

El alto nivel de resistencia a los carbapenemes en *Acinetobacter baumannii* es un problema multifactorial

Germán Bou

Laboratory of Viral Immunology. Division of Infectious Diseases. Mayo Clinic. Rochester. USA.

Miembros del género *Acinetobacter* son cocobacilos gramnegativos, aerobios y no fermentadores que son ubicuos en la naturaleza y se encuentran formando parte de la flora normal humana. Sin embargo, aunque *Acinetobacter* es un patógeno de relativa baja virulencia también es conocido su papel como patógeno nosocomial oportunista productor de infecciones del tracto urinario y respiratorio, así como bacteriemias y meningitis secundaria, particularmente en pacientes inmunocomprometidos y en aquellos admitidos en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI)¹.

Durante la pasada década, se han descrito casos de infecciones adquiridas en hospitales implicando a cepas de *A. baumannii* multirresistentes, a menudo asociado con contaminación de equipo hospitalario o a través de manos colonizadas del personal de cuidados intensivos².

El tratamiento antimicrobiano de estas infecciones puede estar comprometido por el patrón de multirresistencia a los betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Atendiendo a los betalactámicos, diferentes mecanismos están implicados en la resistencia de las cepas clínicas de *A. baumannii*, aunque como en otros bacilos gramnegativos, el principal mecanismo de resistencia es la producción de betalactamasas codificadas cromosómicamente o por plásmidos³. Además, la baja permeabilidad de la membrana externa de *A. baumannii* resultante bien del pequeño tamaño del poro así como de la limitada producción de porinas ha sido implicado en la resistencia a los betalactámicos. En los pasados años, cepas de *A. baumannii* resistentes a los carbapenemes han sido descritos a lo largo del mundo, y la pérdida de porinas, proteínas fijadoras de penicilina (PBP) con afinidad reducida, así como diferentes betalactamasas de clase B y D han sido implicadas en la resistencia a los carbapenemes en cepas clínicas de *A. baumannii*⁴.

Desde febrero a noviembre de 1997, cepas de *A. baumannii* con alto nivel de resistencia al imipenem y mero-

penem (concentración mínima inhibitoria [CMI]) 128-256 µg/ml fueron aisladas de 29 pacientes, 23 de ellos hospitalizados en 5 diferentes UCI del hospital Ramón y Cajal. Medidas de control de la infección y el uso de guantes y batas en el manejo de los pacientes infectados y/o colonizados fueron rápidamente implementadas, así como el aislamiento de los pacientes infectados y/o colonizados. De igual manera el uso de imipenem y meropenem, particularmente en las áreas implicadas en el brote fue restringido.

Se tomó una cepa de *A. baumannii* de cada uno de los 29 pacientes y todas ellas se tiparon por métodos moleculares, en concreto electroforesis de campo pulsado (PFGE) y REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindrom Sequence-PCR). Dichos experimentos mostraron que el brote nosocomial estaba causado por una única cepa epidémica⁵. Debido al nivel de resistencia al imipenem y meropenem que estas cepas presentaban se llamaron ABRIM (*A. baumannii* resistente al imipenem y meropenem).

Hidrólisis de imipenem y meropenem fue detectada por métodos bioquímicos con un extracto sonicado de la cepa *A. baumannii* RYC 52763/97 (primera cepa ABRIM aislada en el brote nosocomial). Además una prueba de Masuda positiva para imipenem fue obtenida con el mismo extracto. Este resultado sugería la presencia de una enzima que hidrolizaba los carbapenemes en la cepa epidémica ABRIM. A la vez, la adición de EDTA, compuesto quelante de cationes bivalentes no afectaba la hidrólisis de imipenem, sugiriendo así la ausencia de una betalactamasa de clase B, enzimas que como ya se conoce necesitan cationes Zn²⁺ para su actividad⁶.

La técnica de isoelectroenfoque mostró que el extracto sonicado de la cepa de *A. baumannii* RYC 52763/97 contenía tres bandas de actividad betalactamasa, una con un punto isoelectro (pI) de 5,4, otra con un pI de 9,0, y una tercera con un pI de 9,4 que posiblemente corresponde a la betalactamasa de clase C constitutiva del genotipo *A. baumannii*.

Los altos niveles de resistencia a los carbapenemes en las cepas ABRIM hacían pensar en la existencia de una carbapenemasa con alta actividad hidrolítica sobre los carbapenemes. Por este motivo intentamos la clonación de cada uno de los genes codificantes de las betalactamasas presentes en la cepa ABRIM RYC 52763/97. Por experimentos de conjugación con esta cepa no se obtuvo la transferencia de ningún gen de resistencia a ningún antibiótico, aunque un gen codificando a una betalactamasa de tipo TEM-1 fue encontrado en un plásmido de aproximadamente 22 Kb y clonado mediante PCR con oligonucleótidos específicos. Obviamente, las CMI a los carbapenemes no se modificaron en una cepa control sensible de

Correspondencia: Dr G. Bou.
Laboratory of Viral Immunology.
Division of Infectious Diseases.
Mayo Clinic.
200 First Street SW.
Guggenheim 516.
Rochester. MN 55905
Correo electrónico: bou.german@mayo.edu

Manuscrito recibido el 25-9-2000; aceptado el 2-11-2000.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 336-338

Escherichia coli cuando se transformaba con el gen de la enzima TEM-1 clonado en el plásmido pBGS18.

Por otro lado, el ADN cosómico de la cepa ABRIM RYC 52763/97 fue digerido independientemente con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bgl* II como se ha descrito previamente^{7,8}. Los fragmentos resultantes fueron ligados en el plásmido pBGS 18 cortado con las mismas enzimas de restricción y los transformantes fueron seleccionados en placas de medio LB en presencia de los antibióticos selectores ampicilina y kanamicina.

Cuando el ADN cromosómico de la cepa ABRIM fue cortado con *Hind*III los transformantes obtenidos portaban un único fragmento de 2,2 Kb. Tras la secuenciación de nucleótidos de dicho fragmento el resultado reveló la presencia de un gen que presentaba homología con diferentes betalactamasas cromosómicas y plasmídicas de clase C. Este resultado indicaba que una betalactamasa AmpC en *A. baumannii* había sido clonada por primera vez. Cuando el gen AmpC se introducía por transformación en una cepa de *E. coli* sensible a todos los antibióticos, no se observaba modificación en las CMI a los carbapenemes, poniendo de manifiesto que dicha betalactamasa no estaba implicada en la resistencia a los carbapenemes en *A. baumannii*⁷.

Sin embargo, cuando el ADN cromosómico de la cepa ABRIM se cortó con *Bgl* II y se ligó al plásmido pBGS18 digerido con *Bam* HI se obtuvieron transformantes que contenían un fragmento de ADN de aproximadamente 4,2 Kb con otro gen de tipo betalactamasa. La secuenciación de nucleótidos puso de manifiesto en este caso que lo que se había clonado en el plásmido pBGS18 era una enzima de clase D tipo OXA (OXA-24) debido a la homología (hasta un 40% de identidad) con las previamente descritas betalactamasas OXA-10 y OXA-7. En este caso, las CMI de los carbapenemes de un *E. coli* sensible se elevaban hasta ocho veces por encima de su nivel normal cuando se le introducía el gen OXA-24 clonado en el plásmido pBGS18⁸.

Experimentos bioquímicos realizados con la semipurificada enzima OXA-24 mostraron hidrólisis de imipenem y meropenem. Además, una prueba de Masuda positiva fue también detectada con los carbapenemes y dicha betalactamasa. Habíamos por fin encontrado un gen que codificaba para una enzima con cierta capacidad inactivante sobre el imipenem y el meropenem.

Estos resultados correlacionaron bien con los datos de CMI obtenidos con las cepas de *E. coli* sensibles transformadas con el gen para la enzima OXA-24. Sin embargo, aunque los valores de CMI observados en la cepa de *E. coli* transformada con el gen OXA-24 se habían incrementado, dichos valores no explicaban los elevados valores de las CMI a los carbapenemes en la cepa ABRIM original. Por tanto, pensamos que otros mecanismos podrían estar implicados y por ello decidimos analizar posibles alteraciones en la permeabilidad de las cepas ABRIM. El análisis de las proteínas de membrana externa de la cepa resistente *A. baumannii* RYC 52763/97 y otra cepa sensible a los carbapenemes con cierta relación genética a la epidémica, mostró que en la cepa resistente se había producido una reducción en la expresión de dos proteínas de membrana externa con un tamaño de 22 y 33 Kda⁵. Dichas proteínas están implicadas en el paso de solutos y determinados compuestos que la bacteria nece-

sita para su normal crecimiento. A su vez, los antibióticos usan estas “ventanas” para introducirse y ejercer su acción. Por consiguiente, su expresión reducida dificulta el paso de los antibióticos al interior y produce una “resistencia” por parte del microorganismo al antibiótico.

Otro posible mecanismo de resistencia de las cepas ABRIM podría deberse a la presencia de bombas de extrusión o bombas de achique. En este sentido se conoce que la molécula reserpina es capaz de bloquear dichas bombas responsables de la expulsión del antibiótico una vez se ha introducido. Para analizar esta hipótesis, se hicieron experimentos de CMI a los carbapenemes con las cepas ABRIM en presencia y ausencia de reserpina. No se obtuvieron variaciones en los valores de dichas CMI cuando se añadió reserpina, pero sí se obtuvo una disminución en la CMI al meropenem en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* control con un bien definido mecanismo de bomba de achique. Por este motivo un posible mecanismo de esta índole fue descartado.

A modo de resumen, podemos por tanto concretar que aunque la modificación de las PBP no puede descartarse, la presencia de una betalactamasa de clase D (OXA-24) con capacidad de inactivación sobre los carbapenemes junto a la reducción en la expresión de dos proteínas de membrana externa de 22 y 33 Kda están implicados en la resistencia a los carbapenemes en la cepa ABRIM aislada en el brote hospitalario mencionado. Hasta el momento, aunque se han aislado algunas cepas de *A. baumannii* con altos niveles de resistencia a los carbapenemes (CMI de 128-256 µg/ml)^{9,10}, no ha sido posible asociar una betalactamasa a esos altos valores de CMI. Por tanto, es posible inferir de manera general que la alta resistencia a los carbapenemes en *A. baumannii* es un problema multifactorial donde diversos mecanismos/enzimas pueden estar asociados y convergen de una manera sinérgica en el resultado final, tal y como sucede en las cepas ABRIM estudiadas.

Por consiguiente, que los altos niveles de resistencia a los carbapenemes no se deben solamente a la presencia de betalactamasas, previene el uso de inhibidores de estas enzimas en el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos (con la excepción de sulbactam que suele tener una buena actividad intrínseca frente a *Acinetobacter*) y deja como única alternativa el uso de colistina y polimixina B, fármacos nefrotóxicos y neurotóxicos usados en la década de los 50¹¹.

La alta capacidad de supervivencia de este microorganismo en las superficies de los medios hospitalarios unido a su facilidad para aceptar material genético externo y a una posible alta tasa de mutación hace seleccionar cepas de *A. baumannii* con cada vez mayor capacidad de resistencia frente a diversas familias de antibióticos.

Por tanto, una correcta política de antibióticos junto a un buen seguimiento microbiológico y epidemiológico se debería imponer en todos los hospitales (especialmente en las UCI) con el fin de evitar la diseminación de este tipo de cepas multirresistentes.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud al Dr. Jesús Martínez-Beltrán por la lectura crítica de este manuscrito.

Bibliografía

1. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148-165.
2. Joly-Guillou ML, Brun-Buisson C. Epidemiology of *Acinetobacter* spp.: surveillance and management of outbreaks. En: Bergogne-Bérézin E, Joly-Guillou ML, Towner KJ, eds. *Acinetobacter: microbiology, epidemiology, infections, management*. New York: CRC Press, 1996; 71-100.
3. Joly-Guillou ML, Bergogne-Bérézin E, Philippon A. Distribution of β -lactamases and phenotypic analysis in clinical strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 597-604.
4. Amyes SGB, Young HK. Mechanism of antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Genetics of resistance. En: Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML, Towner KJ, eds. *Acinetobacter: microbiology, epidemiology, infections, management*. New York: CRC Press, 1996; 185-223.
5. Bou G, Cervero G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: High-level carbapenem resistance is due not solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (9): 3.299-3.305.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1.211-1.233.
7. Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing and analysis of the gene encoding an AmpC β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agent Chemother* 2000; 44: 428-432.
8. Bou G, Oliver A, Martínez Beltrán J. OXA-24, a novel class D β -Lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1.556-1.561.
9. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1.229-1.235.
10. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899-900.
11. Snavely SR, Hodges GR. The neurotoxicity of antibacterial agents. *Ann Intern Med* 1984; 101: 92-104.