



## ORIGINAL BREVE

### Detección de un brote epidémico por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa

A. Jimeno<sup>a,\*</sup>, M.M. Alcalde<sup>a</sup> y A. Blázquez<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sección de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Hospital Santa María del Rosell, Cartagena, Murcia, España

<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Santa María del Rosell, Cartagena, Murcia, España

Recibido el 8 de julio de 2010; aceptado el 24 de diciembre de 2010

#### PALABRAS CLAVE

*Pseudomonas aeruginosa*;  
Metallo-beta-lactamasas;  
Carbapenemas;  
Brote;  
Infección nosocomial

#### Resumen

**Objetivo:** Describir un brote de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa (MBL).

**Material y métodos:** En mayo de 2009, se detectaron seis aislamientos consecutivos de *P. aeruginosa* con un mismo antibiotipo (perfil de resistencia a imipenem y cefalosporinas manteniendo sensibilidad a aztreonam) que indicaban la producción de carbapenemas. Se investigó la posibilidad de su origen clonal y la presencia de MBL mediante caracterización fenotípica y genotípica de los seis aislados y se estudió si estos codificaban la MBL tipo VIM. Secundariamente, se analizaron de forma retrospectiva todos los aislamientos de las mismas características de todo el año 2009 con objeto de establecer la posibilidad de infección endémica.

**Resultados:** Se encontraron dos clones según el perfil en electroforesis de campo pulsado, el más frecuente representado por 4 aislados. Todas procedían de la unidad de cuidados intensivos. El 100% de las cepas del brote se consideran multirresistentes. Se confirmó mediante PCR la presencia de genes del tipo VIM relacionadas con la producción de MBL en el 100% de los aislados correspondientes al pulsotipo 1.

**Conclusiones:** Se detecta la existencia de un brote de *P. aeruginosa* productora de MBL. Se plantea un evidente problema terapéutico y de control de la infección nosocomial. Se debe extremar las medidas de aislamiento y realizar controles sistemáticos de presencia de MBL, dada la prevalencia elevada en nuestro entorno.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

#### KEYWORDS

*Pseudomonas aeruginosa*;  
Metallo-beta-lactamase;  
Carbapenemase;

Epidemic outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* carbepenem-resistant producing metallo-beta-lactamase

#### Abstract

**Objective:** To describe the nosocomial outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase (MBL) in Cartagena (Murcia, Spain).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [doc.jimeno@hotmail.com](mailto:doc.jimeno@hotmail.com) (A. Jimeno).

## Outbreak; Nosocomial infection

**Material and methods:** In May 2009, six consecutive isolations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* were detected. These were characterized by their profile of resistance to imipenem and cephalosporins and sensibility to aztreonam, this suggesting the production of carbapenemas. The isolations were screened for MBL and a PCR for the detection of the VIM gene was performed. Secondary, all of the isolations having the same characteristics in the year 2009 were analyzed retrospectively in order to establish the possibility of an endemic infection.

**Results:** The molecular typing of the isolates revealed two clones in Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), the most frequent (Type 1) being represented by 4 isolates. All of them came from patients who were in the Intensive Care Unit. All (100%) of the isolates of the outbreak were considered to be multiresistant. PCR confirmed the presence of the VIM gene related with the production of MBL in 100% of the isolates corresponding to pulsotype 1.

**Conclusions:** We detected the existence of an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase. An evident therapeutic problem as well as a problem of nosocomial infection was considered. The isolation means should be maximized and routine controls performed for the presence of MBL given its elevated prevalence in our setting.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo, aerobio estricto, oxidasa positivo y no fermentador. Causa infecciones graves en pacientes en condiciones de inmunodepresión, principalmente en el ámbito hospitalario, en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y en unidades de críticos oncohematológicos, y se asocian a una elevada morbilidad<sup>1</sup>. *P. aeruginosa* es resistente de forma constitutiva a un gran número de antibióticos, además tiene una elevada capacidad para adquirir resistencias de tipo cromosómico bajo presión antibiótica y de incorporar determinantes de resistencia móviles por transmisión horizontal. La producción de carbapenemas que inactivan muchos antibióticos betalactámicos, excepto al aztreonam, constituye un gran problema en el manejo de las infecciones por este microorganismo. Es habitual que la resistencia a carbapenémicos esté relacionada con hiperproducción de la betalactamasa AmpC, con la presencia de bombas de expulsión activa tipo MexAB-OprM o con la inactivación de las porinas OprD<sup>2</sup>. De las carbapenemas transferibles, de las que existen tres grupos (A, B y D), destacan en nuestro medio las de clase B de Ambler o metalo-beta-lactamasas (MBL) por su frecuencia y distribución universal. Las MBL son enzimas dependientes de cationes metálicos como el cinc y caracterizadas porque se pueden inhibir con quelantes metálicos como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Se agrupan en ocho grupos moleculares, los más importantes: IMP, VIM, GIM y SMP. Las formas VIM son las más frecuentes en Europa y, de ellas, la VIM-2 es la más prevalente<sup>2</sup>. En nuestro hospital, la resistencia a imipenem (IMP) es relativamente frecuente, pero hasta el momento no se había podido determinar la producción de carbapenemas como su causa. El objetivo del estudio fue describir la presencia del primer brote epidémico nosocomial de *P. aeruginosa* productora de MBL en nuestro centro.

## Material y métodos

Durante un periodo de 2 semanas comprendido entre el 11 y el 25 de mayo de 2009, se detectaron 6 aislamientos

consecutivos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y cefalosporinas. Se procedió al análisis epidemiológico descriptivo de los casos y la caracterización fenotípica y genotípica de los aislados con el fin de establecer una posible relación clonal entre ellos.

## Estudio epidemiológico

Nuestro centro es un hospital general de 400 camas, que es responsable de la atención de aproximadamente 280.000 habitantes. Se recogieron retrospectivamente durante el año 2009 los datos pertenecientes a los pacientes con aislamientos positivos a *P. aeruginosa* resistente a IMP. Las variables recogidas fueron: edad, sexo, servicio de hospitalización en el momento del aislamiento y tipo de muestra, perfil de resistencias y mortalidad.

Se consideran como servicios de procedencia: UCI, hematólogía, servicios quirúrgicos y demás servicios médicos.

## Estudio microbiológico

Consistió en el análisis de los aislados clínicos (uno por paciente) mediante diversos estudio. Se consideraron como posibles candidatos a la producción de carbapenemas los aislados que fueron resistentes (R) a IMP o meropenem (MRP) con una concentración inhibitoria mínima (CIM)  $\geq 8$  mg/l y que además eran I/R a ceftazidima, cefepime o piperacilina-tazobactam y sensibles a aztreonam. La identificación y los estudios de sensibilidad se realizaron mediante el sistema automatizado Microscan WalkAway plus® (Siemens). La sensibilidad a IMP fue comprobada por el método de difusión en disco de acuerdo con los protocolos de la CLSI<sup>3</sup>. Para la detección fenotípica de carbapenemas, utilizamos la técnica del Etest® de IMP (IP)/IMP + EDTA (IPI) en placa de Müller Hilton (bioMérieux), con una dilución equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland. Se incubaron las placas 24 h a 37 °C y se consideró que había presencia de metalo-beta-lactamasa si la CIM IP/IPI era  $> 8$ .

Se definió como *P. aeruginosa* multirresistente<sup>4</sup> si mostraba disminución de la sensibilidad a más de uno de los siguientes familias de fármacos: cefalospori-

## ¿Qué sabemos?

*Pseudomonas aeruginosa* es resistente de forma constitutiva a un gran número de antibióticos y además tiene una elevada capacidad para adquirir resistencias. La producción de carbapenemasas que inactivan a muchos antibióticos betalactámicos, excepto al aztreonam, constituye un gran problema en el manejo de las infecciones por este microorganismo. La resistencia a imipenem es relativamente frecuente pero resulta excepcional la producción de carbapenemasas como responsable de la misma.

## ¿Qué aporta este artículo?

Se describe un brote epidémico de transmisión nosocomial de infección por *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalobetalactamasa. Esta circunstancia cada vez es más frecuente y debe ser sospechada en presencia de antibiogramas con resistencia a Imipenem y a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, con sensibilidad conservada a aztreonam. Ante su hallazgo debieran tomarse medidas de control y aislamiento para evitar brotes epidémicos intrahospitalarios.

Los editores

nas antipseudomónicas, carbapenémicos, combinación de betalactámico + inhibidor de las betalactamasas, fluoroquinolonas y/o aminoglucósidos.

## Identificación genotípica

Se remitieron seis de las cepas aisladas en mayo de 2009 al Centro Nacional de Microbiología-Instituto de Salud Carlos III, de Majadahonda (Madrid), para el estudio de la relación clonal de los aislados. Se realizó serotipificación y electroforesis de campo pulsado en gel (en inglés, PFGE) para las cepas remitidas. A los clones obtenidos, se les realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos de los genes que codifican las principales familias de carbapenemasas (VIM, IMP).

## Resultados

Durante 2009, se aislaron en el servicio de microbiología 538 *P. aeruginosa* en muestras clínicas procedentes del medio ambulatorio y hospitalario, de las que 94 resultaron resistentes a IMP (17,5%). Este porcentaje es superponible a los datos obtenidos en el año previo, del 18,6%.

## Análisis del brote

Entre el 11 y el 25 de mayo de 2009, se detectaron seis cepas de *P. aeruginosa* resistentes a IMP y a betalactámicos.

La distribución por sexos fue equitativa, 3 varones y 3 mujeres (50%). Se dispuso de un aislamiento por cada paciente. Todos los aislamientos tenían procedencia nosocomial y todos ellos presentaban infección activa desde el punto de vista clínico (no se identificaron colonizaciones). La distribución por plantas fue la siguiente: un paciente de UCI (16,6%), uno de hematología (16,6%) y 4 en plantas independientes de medicina interna (66,4%). De los pacientes en planta de hospitalización en el momento del aislamiento, la mitad habían tenido estancia en UCI en los días previos. El 50% fallecieron en el contexto del proceso infeccioso.

Los aislamientos correspondían a muestras procedentes de: esputo (3 pacientes), hemocultivos por bacteriemia asociada a catéter central (2 casos) y un exudado de herida (1 ocasión). Las cepas sensibles a piperacilina-tazobactam (3 cepas), también lo fueron a aztreonam; la mitad restante fue panresistente. Todas las cepas mostraron sensibilidad a colistina.

El estudio fenotípico y genotípico obtuvo los siguientes datos: la serotipia las agrupó en tres serogrupos: 0:12 (4 cepas), 0:1 (1 caso) y una cepa no aglutinable (1 ocasión). En la electroforesis de campo pulsado (PFGE) se obtuvieron dos pulsotipos, de las que 4 cepas pertenecían al tipo 1, todas con idéntico serotipo, constituyendo el brote propiamente dicho. Las características de los pacientes y microbiológicas de las cepas pertenecientes al brote se resumen en la tabla 1. A los dos tipos de clones (pulsotipos) se les realizó PCR para genes que codifican las principales familias de carbapenemasas, demostrándose la presencia de VIM en ambos: 5 de las 6 cepas fueron positivas para metalo-beta-lactamasa tipo VIM.

Tabla 1 Características de las cepas aisladas en mayo de 2009

Cepa/edad/sexo/muerte	Estancia previa en UCI	Planta	Tipo de muestra	Serotipo	Perfil de PFGE	Detección fenotípica de MBL	PCR carbapenemasa
C1/25/V/Sí	+	Hematología	HemoC	0:12	1	+	VIM
C2/67/V/Sí	+	UCI	HemoC	0:12	1	- (FN)	VIM
C3/78/M/No	+	MI	Esputo	0:12	1	+	VIM
C4/47M/No	+	MI	Esputo	0:12	1	+	VIM
C5/80/V/No	-	MI	Herida	No aglutinable	2	+	VIM

FN: falso negativo en Etest® MBL; MBL: metalo-beta-lactamasa; MI: medicina interna; PFGE: electroforesis de campo pulsado en gel; UCI: unidad de cuidados intensivos.

## Discusión

En los últimos años parece evidenciarse un aumento progresivo de la tasa de resistencias a los antimicrobianos de *P. aeruginosa*<sup>1,5</sup>. De 1998 a 2003, se ha producido un incremento significativo en la resistencia a imipenem del 14 al 18%<sup>5</sup>. Los datos del citado estudio multicéntrico<sup>5</sup> para el área geográfica que comprende Valencia, Murcia y Baleares respecto a resistencia a IMP son del 17%, lo que es completamente superponible a los datos de nuestra revisión para el año 2009. Asimismo la mitad de las cepas aisladas en este estudio presentaban antibiogramas compatibles con multirresistencia, planteando un importante reto terapéutico a los clínicos responsables de la asistencia de estos enfermos. Piperacilina-tazobactam, aztreonam y colistina son los agentes que conservan mayor utilidad en estas infecciones nosocomiales en nuestro entorno.

*P. aeruginosa* puede adquirir múltiples mecanismos de resistencia. Se debe sospechar la producción de carbapenemas ante un perfil con resistencia a IMP/MRP y a cefalosporinas antipseudomónicas con sensibilidad a aztreonam. Determinar la resistencia a carbapenémicos por los métodos de laboratorio habituales es sencillo. La dificultad estriba en conocer el mecanismo último y si la resistencia procede de la producción de MBL, cuya importancia radica en que se codifican en genes que se encuentran en elementos móviles transmisibles, como plásmidos y trasposones. Las técnicas fenotípicas existentes para la determinación de carbapenemas (basadas en la capacidad de inhibición en presencia de EDTA) no son sensibles al cien por cien. Actualmente, la única manera de determinar la presencia de MBL es con estudio molecular<sup>6</sup>. En nuestro hospital, hasta la identificación del brote, no se disponía de técnicas fenotípicas para MBL. Desde entonces ha resultado posible implementar la detección de cepas de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemas tipo MBL, lo que ha contribuido a la vigilancia y el control efectivos de la infección nosocomial.

La presencia de cepas productoras de carbapenemas en nuestro país es habitualmente baja. La detección por primera vez de una carbapenemasa en España fue en el año 2002<sup>7</sup>. Son cada vez más frecuentes las comunicaciones relativas a brotes por cepas productoras de estos enzimas en diferentes ciudades españolas<sup>8-10</sup>. El primer brote epidémico por una cepa de *P. aeruginosa* productora de MBL tipo VIM-2 en España fue en Barcelona en 2007<sup>10</sup>. Con base en los datos presentados, podemos concluir que 5 de las 6 cepas estudiadas en este trabajo eran portadoras de genes tipo VIM para MBL, correspondiendo a 2 clones diferentes por PFGE, lo que representa el 14,7% del total de cepas resistentes en nuestro hospital. Cuatro de estas cepas se aislaron en pacientes que habían permanecido en la UCI, constituyendo un brote epidémico de transmisión nosocomial. Si nos refiriésemos a la totalidad de cepas con el mismo perfil de resistencia aisladas en el hospital en 2009 (datos no referidos), presumiblemente productoras de MBL por el mismo mecanismo, este porcentaje ascendería a casi la mitad (48,7%) de las cepas resistentes. Este altísimo porcentaje estaría en relación no sólo con la incidencia del brote epidémico analizado, sino también con la presencia de cepas multirresistentes mantenida durante meses, lo que indica una infección endémica. No disponemos de recursos

para la genotipificación de todas las cepas, y así establecer la relación clonal entre las distintas cepas aisladas en 2009.

En conclusión: a) lo observado en este estudio con respecto a cepas de *P. aeruginosa* con resistencia a IMP y cepas multirresistentes es acorde con los resultados obtenidos en los años previos en toda España; b) la aparición de cepas multirresistentes plantea un problema terapéutico no sólo en el entorno del paciente crítico (UCI y oncohematológico), sino también en los servicios médicos, especialmente en la plantas de medicina interna; c) cada vez es más frecuente la detección de cepas de *P. aeruginosa* resistentes por adquisición de carbapenemas, lo que supone un reto terapéutico y un evidente problema de ecología hospitalaria por la capacidad de estos microorganismos de transferir información a otras cepas de *P. aeruginosa* y otras enterobacterias. El mecanismo más frecuente en nuestro medio es la producción de MBL tipo VIM; d) debemos sospechar la presencia de carbapenemas en presencia de un patrón de antibiograma que lo indique (resistente a IMP y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, con preservación de la sensibilidad a aztreonam) y establecer las medidas de control y aislamiento necesarias para evitar su dispersión en otros enfermos, y e) es posible que en nuestros hospitales nos encontremos ante problemas de infecciones hospitalarias endémicas por *P. aeruginosa* productoras de MBL.

## Bibliografía

1. Bouza E, García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Díaz MS, Sanchez Romero I, et al., Grupo Español para el Estudio de *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa*: Estudio multicéntrico en 136 hospitales españoles. Rev Esp Quimioter. 2003;16:41–52.
2. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemas en especies del género *Pseudomonas*. Enferm Infect Microbiol Clin. 2010;28Supl1:19–28.
3. Wilker MA. M07-A8: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard —eighth edition. CLSI; 2009.
4. Paterson DL. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. CID. 2006;43 Suppl 2:43–8.
5. Sánchez-Romero I, Cercenado E, Cuevas O, García-Escribano N, García-Martínez J, Bouza E, Grupo Español para el Estudio de *Pseudomonas aeruginosa*. Evolución de la resistencia a los antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* en España: segundo estudio nacional (2003). Rev Esp Quimioterap. 2007;20:222–9.
6. Cercenado E, Cantón R. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. 2007. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; Infecciosas y Microbiología Clínica. 2.a ed. [monografía en Internet]. Madrid: SEIMC; 2007. Disponible en: <http://www.seimc.org/documents/protocolos/microbiologia/>.
7. Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of carbapene-hydrolyzin beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:932–3.
8. Rodríguez MC, Ruiz del Castillo B, Rodríguez-Mirones C, Romo M, Monteagudo I, Martínez-Martínez L. Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de la metalobetalactamasa VIM-2 en Cantabria. España Enferm Infect Microbiol Clin. 2010;28:99–103.

9. Juan C, Gutierrez O, Alberti S, Garau M, Perez JL, Bou G, et al. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM 13 and its integron –borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3589–96.
10. Peña C, Suarez C, Tubau F, Gutierrez O, Domínguez A. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo-beta-lactamase VIM2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1026–9.