

CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A POLIMIXINAS Y CARBAPENÉMICOS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS AISLADOS DEL AMBIENTE E INTRAHOSPITALARIOS DEL HOSPITAL CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE Y HOSPITAL EL CARMEN

Cristóbal Riveros Pastenes^{a*}

José Goitia Lillo^a

Marcos Hidalgo Hidalgo^a

^aEstudiante de Tecnología Médica, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 14 de octubre, 2022. Aceptado en versión corregida el 21 de diciembre, 2022.

RESUMEN

Introducción: Actualmente la capacidad de las enterobacterias para generar mecanismos de resistencia frente a antibióticos de última línea es un problema de salud mundial. **Objetivo:** El objetivo de este estudio fue identificar los genes asociados a resistencia antimicrobiana con respecto a carbapenemasas y polimixinas más comunes.

Metodología: Muestras provenientes del Hospital El Carmen, Hospital Clínico de la Universidad de Chile y muestras ambientales recolectadas entre los años 2019 y 2021. **Resultado:** De un total de 137 cepas estudiadas se logró confirmar mediante biología molecular que el 40% corresponden a cepas blaKPC, lo cual resultó concordante con los resultados de los test fenotípicos previamente obtenidos en los Servicios de Salud.

Discusión y Conclusión: En cuanto a la búsqueda de genes asociados a resistencia a polimixinas se identificaron 5 cepas pertenecientes al Hospital El Carmen que poseen bandas coherentes con mcr-1, 2, 3, 4 o 5.

Palabras clave: Carbapenemasas, Resistencia a colistín, Genes de resistencia.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos está definida como la capacidad de un organismo para tolerar diversos medicamentos. A lo largo de los años las distintas cepas bacterianas son capaces de generar múltiples mecanismos que les permiten sobrevivir en ambientes hostiles o en presencia de fármacos. El fenómeno es muy preocupante porque las infecciones por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad¹. Los agentes involucrados en Infecciones Asociadas a la Atención de Salud (IAAS), incluyen un amplio espectro y han presentado una constante evolución en los últimos 50 años², donde se incluye un aumento en la resistencia a antimicrobianos, destacando a los Bacilos Gram negativos como los agentes más comunes. Es por ello que encontrar y caracterizar las cepas capaces de generar resistencia hacia los tratamientos antibióticos más usados, como lo son los betalactámicos y los de última línea como las polimixinas, contribuye a la vigilancia de las bacterias potencialmente causantes de IAAS³.

METODOLOGÍA

Cepas ambientales

Para este cepario se realizaron antibiogramas a 26 cepas mediante el método Kirby-Bauer, en el cual se seleccionaron 5 antibióticos para identificar el nivel de resistencia de cada una de las bacterias. Los antibióticos seleccionados fueron ampicilina (Ap), cefazolina (Cz), Ciprofloxacino (Cip), Ceftazidima (Cza) e imipenem (Imi). Dichos antibiogramas se

utilizaron para realizar un screening de susceptibilidad con el fin de analizar o discriminar qué cepas pudieran ser productoras de carbapenemasas.

Susceptibilidad carbapenémicos Cepas Clínicas

En cuanto a las cepas correspondientes al Hospital El Carmen se utilizó como base la información obtenida del perfil de susceptibilidad realizado por dicho establecimiento, donde se utilizó como referencia el resultado obtenido de los test fenotípicos para detección de carbapenemasas (CarbaNP), implementados a cada una de las cepas para la posterior búsqueda de genes asociados a carbapenemasas.

A las cepas provenientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile se les realizó un screening de resistencia a carbapenémicos utilizando un medio cromogénico (CHROMagar™ mSuperCARBA™). Este procedimiento se realizó mediante el protocolo descrito por el fabricante, método que permitió descartar cepas que no fuesen resistentes a carbapenémicos y dar paso al estudio genotípico de las cepas con mayor probabilidad de portación de genes de resistencia.

Susceptibilidad polimixina Cepas Clínicas

En una primera instancia se realizaron pruebas fenotípicas para evaluar la resistencia a colistín en todas las cepas, para ello se utilizó el método Agar Spot-test colistin⁴. A aquellas cepas que resultaron ser resistentes, se les realizó un PCR convencional para la búsqueda y determinación de los genes mcr-1, 2, 3, 4 y 5.

Como control positivo se utilizó una cepa de *Proteus mirabilis* por su resistencia intrínseca a

*Correspondencia: crriverosp@udd.cl
2022, Revista Confluencia, 5(2), 42-45



colistín y como control negativo una *Escherichia coli* ATCC 25922.

PCR convencional para genes de interés

A las muestras seleccionadas mediante los métodos de screening se les realizaron pruebas moleculares correspondientes a PCR multiplex de punto final en búsqueda de genes asociados a carbapenemasas (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC* y *blaNDM*) y/o de resistencia a polimixinas (*mcr-1*, 2, 3, 4 y 5) dependiendo de sus resultados en los test fenotípicos utilizados, los resultados obtenidos en la electroforesis de los productos fue visualizado al utilizar bromuro de etidio como intercalante de ácidos nucleicos.

RESULTADO

Los resultados de las cepas ambientales arrojaron un 100% de susceptibilidad a carbapenémicos también evidenciando cepas sensibles a la mayoría de los fármacos utilizados. Por esta razón se descarta la opción de continuar con pruebas moleculares en búsqueda de los genes de carbapenemasas en estudio.

De las 80 cepas estudiadas provenientes del Hospital El Carmen el 71,4% de estas resultó ser positiva para *blaKPC*, 1,8% *blaNDM* y 23,8% correspondientes a *VIM* o *IMP* (Figura 1), teniendo una concordancia del 90% con los test fenotípicos para carbapenemasas realizados por el hospital.

Cabe destacar que 5 cepas poseían co-expresión de genes de carbapenemasas, es decir, amplificaron a más de un gen, siendo *KPC-VIM* la más destacada.

Tabla 1: Cantidad de cepas estudiadas en PCR clasificadas según el servicio de procedencia y los genes en estudio (n= 111 cepas).

Procedencia del agente infeccioso	Gen			
	KPC	NDM	IMP/VIM	No se detectó banda
Hospital Clínico Universidad de Chile	0	0	0	31
Hospital El Carmen	56	1	19	4
Total	56	1	19	35

Del total de cepas estudiadas para la búsqueda de genes *mcr-1*, 2, 3, 4 y 5 solamente 5 cepas obtuvieron resultados en PCR multiplex para la búsqueda de los genes mencionados. 3 de estas mostraron bandas a la altura del control para *mcr-1* (320 pb) y 2 muestras obtuvieron bandas a la altura de 1000 pb aproximadamente, resultado coherente con un posible *mcr-4*, sin embargo, al realizar un posterior PCR simplex con las mismas muestras para confirmar estos resultados las bandas que se observaron en primera instancia, no se lograron apreciar en el gel, dando como resultado final que el 100% de las cepas estudiadas resultó resistente en test fenotípicos que estuviesen mediados por mecanismos de resistencia distintos de los genes de interés (Figura 2).

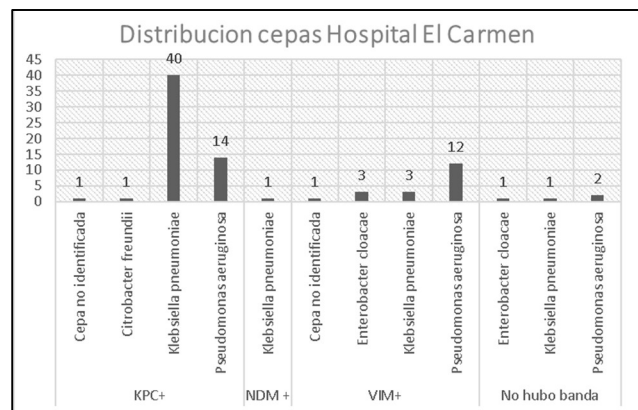


Figura 1. Distribución de los genes asociados a carbapenemasas en base al microorganismo aislado (n=80).

Las 31 cepas del Hospital Clínico de la Universidad de Chile son Carbapenemasas negativas, resultados obtenidos mediante test fenotípico CarbaNP, el cual fue realizado por el mismo servicio de salud. Al realizar el PCR se obtuvieron resultados con un 100% de concordancia, es decir, no hubo amplificación para ninguno de los genes de carbapenemasas (Tabla 1).

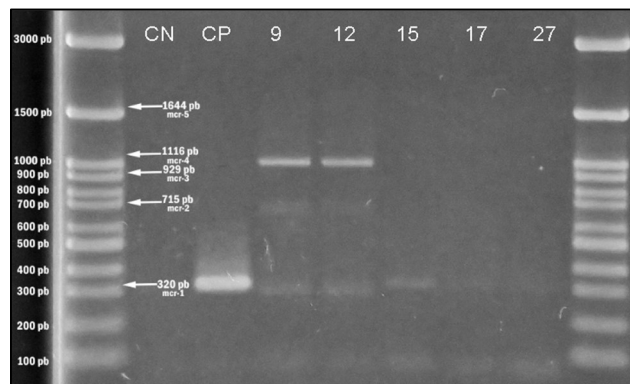


Figura 2. Muestras correspondientes al Hospital El Carmen, las cuales fueron analizadas en búsqueda de una confirmación de las bandas obtenidas en primera instancia, logrando apreciar las muestras 9, 12, 15, 17 y 27 identificando bandas tenues en *mcr-1*. Destacando las bandas obtenidas a la altura de 1000 pb apreciable en las muestras 9 y 12.

DISCUSIÓN

Tendencia de ciertas cepas hospitalarias a generar carbapenemasas y sus prevalencias individuales

Se observó que el gen más expresado corresponde a *KPC*, presente en 56 cepas, de las cuales el 71,4% perteneció a *Klebsiella pneumoniae*, siendo el género con mayor prevalencia para este gen. El segundo gen más expresado fue *VIM* con un



total de 19 cepas, y con 63,1% perteneciente al género *Pseudomonas aeruginosa*, estableciéndose como el mayor representante en este gen (Tabla 1).

Comparando estos datos con la bibliografía, se observa que hay una relación entre estos, y que los resultados son parte de lo ya esperado, puesto que, tanto *K. pneumoniae* como *P. aeruginosa*, pertenecen al grupo de bacterias más aisladas a nivel de IAAS en Chile³, y que los genes expresados concuerdan con los géneros bacterianos, y con la tendencia que tuvieron en el estudio².

Cabe destacar que se encontraron 5 cepas con co-expresión de 2 genes, dentro de las cuales destacó por sobre las otras la identificación de KPC y VIM en una misma cepa, las cepas identificadas con esta dualidad en la expresión de estos mecanismos de resistencia corresponden a 4 *Pseudomonas aeruginosa* y 1 *Klebsiella pneumoniae*, resultado acorde a los informes emitidos en latinoamérica asociados a la búsqueda de expresión de genes asociados a carbapenemasas. Este hallazgo podría ser evaluado posteriormente ya que la co-expresión de genes de este tipo resulta en la reducción del espectro de antibióticos o alternativas de tratamiento que pudiesen llegar a ser efectivas en estos casos⁵.

Confirmación de resultados obtenidos en test fenotípicos mediante biología molecular

Se han realizado diversos estudios evaluando la sensibilidad y especificidad de los test fenotípicos implementados en la detección de carbapenemasas. Según los resultados obtenidos en los distintos Servicios de Salud, mediante estos ensayos se realizó una comparación en base a biología molecular, donde el 88,75% de los resultados fueron concordantes con los test utilizados en el Hospital el Carmen. Por otro lado, de las cepas utilizadas provenientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile todas resultaron negativas para carbapenemasas en test CarbaNP, resultado 100% concordante con el PCR realizado a estas muestras ya que no se evidenció ninguna banda.

Comparación del método de elución de sensidiscos colistin con el método de agar Spot-test colistin

Si bien los dos métodos utilizados están estandarizados para la evaluación de susceptibilidad a colistin, durante el estudio se pudo evidenciar empíricamente las diferencias de aquellos dos. A partir de la elución de sensidiscos de colistin que se llevó a cabo, se logró concluir que la determinación de CIM se ve favorecida, ya que al trabajar con medios con distintas concentraciones de colistin, se permite evidenciar una CIM aproximada, la cual aporta en el tratamiento que se puede llevar a cabo con el paciente⁵. En cuanto a las desventajas del procedimiento, la elución por sensidiscos comprendió un trabajo de mayor complejidad a la hora de

realizarse, ya que, al estar trabajando con grandes cantidades de cepas, requiere una mayor cantidad de determinaciones, lo que aumentó la posibilidad de error al trabajar las muestras. Sumado a lo anterior, al estar manipulando una gran cantidad de tubos, se favorece la contaminación cruzada entre muestras.

Por otro lado, el uso del Agar Mueller Hinton - Colistin mediante spot-test, se reconoce como un método más sencillo de realizar, ya que solo corresponde a la siembra de las cepas a estudiar en el medio de cultivo, lo que limita las probabilidades de errores por parte de los operadores. Además, su lectura resulta mucho más sencilla, puesto que, solo se debió analizar si había crecimiento o no de las cepas.

Utilidad de medio cromogénico

Se determinó que las muestras provenientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, que lograran tener un crecimiento óptimo en este medio, serían estudiadas para la detección de genes mediante PCR, dando un total de 31 cepas con un crecimiento observable que posteriormente resultaron negativas a KPC, VIM, IMP o NDM. Estos resultados se compararon con los informados por el Hospital y hubo una concordancia entre ellos. El haber crecido en el Agar, pero no haber amplificado para los genes buscados, se asocia principalmente a la presencia de otros genes de resistencia a carbapenémicos o directamente a la inespecificidad del medio ya que este está dirigido al screening de resistencia a un solo fármaco (Imipenem), y no a la pesquisa de genes de carbapenemasas, por lo cual, cualquier mecanismo de resistencia contra carbapenémicos puede favorecer el crecimiento de microorganismos en este medio de cultivo. Es por ello que si bien este medio puede tener utilidad clínica, no se recomienda su uso en la búsqueda de genes, ya que incluso el mismo fabricante indica que la ausencia de crecimiento no excluye la presencia de bacterias resistentes a carbapenémicos.

CONCLUSIÓN

En este proyecto se logró determinar la relación entre las determinaciones de carbapenemasas mediante test fenotípicos y biología molecular. Así mismo se utilizaron distintas técnicas de screening para poder diseminar posibles microorganismos resistentes a múltiples antibióticos.

Según los resultados obtenidos en el estudio se logra concluir que las cepas de los recintos hospitalarios estudiados siguen la tendencia a nivel latinoamericano y a nivel global en cuanto a la adquisición de genes de resistencia, lo cual se comparó con las cepas ambientales, donde se esperaba escasa presencia de estos genes, ya que, no deberían tener exposición a estos antibióticos. Teniendo esto en cuenta, se puede confirmar que, en base al universo muestral, la hipótesis establecida es



realmente correcta. Por otro lado, la comparación realizada entre los distintos procedimientos para la detección de resistencia a colistin permitió identificar fortalezas y debilidades en base a su uso con muestras clínicas, determinando así que, si bien los dos métodos se encuentran en vigencia para su uso en cuanto a screening, el método Agar Spot-test consiste en una forma más simple y más rápida de estudiar varias muestras, en comparación al método de elución de sensidiscos, que si bien entrega mucha información relevante como puede ser una CIM teórica, es un método sujeto a múltiples puntos críticos, como lo pueden ser la contaminación y la preparación de las alícuotas en caldo, demostrando que no permite trabajar con una gran cantidad de muestras ya que aumenta la posibilidad de contaminaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud Chile. Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos [Internet]. Chile: MINSAL; 2017 [citado el 10 de agosto 2022]. Disponible en: <https://www.minsal.cl/plan-nacional-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos/>
2. Instituto de Salud Pública Chile. Vigilancia de resistencia a antimicrobianos en bacterias que pueden producir infecciones asociadas a la atención en salud [Internet]. Chile: ISPCH; 2015 [citado el 10 de agosto 2022]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/ResistenciaAntimicrobianosV2-06072015A_0.pdf
3. Ministerio de Salud Chile. Infecciones Intrahospitalarias [Internet]. Chile: MINSAL; 2015 [citado el 10 de agosto 2022]. Disponible en: https://www.minsal.cl/infecciones_intrahospitalarias/
4. Servicio Antimicrobianos Dr. Carlos G. Malbrán. Método de Screening "COLISTIN AGAR-SPOT" [Internet]. Argentina: INEI ANLIS; 2017 [citado el 10 de agosto 2022]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Agar-spot-COL-2017-version2-Agosto2017.pdf>
5. García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]. 2021 [citado el 10 de agosto 2022];19(2):197-213. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
6. Jofré M, Barrera B, Silva F, Berrocal L. Evaluation of sensi-disk elution for colistin susceptibility determination in multidrug resistant gramnegative bacilli. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2020 [citado el 10 de agosto 2022];37(1):87-8. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182020000100087&lng=en&nrm=iso&tl

