutkind G., 2011. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Rev.Arg. Microbiol.* **43**: 136- 153.
8. Carlos J.; Zamorano L.; Mena A.; Alberti S.; Perez J. L.; Oliver A., 2010. Metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 3: 474- 478.
9. Yomoda S.; Okubo T.; Takahashi A.; Murakami M.; Iyobe S., 2003. Presence of *Pseudomonas*

putida Strains Harboring Plasmids Bearing the Metallo- β -Lactamase Gene *bla_{IMP}* in a Hospital in Japan. *J .Clin. Microbiol.* **41**, 9:4246- 4251.

10. Lombardi G.; Luzzaro F.; Docquier J.; Riccio M.; Perilli M.; Coli A.; Amicosante G.; Rosso- lini G.; Toniolo A., 2002. Nosocomial Infections Caused by Multidrug- Resistant Isolates of *Pseu- domonas putida* Producing VIM- 1 Metallo- β -Lac- tamase. *J .Clin .Microbiol.* **40**, 11: 4051-4055.
11. Clinical and Laboratory Standards Insti- tute.2005. Performance Standarts for antimicro- bial Susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. Approved Standards M100- S15, vol 25 (1).
12. Walsh T. R., Bolmstrom A., Qvarnstrom A., and Gales A., 2002.Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine cli- nical testing. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2755-2759.
13. Marchiaro P, Mussi M., Ballerini V., Pasteran F., Viale A., Vila A., Limansky A., 2005.Sensitive EDTA-Based Microbiological Assays for Detec- tion of Metallo- β -Lactamases in Non fermentative Gram-Negative Bacteria. *J. Clin. Microbiol*, **43**, 11:5648–5652.
14. Anaissie E., M.D., Fainstein V., M.D., Miller P, A.S.C.P(M.), Kassamali H., M.D., Pitlik S., M.D., Bodey G., M.D., Rolston K., M.D, 1987. *Pseudo- monas putida*: Newly recognized pathogen in patients with cancer. *Am.Journ.Med* **82**, 6: 1191- 1194.
15. Almuzara M., Radice M., de Gárate N., Kossman A., Cuirolo A., Santella G., Famiglietti A., Gutkind G., Vay V., 2007. VIM-2-productora de *Pseudomonas putida*, Buenos Aires. *Em. Infect. Dis. Jour.* **13**, 4:668- 669.
16. Goenaga Sánchez MA., Millet Sampedro M., Carrera Macazaga J. A., Garde Orbáiz C., 2005. Infección nosohusial por *Pseudomonas putida*. *An.Med. Int.* **22**, 4:201- 202.