

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Prevalencia del determinante de resistencia plasmídica a quinolonas *aac(6′)-Ib-cr* en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diez hospitales de Chile

Eliú Elgorriaga-Islas^a, Piero Guggiana-Nilo^a, Mariana Domínguez-Yévenes^a, Gerardo González-Rocha^a, Sergio Mella-Montecinos^b, Jaime Labarca-Labarca^c, Patricia García-Cañete^d y Helia Bello-Toledo^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

^b Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

^c Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

^d Departamento de Laboratorios Clínicos, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 29 de agosto de 2011

Aceptado el 24 de enero de 2012

On-line el 26 de abril de 2012

Palabras clave:

aac(6′)-Ib

aac(6′)-Ib-cr

Klebsiella pneumoniae

Escherichia coli

Determinantes plasmídicos de resistencia

a quinolonas (DPRQ)

Quinolona

Chile

R E S U M E N

Introducción: En Chile no se conoce la frecuencia del determinante plasmídico de resistencia a quinolonas (DPRQ) *aac(6′)-Ib-cr* en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de BLEE.

Metodología: Utilizando PCR, RFLP y secuenciación se detectó *aac(6′)-Ib* y *aac(6′)-Ib-cr* en cepas aisladas en 10 hospitales chilenos entre 2008 y 2009.

Resultados: Este DPRQ fue detectado ampliamente en *K. pneumoniae* (54%) y *E. coli* (74%). La CIM₅₀ de CIP fue mayor en cepas con *aac(6′)-Ib-cr*; 8 veces en *K. pneumoniae* y 4 en *E. coli*. En 13 cepas de *K. pneumoniae* y 3 de *E. coli* se encontraron ambos genes simultáneamente.

Conclusión: Este es el primer informe de *aac(6′)-Ib-cr* en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE aisladas en hospitales chilenos distribuidos en una extensión geográfica superior a 2.800 km.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *aac(6′)-Ib-cr* among ESBL producing enterobacteria isolates from Chilean hospitals

A B S T R A C T

Introduction: The frequency of *aac(6′)-Ib-cr* gene in ESBL-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* is unknown, in Chile.

Methodology: The *aac(6′)-Ib* and *aac(6′)-Ib-cr* genes were investigated using polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), and sequencing, in strains isolated from 10 Chilean hospitals between 2008–2009.

Results: The *aac(6′)-Ib-cr* gene was detected in 54% of *K. pneumoniae* and 74% of *E. coli* strains. The CIM₅₀ of CIP was higher among strains harboring *aac(6′)-Ib-cr*, 8 times higher in *K. pneumoniae* and 4 times higher in *E. coli*. Moreover, both *aac(6′)-Ib* and *aac(6′)-Ib-cr* were simultaneously found in 13 *K. pneumoniae* and 3 *E. coli* isolates.

Conclusion: This is the first report of *aac(6′)-Ib-cr* in ESBL-producing strains of *K. pneumoniae* and *E. coli* isolated from in-patients in Chilean hospitals located along an area of more than 2,800 Km.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

aac(6′)-Ib

aac(6′)-Ib-cr

Klebsiella pneumoniae

Escherichia coli

Plasmid-Mediated Quinolone Resistance

(PMQR)

Quinolone

Chile

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: hbello@udec.cl (H. Bello-Toledo).

Introducción

Se han descrito diversos determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas (DPRQ) que disminuyen la susceptibilidad a estos compuestos, facilitando la selección de mutantes resistentes de alto nivel¹. Entre los DPRQ descritos en enterobacterias a nivel mundial y en Latinoamérica¹⁻³ se encuentran: las proteínas Qnr (QnrA, S, B, C y D), las bombas de expulsión QepA y OqxAB y la variante de la aminoglucosido acetil transferasa AAC(6')-Ib, denominada AAC(6')-Ib-cr, capaz de acetilar ciprofloxacino y norfloxacino, además de amikacina, tobramicina y kanamicina. Considerando que en Chile no existe información de la presencia de AAC(6')-Ib-cr en cepas hospitalarias de enterobacterias, el objetivo de este trabajo fue determinar su frecuencia en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de BLEE.

Metodología

Cepas bacterianas. Se incluyeron 100 cepas de *E. coli* y 100 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ácido nalidíxico y/o resistentes o con susceptibilidad intermedia a ciprofloxacino aisladas durante los años 2008-2009 en 10 hospitales de Chile. Todas correspondieron a aislados únicos de muestras clínicas de pacientes con al menos 48 h de hospitalización. Los hospitales están localizados en las ciudades de Iquique, Antofagasta, Valparaíso, Santiago, Concepción, Temuco y Puerto Montt.

Determinación del nivel de resistencia a quinolonas. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LVX) y ácido nalidíxico (NAL) mediante el método de dilución seriada en agar, utilizando los puntos de corte del CLSI (2010)⁴. Las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fueron incluidas como cepas controles.

Detección de aac(6')-Ib-cr. Se amplificó por PCR un fragmento intragénico del gen *aac(6')-Ib* (482 pb), de acuerdo a las condiciones descritas previamente⁵. Para identificar el gen *aac(6')-Ib-cr* se realizó RFLP con la enzima *BseGI* [*BtsCI*] (Fermentas Life Sciences, EE.UU.), ya que en esta variante se genera un sitio de restricción para esta enzima, obteniéndose dos productos de 272 y 210 pb.

Secuenciación de productos de amplificación. Los amplicones fueron secuenciados en MacroGen Corp (Rockville, EE.UU.).

Análisis estadístico. Para buscar correlaciones estadísticamente significativas entre la presencia del gen *aac(6')-Ib-cr* y la CIM a ciprofloxacino se utilizó el test exacto de Fisher.

Resultados

La prevalencia del gen *aac(6')-Ib-cr* fue del 54% en las cepas de *K. pneumoniae* y del 74% en *E. coli*. Cabe destacar que del total de cepas en las cuales fue detectado *aac(6')-Ib*, el gen *aac(6')-Ib-cr* correspondió al 66,7% (54/81) en las cepas de *K. pneumoniae* y al 94,9% (74/78) en las cepas de *E. coli*. Estos resultados fueron confirmados por secuenciación y análisis de los amplicones respectivos, detectando las sustituciones Asp179Tyr y Trp102Arg,

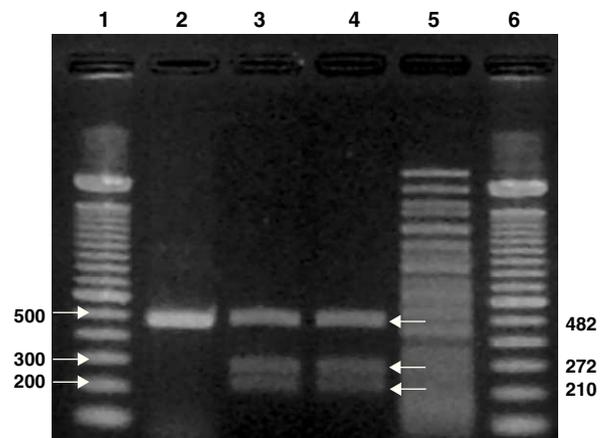


Figura 1. RFLP del gen *aac(6')-Ib-cr* con la enzima *BseGI* en cepas de *E. coli*. 1: ADN ladder 100 pb; 2: EC-322 (solo *aac(6')-Ib-cr*)/*BseGI*; 3: EC-259 (*aac(6')-Ib-cr* + *aac(6')-Ib*)/*BseGI*; 4: EC-260 (*aac(6')-Ib-cr* + *aac(6')-Ib*)/*BseGI*; 5: ADN fago λ /BseGI; 6: ADN ladder 100 pb. Tamaño en pb.

características de esta variante enzimática. Por otra parte, el gen *aac(6')-Ib-cr* fue detectado en cepas de todos los hospitales de diferentes ciudades a lo largo de Chile. Además, en 13 cepas de *K. pneumoniae* y 3 cepas de *E. coli* se obtuvo una digestión incompleta (patrón de restricción con 3 bandas), evidenciando la presencia simultánea de *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib-cr* (fig. 1).

En la tabla 1 se presenta la CIM₅₀ de NAL, CIP y LVX en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* con y sin el gen *aac(6')-Ib-cr*. Se observa que tanto en cepas de *E. coli* como en cepas de *K. pneumoniae*, que presentaron la variante AAC(6')-Ib-cr, los valores de CIM₅₀ de CIP fueron mayores, comparados con los del grupo de cepas en las que *aac(6')-Ib-cr* estaba ausente, siendo 8 veces superior en *K. pneumoniae* y 4 en *E. coli*. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, con un valor de $p < 0,05$, tanto para *E. coli* como para *K. pneumoniae*.

Discusión

En Chile y otros países latinoamericanos ha aumentado el consumo de quinolonas, lo que ha favorecido la selección y la diseminación de cepas resistentes a estos compuestos⁶⁻⁸. Diversos estudios informan que cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE frecuentemente presentan un fenotipo de multiresistencia, que incluye quinolonas, en comparación a cepas no productoras de BLEE⁹. Es interesante la alta frecuencia de cepas chilenas con *aac(6')-Ib-cr*, especialmente en cepas de *E. coli*. Park et al.⁵ informan que en cepas aisladas entre 1999 y 2004, *E. coli* presentó mayor frecuencia de este DPRQ, señalando que existiría una distribución de especie, cuya razón se desconoce. Esto demuestra que *aac(6')-Ib-cr* ha estado presente durante un período de tiempo prolongado, a pesar de no ser detectado, permitiendo su amplia diseminación. Este mismo fenómeno

Tabla 1

Actividad de quinolonas sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con y sin el DPRQ *aac(6')-Ib-cr* aisladas en hospitales de Chile, 2008-2009

Especie bacteriana	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Ácido nalidíxico			Ciprofloxacino			Levofloxacino		
		Rango	CIM ₅₀	%R	Rango	CIM ₅₀ *	%R	Rango	CIM ₅₀	%R
<i>K. pneumoniae</i>	+(54) ^a	2-> 1.024	1.024	87	< 0,0625-> 64	64	70,4	< 0,0625-128	16	72,2
	-(46)	2-> 1.024	64	52,2	< 0,0625-> 64	8	52,2	< 0,0625-128	16	52,2
<i>E. coli</i>	+(74)	2-> 1.024	1.024	96	< 0,0625-> 128	> 128	96	< 0,0625-64	16	94
	-(26)	2-> 1.024	1.024	65,4	< 0,0625-> 128	32	57,7	< 0,0625-64	8	53,8

CIM: concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g/ml}$); % R: porcentaje de cepas resistentes.

^a Entre paréntesis, número de cepas ensayadas.

* $p < 0,05$ entre CIM de CIP en cepas con sin DPRQ *aac(6')-Ib-cr*.

podría ocurrir en cepas chilenas, ya que Díaz et al.¹⁰, trabajando con cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas entre 1997 y 2003, informó una alta frecuencia del gen *aac(6')-Ib* (69%), pero no analizó si corresponden a *aac(6')-Ib-cr*. Es posible que este DPRQ hubiese estado presente en esos años y el aumento en el uso de quinolonas en los últimos años en Chile¹⁰ podría haber generado una rápida selección de cepas con esta variante, lo que explicaría la elevada prevalencia de *aac(6')-Ib-cr* en *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas casi una década después. Por otra parte, *aac(6')-Ib-cr* se detectó en cepas de todas las ciudades desde donde provenían las muestras, abarcando una extensión de 2.869 km. Esta extensa diseminación estaría favorecida por la localización de estos DPRQ en elementos genéticos móviles^{1,3}, que a su vez portan otros determinantes de resistencia, en especial relacionados con genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-24} y *bla*_{SHV-12}^{1,3}. Este estudio evidenció una relación entre *aac(6')-Ib-cr* y *bla*_{CTX-M} del grupo 2 en *K. pneumoniae* y *bla*_{CTX-M} del grupo 1 en *E. coli*. Además, se destaca el hallazgo de cepas que portan *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib-cr*, simultáneamente. Los resultados permiten enfatizar que la selección de cepas que portan una combinación de genes de resistencia en los hospitales chilenos constituye una seria amenaza desde el punto de vista clínico, haciendo necesario mantener una activa vigilancia que estime la prevalencia de estos mecanismos de resistencia, como también evitar su selección y diseminación.

Financiación

Este estudio fue realizado con financiamiento otorgado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción (DIUC 207.036.032-1.0 2007-7881-40).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de los microbiólogos de los centros hospitalarios de Iquique (O. López, P. Choque), Antofagasta (C. Mardones y C. Rojas), Valparaíso (G. Peralta), Santiago (M. Cifuentes, B. Barraza, M. Vechiola, S. Bravo, A. Sakurada, J. C. Valenzuela, J. C. Román y C. Gárate), Concepción (N. Enríquez, H. Chabauty, M. Sandoval y M. Pérez), Temuco (A. Anderson, V. Illesca y P. Reydet) y Puerto Montt (M. L. Rioseco y A. Mella).

Bibliografía

- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother.* 2011;17:149-82.
- Cordeiro NF, Robino L, Medina J, Seija V, Bado I, García V, et al. Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:806-7.
- Quiroga MP, Andrés P, Petroni A, Soler-Bistue AJ, Guerriero L, Vargas LJ, et al. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with *ISCR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4466-70.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20 (ISBN 1-56238-716-2). Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
- Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3953-5.
- Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American Countries, 1997-2007. *Rev Panam Salud Publica.* 2010;27:219-25.
- Guzman-Blanco M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. *Infect Dis Clin North Am.* 2000;14:67-81.
- Silva F, Cifuentes M, Pinto ME, en representación del Grupo Colaborativo de Resistencia Antimicrobiana. Resultados de la vigilancia de susceptibilidad antimicrobiana en Chile: Consolidando una red. *Rev Chilena Infectol.* 2011;28:19-27.
- Martínez-Martínez L. Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25 Suppl 2:38-47.
- Díaz P, Bello H, Domínguez M, Tralal N, Mella S, Zemelman R, et al. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Med Chil.* 2004;132:1173-8.