



Introducción

La colonización intestinal por enterobacterias productoras de carbapenemasas (EBPC) es un requisito para desarrollar infección, constituyendo el intestino un reservorio de bacterias resistentes (y sus genes). La diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EBPC) adquiridas, principalmente carbapenemasas tipo-KPC, reviste elevada importancia clínica en ambientes hospitalarios dado que estas enzimas inactivan la mayoría de los β -lactámicos incluidos carbapenemes, generándose serias limitaciones terapéuticas para los pacientes infectados.

Objetivo

Identificar los factores de riesgo asociados a colonización/infección por EBPC en pacientes internados en un nosocomio de tercer nivel y evaluar las causas de diseminación de genes codificantes de estas β -lactamasas

Materiales y Métodos

- I. **Población:** se incluyeron 93 pacientes incluyendo 10 colonizados y/o infectados por EBPC (casos índices, CI), y 83 contactos (CO), internados en un hospital público de la ciudad de Rosario, Argentina, durante 12/2014-11/2015.
- II. **Variables clínico-epidemiológicas de pacientes CI/CO:** sala, días de internación, tratamiento antimicrobiano previo, dispositivos invasivos, co-morbilidades, y evolución clínica.
- III. **Método de tamizaje de portación intestinal por EBPC:** se sembraron hisopados rectales de los contactos en medio selectivo/diferencial (CHROMagar KPC, bioMérieux).
- IV. **Identificación bacteriana:** se emplearon pruebas bioquímicas convencionales y/o automatizados (VITEK 2, bioMérieux).
- V. **Susceptibilidad antimicrobiana:** se determinó mediante Kirby-Bauer. La producción de serino-carbapenemas se confirmó mediante ensayos de sinergia (ES) que emplean carbapenemes y 3-aminoferulbórnicos, más cloxacilina en el caso de enterobacterias productoras de β -lactamasas cromosómicas tipo-Amp-C. La producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se detectó según normas CLSI (Δ halos de sensibilidad entre CAZ y CAZ más ácido clavulánico (CAC) \geq 2.5 mm).
- VI. **Identificación molecular del gen bla_{KPC}:** se efectuó PCR específica, y secuenciación (en algunos casos).
- VII. **Caracterización genotípica de los aislamientos:** se empleó PCR con oligonucleótidos degenerados utilizando cebador 19 (OD-PCR, Limansky y Viale, JMM 2002), y secuenciación de múltiples alelos (MLST; <http://bigsdb.web.pasteur.fr/index.html>).
- VIII. **Caracterización de las plataformas genéticas portadoras de bla_{KPC}:** la asociación de bla_{KPC} al transposón Tn4401a se efectuó por PCR y secuenciación. Para ello, se amplificaron dos regiones marcadoras del Tn4401a, A (1038 pb) y F (1141 pb). (Gómez et al, Clin Microbiol Infect., 2011; 17:1520-4). La localización plasmídica de bla_{KPC} se estudió mediante ensayos de conjugación (Marchiaro et al, J Infect Dev Ctries., 2010; 4:412-16).

Resultados

1. Prevalencia de colonización intestinal por EBPC

El tamizaje identificó 7 EBPC (7 contactos positivos, CP, Tabla 1) entre los 83 CO. El estudio mostró que el 8,4 % de los CO estaban colonizados con EBPC.

2. Caracterización fenotípica y genotípica de EBPC

2.1. **Identificación bacteriana.** Las 17 EBPC estudiadas (de 10 CI y 7 CP: 17 CI/CP) incluyeron 15 *Klebsiella pneumoniae* (*Kpn*), 1 *Enterobacter cloacae* (*Ecl*) y 1 *E. aerogenes* (*Eae*), (Tabla 1).

2.2. Identificación del mecanismo de resistencia y Antibiótico

Estudios fenotípicos y moleculares confirmaron que las 17 EBPC eran productoras de KPC (Tabla 1).

■ Análisis del perfil de susceptibilidad a no β -lactámicos (GEN, AMK, CIP, TMS y FOS), y fenotipo BLEE identificó 9 antibióticos (I-V, VII, IX-XI) entre 15 *Kpn* (Tabla 1).

2.3. Análisis clonal

- MLST-PCR: 3 clones/15 aislamientos de *Kpn* (A, n:13; D, n:1; y F, n:1; Tabla 1).
- MLST: 1 secuencia tipo para cada clon (i.e clon A, ST258; clon D, ST46 y clon F, ST526).
- *Kpn* clon A/ST258 se asoció a 7 antibióticos, siendo prevalente el II (Tabla 1).

Tabla 1. Características fenotípicas y genotípicas de las EBPC

CI, CP ^{1,2}	Fecha	Sala ³	EBPC ⁴	Susceptibilidad a los antimicrobianos ⁵										Amplícones		Plásmidos portadores de bla _{KPC} ^b
				BLEE ⁶ ATB ⁷										A/F del Tn4401a ⁸	A/F del bla _{KPC} ⁹	
				IMP	MER	CAZ	AMK	GEN	CIP	TMS	FOS	(-)	(+)			
CI-1	03/12/14	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	S	S	I	R	S	(-)	I	-/+	-	-
CP-1 ^{1,2}	10/12/14	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	I	R	R	R	S	(+)	II	+/+	Positivo	-
CP-2 ^{1,2}	10/12/14	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	I	S	R	R	S	(+)	III	+/+	-	-
CI-2	18/02/15	S2	<i>Kpn</i> clon D	R	R	S	S	R	R	R	R	(-)	IV	-/+	Positivo	-
CI-3	23/02/15	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	I	R	R	R	S	(+)	II	+/+	nd	-
CP-3 ^{1,2}	27/02/15	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	R	R	R	R	S	(+)	II	+/+	-	-
CI-4	11/03/15	S3	<i>Kpn</i> clon A	R	R	I	I	S	I	S	(-)	V	+/+	Positivo	-	
CP-4 ^{1,2}	17/03/15	S3	<i>Eae</i>	R	R	I	S	S	S	S	R	(-)	VI	-/+	Positivo	-
CI-5	28/04/15	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	I	R	R	R	S	(+)	II	+/+	nd	-
CI-6	15/05/15	S3	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	R	R	R	R	S	(+)	II	+/+	nd	-
CP-5 ^{1,2}	19/05/15	S3	<i>Kpn</i> clon F	I	I	S	S	S	S	S	(-)	VII	-/+	Positivo	-	
CI-7	27/05/15	S2	<i>Ecl</i>	R	R	I	S	R	R	R	S	(-)	VIII	-/+	Positivo	-
CI-8	16/07/15	UTI	<i>Kpn</i> clon A	I	I	R	S	R	R	S	(+)	IX	-/+	Positivo	-	
CP-6 ^{1,2}	28/07/15	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	S	R	R	S	(+)	X	+/+	Positivo	-	
CI-9	01/09/15	UTI	<i>Kpn</i> clon A	I	I	R	I	R	R	S	(+)	II	-/+	nd	-	
CP-7 ^{1,2}	08/09/15	UTI	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	I	S	R	R	S	(+)	III	+/+	nd	-
CI-10	25/10/15	S1	<i>Kpn</i> clon A	R	R	R	R	R	R	S	(-)	XI	+/+	Positivo	-	

¹CI: caso índice, CP^{1,2}: contacto positivo y el correspondiente CI (superíndice); ²Sala de internación: UTI, unidad de terapia intensiva; S1, S2, y S3, salas generales; ³Enterobacterias productoras de KPC (clones de *Kpn*, en escala de grises; *Eae* y *Ecl*, en celeste); ⁴Antibiograma por difusión, según CLSI; S: sensible; R: resistente; I: intermedio; IMP: imipenem, MER: meropenem, CAZ: ceftazidima, AMK: amikacina, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, FOS: fosfomicina; ⁵Fenotipo beta-lactamasas de espectro extendido, (+) positiva y (-) negativa; ⁶Antibióticos según perfil de susceptibilidad (R/I, o S) a AMK, GEN, CIP, TMS, FOS y fenotipo BLEE. ⁷Amplícones correspondientes a regiones A (1038 pb) y F (1141 pb) del Tn4401a (Fig.1). ⁸Confirmado por ensayos de conjugación (nd), no determinado.

3. Plataformas genéticas portadoras de bla_{KPC}

3.1. Los ensayos de transferencia identificaron plásmidos conjugativos portadores de bla_{KPC} en *Kpn* clon A, *Kpn* clon D, *Kpn* clon F, *Eae* y en *Ecl*.

3.2. El análisis del entorno de bla_{KPC} identificó secuencias homólogas al Tn4401a en los aislamientos del *Kpn* clon A (regiones A y F, Fig. 1), mientras que solo la región F en los plásmidos de aislamientos de *Kpn* clon D, *Kpn*-clon F, *Eae* y de *Ecl*, sugiriendo diferentes plataformas en los aislamientos estudiados.

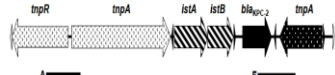


Figura 1. Representación esquemática del Tn4401a. Genes *impR*, *impA* (codificantes de transposasas), *istA* e *istB* (codificantes de secuencias de inserción), *bla_{KPC2}* (gen codificante de KPC). Amplícones obtenidos por PCR correspondientes a regiones A (1038 pb) y F (1141 pb).

4. Análisis de variables asociadas a los 10 pacientes CI y 7 CP (17 CI/CP)

- Paso por UTI o quirófano: 100%.
- Instrumentación invasiva, 100%.
- Tratamiento antimicrobiano durante su internación, 94%.
- Comorbilidades asociadas, 70, 5%.
- Promedio de días de internación previos al aislamiento, 41 días.
- Tratamiento durante su internación, 94% (e.g. MER, 35%).
- Mortalidad global, 41%. Particularmente el 71 % de los óbitos se asoció a *Kpn* clon A.

Tabla 2. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes CI y CP

Variables ^a	Asociadas a ^b :		
	CI n (%)	CP n (%)	CI+CP n (%)
Nº pacientes	10	7	17
Rango de edad /Promedio	33-63/50	36-72/56	33-72/52
Sala General	5 (50)	2 (29)	7/17 (41)
UTI	5 (50)	5 (71)	10/17 (59)
Paso por quirófano	6 (60)	6 (86)	12/17 (70,5)
Paso por UTI	8 (80)	7 (100)	15/17 (88)
Comorbilidades:	7 (70)	5 (71)	12/17 (70,5)
Renal	4 (40)	0	4/17 (23,5)
Cancer	1 (10)	0	1/17 (6)
Cardiopatía	1 (10)	2 (29)	3/17 (18)
Diabetes		1 (14)	1/17 (6)
Varias/otras	1 (10)	1 (14)	2/17 (12)
Ninguna	2 (20)	2 (29)	4/17 (23,5)
Rango/días internación	3-56/28	19-127/55	3-127/41
Dispositivos invasivos	10 (100)	7 (100)	17 (100)
Mortalidad global	3 (30)	4 (57)	7/17 (41)
Mortalidad asociada	3 (30)	2 (28,5)	5/17 (29)
Antibióticos previos	10 (100)	6 (86)	16/17 (94)
Internación previa	3 (30)	2 (29)	5/17 (29)

^aUTI: Unidad de terapia intensiva; ^bCI: casos índices; CP: contactos positivos.

Conclusiones

□ La diseminación de bla_{KPC} asociada prevalentemente a transferencia del clon epidémico *Kpn*-clon A/ST258.

□ La detección de plásmidos portadores de bla_{KPC} en diferentes clones de *Kpn*, así como en *Eae* y *Ecl* sugiere la movilización intergenómica de bla_{KPC} mediada por plásmidos.

□ La identificación de *Kpn* clon D/ST46 portador de bla_{KPC} no descripto previamente evidencia la profusa diseminación de bla_{KPC} en esta especie.

□ La presencia de *Ecl* y *Eae* productores de KPC muestra un escenario epidemiológico de elevada diversidad de especies portadoras de bla_{KPC}.

□ Se observó asociación estrecha de *Kpn* clon A/ST258 con el pasaje del paciente por UTI, instrumentación invasiva, y alta mortalidad.

Este trabajo señala la necesidad de conocer la situación epidemiológica de EBPC en el ambiente hospitalario, así como los factores asociados a la colonización y/o infección por estos microorganismos a fin de implementar estrategias que limitan la diseminación de EBPC y/o de sus genes de resistencia.