

Evaluación de la susceptibilidad a colistín y meropenem en *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas - KPC

Oliveira Oliveira Débora A¹, Torres Luis², Colmenares José Luis³

RESUMEN

El incremento de infecciones producidas por enterobacterias resistentes a carbapenems y a otros antimicrobianos, han limitado las alternativas terapéuticas llevando a la recuperación del uso del colistín en la práctica clínica. Desde el 2015, fue detectado un mecanismo que le confiere resistencia a colistín a través de plásmidos relacionado al gen *mcr-1* (Mobile Colistin Resistance), aumentando la importancia de la prueba de susceptibilidad de este en el laboratorio. Se evaluó la susceptibilidad al colistín mediante el método de elución de discos, en 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo KPC, donde 4 (17 %) cepas fueron resistentes a colistín y 20 (83 %) cepas intermedias. De igual manera en estas cepas se evaluó la susceptibilidad a meropenem por el método de E-test®, encontrándose que 10 (41,6 %) cepas, están dentro del rango aceptable para su combinación con colistín, mientras que 5 (20,8 %) cepas están dentro del rango dudoso y 9 (37,4 %) cepas no fueron aptas para su combinación con colistín. Para que la combinación de colistín con meropenem sea considerada como una alternativa terapéutica, la CMI de colistín debe ser $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ con meropenem $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que CMI entre 12-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meropenem puede o no funcionar; y con una CMI $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ de meropenem, la combinación no es efectiva.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenemasas; Colistín; Gen *mcr-1*; Meropenem; Susceptibilidad; Método de elución.

¹Licenciada en Bioanálisis. Bacterióloga del Instituto Médico La Floresta.

²Licenciado en Bioanálisis. Microbiólogo.

³Licenciado en Bioanálisis. Profesor de la cátedra de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela.

SUMMARY

The increase in infections caused by Enterobacteriales resistant to carbapenems and other antimicrobials has limited the therapeutic alternatives which have led to the recovery of the use of colistin in clinical practices. Since 2015, a mechanism that confers resistance to colistin through plasmids related to the *mcr-1* gene (Mobile Colistin Resistance) was detected, increasing the importance of its susceptibility test in the laboratory. Colistin susceptibility was evaluated by the disk elution method in 24 strains of Carbapenemase-producing type KPC *Klebsiella pneumoniae*, resulting 4 strains (17 %) resistant to colistin and 20 strains (83 %) intermediate. Also, in these strains, sensitivity to meropenem was evaluated by the E-test® method, finding that 10 strains (41,6 %) were within the acceptable range for their combination with colistin, 5 strains (20,8 %) were within the uncertain range and 9 strains (37,4 %) were not appropriate for combination with colistin. For the combination of colistin with meropenem to be considered as a therapeutic alternative the MIC of colistin must be $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ with meropenem $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$, while the MIC between 12-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of meropenem may or not may work; and with a MIC of 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ meropenem, the combination is not effective.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenemase; Colistin; *Mcr-1* gene; Meropenem; Susceptibility; Elution method.

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un fenómeno evolutivo que sucede principalmente mediante cambios genéticos o por adquisición de genes de resistencia como plásmidos, transposones e integrones y pueden ser adquiridos entre bacterias de la misma especie o especies distintas facilitando la expansión de la resistencia. Las enterobacterias pueden adquirir ese material genético a través de

la transferencia horizontal de estos genes y así difundir su resistencia con mayor facilidad¹.

Durante los últimos años se ha incrementado la aparición y dispersión de enterobacterias productoras de enzimas que confieren resistencia a la mayoría de antibióticos betalactámicos y carbapenémicos (meropenem, imipenem y ertapenem), considerándose a las bacterias productoras de carbapenemasas como uno de los problemas en salud pública, limitando las opciones terapéuticas para contrarrestar las infecciones causadas por ellas. Esto ha conllevado el uso de terapias combinadas y la recuperación de otros fármacos, incluyendo el colistín en la práctica clínica^{2,3}.

El colistín, es un antibiótico perteneciente al grupo de las polimixinas, que se comercializó en la década de los cincuenta y sesenta, pero fue remplazado por fármacos menos tóxicos en los setenta ya que, este fármaco mostró una incidencia media de efectos adversos administrada por vía sistémica del 25 %, siendo la nefrotoxicidad la causa más frecuente (aproximadamente del 20 %) seguida de la neurotoxicidad (7 %). El colistín es reintroducido al mercado debido a escasas alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gram negativos multiresistentes^{4,5}.

En noviembre del año 2015 se reporta por primera vez la detección de un mecanismo de resistencia al colistín a través de plásmidos relacionados al gen *mcr-1* (Mobile Colistín Resistance productor de una enzima responsable de la resistencia de las bacterias a este antibiótico. En Venezuela, en el año 2016 se informó por primera vez, en Cumaná, una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) con el gen *mcr-1* que confiere resistencia a colistín. En consecuencia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) proponen implementar y mantener la capacidad para detectar, prevenir y controlar la transmisión de microorganismos con resistencias transferibles a colistín y fortalecer la vigilancia e investigación epidemiológica de esta^{7,8}.

En vista que los carbapenems son considerados como el último eslabón para el tratamiento en bacterias resistentes, y los mismos han disminuido su actividad antimicrobiana, para el año 2020 el comité del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) en su documento ha propuesto como método alternativo la elución de discos para la determinación de la susceptibilidad a colistín, como una metodología más sencilla y de menor costo con respecto a la concentración mínima

inhibitoria (CIM) por microdilución en caldo, el cual es el *Gold Standard*⁹.

En concordancia con lo descrito anteriormente, se decidió evaluar la susceptibilidad del colistín mediante el método de elución de discos y meropenem por E-test[®] en *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas de tipo KPC como posible alternativa de la terapia combinada entre ambos antimicrobianos.

MÉTODOS

Muestra

Se procesaron un total de 24 cepas productoras de carbapenemasas de tipo KPC, pertenecientes a *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), provenientes de muestras clínicas aisladas en laboratorios de instituciones prestadoras de salud del área metropolitana, conservadas en microviales con agar nutritivo por la cátedra de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela.

Evaluación de la susceptibilidad del colistín mediante el método de elución

Para la susceptibilidad por el método de elución a colistín de las 24 cepas de *K. pneumoniae* se siguieron las pautas del documento CLSI-2020. Se utilizaron cuatro tubos con 10 mL de caldo Müller Hinton ajustado en cationes (CAMHB por su sigla en inglés. Oxoid-USA), cuyas concentraciones finales de colistín fueron: tubo n°1= control, tubo n°2= 1 µg/mL, tubo n°3= 2 µg/mL y tubo n°4= 4 µg/mL. En el tubo n°1 no se colocan discos de colistín sulfato de 10 µL (Oxoid), en el tubo n°2 se colocó un disco de colistín, en el tubo n°3 se colocaron dos discos y en el tubo n°4 se colocaron cuatro discos. Estos discos se dejaron eluir en las soluciones de Müller Hinton por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se agregaron 50 µL del inóculo de cada una de las cepas (1,5 x 10⁸ UFC/mL) a los 4 tubos por cepa (concentración final de inóculo de 7,5 x UFC/mL). Se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 horas. La interpretación se basó en la lectura de la CMI como la menor concentración en la que no se observa turbidez interpretando los resultados como intermedio a colistín si la CMI es ≤2 µg/mL o resistente si la CMI es ≥4 µg/mL⁹. Esta metodología fue realizada por duplicado.

Determinación de la susceptibilidad del meropenem por E-test[®]

La susceptibilidad de la CMI de meropenem se realizó mediante el método de difusión en agar con tiras de E-test[®], para cada una de las 24 cepas

de *K. pneumoniae*. Se realizó una suspensión en solución salina al 0,9% ajustándose a un patrón de 0,5 McFarland, luego se inocularon placas de agar Müller-Hinton de forma individual estriándose en 3 direcciones distintas, dejándose reposar por 15 minutos, posteriormente se colocaron las tiras por cada cepa esperando 10 minutos para su difusión en el agar. Se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 horas

Control de calidad

Como control negativo se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 y como control positivo *Klebsiella pneumoniae* 1802, tipificada molecularmente en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, como productora de carbapenemasas tipo KPC.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en una tabla de Microsoft Excel 2010, utilizando frecuencia y porcentajes.

RESULTADOS

De acuerdo a la susceptibilidad obtenida del colistín mediante el método de elución de discos de colistín, 20 (83 %) cepas fueron intermedias y 4 (17 %) fueron resistentes. Entre las cepas intermedias de acuerdo a la CMI, 17 cepas mostraron CMI ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, observándose turbidez en el tubo control según la metodología de elución, y 3 cepas con CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$, donde se observó

turbidez en el tubo control y en el tubo n°2. La distribución de las cepas resistentes según CMI fue: 1 cepa con CMI de 4 $\mu\text{g/mL}$ con turbidez en los tubos control, n°2 y n°3 y 3 cepas con CMI ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, con turbidez en todos los tubos (Figura 1).

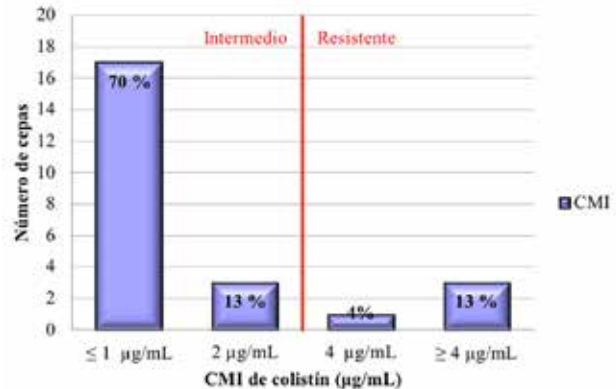


Figura 1. Distribución de la CMI del colistín por método de elución en disco de las 24 *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas de tipo KPC.

En la investigación de meropenem por E-test® se obtuvieron 10 (41,6 %) cepas con CMI ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$, 5 (20,8 %) cepas con CMI entre 12-16 $\mu\text{g/mL}$ y 9 (37,6 %) cepas con CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2).

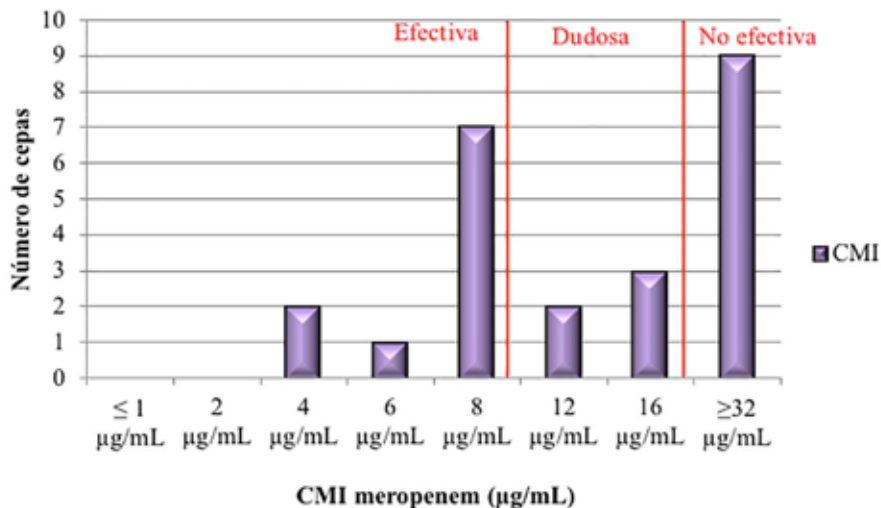


Figura 2. Distribución de la CMI por E- del meropenem en 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas de tipo KPC.

DISCUSIÓN

Klebsiella pneumoniae es uno de los géneros con mayor predominio y frecuencia de aislamientos en relación con la resistencia de diversos antimicrobianos a nivel de Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) tanto a nivel mundial¹¹, como en el área de salud metropolitana de Caracas¹⁰, concordando con los resultados obtenidos en el presente estudio.

En la actualidad existen escasos antibióticos en desarrollo y un incremento de bacterias multirresistentes, por lo que es fundamental la detección temprana y monitoreo de estas, para así definir acciones que mejoren el uso de los antimicrobianos disponibles y la prevención en cuanto a la diseminación de estas resistencias. La red latinoamericana de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (ReLAVRA) coordinada por la OPS y OMS, elaboran recomendaciones para ser utilizadas por todos los laboratorios latinoamericanos de microbiología clínica humana en cuanto a criterios de inclusión y exclusión en el uso de los antimicrobianos y las pruebas de susceptibilidad recomendadas siguiendo el lineamiento del CLSI^{9,11}.

En el 2019, Person y col., presentan el método de elusión de discos de colistín como alternativa para la determinación de las pruebas de susceptibilidad a colistín, con una concordancia de 98 % y 100 % respecto al método de referencia primario o *Gold Standard* de microdilución en caldo referido por el CLSI¹¹.

Las resistencias a múltiples drogas incluyendo al colistín, no escapa de la realidad en nuestro país. Para el año 2016, Delgado y col., detectaron en Venezuela el gen *mcr-1* que confiere resistencia a colistín en una cepa de *E. coli* proveniente de heces humana provocando una alerta a nivel sanitario⁸. Este antecedente orienta a tomar en cuenta los valores de susceptibilidad que puedan presentarse en otras bacteria diferentes a *E. coli*, como es el caso de los resultados obtenidos en esta investigación por *K. pneumoniae* donde 4 cepas resultaron resistentes a colistín sugiriendo una posible presencia del gen *mcr-1*, debido a que la resistencia a colistín puede propagarse rápidamente por transferencia horizontal mediante plásmidos a otras especies de bacterias con presencia de carbapenemasas y β -lactamasas de espectro extendido¹².

Para el tratamiento de bacterias resistentes que involucran producción de carbapenemasas de tipo KPC, con poca o ninguna opción terapéutica, es de utilidad una terapia combinada que incluya un carbapenémico, particularmente

con la combinación de tigeciclina, colistina y meropenem¹³. En el presente estudio se investigó meropenem por CMI como opción a una posible combinación entre meropenem y colistín, encontrándose cepas con resultados CMI ≤ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meropenem con buen pronóstico o efectiva, cepas con CMI de meropenem entre 12 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con pronóstico dudoso y cepas con CMI ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no efectiva; teniendo entonces 10 cepas con buen pronóstico para una combinación del meropenem y colistín, 5 con pronóstico dudoso en donde puede o no haber falla terapéutica y 9 cepas cuya combinación no es efectiva. Cabe destacar que dentro de las nueve cepas no efectivas se encuentran las cuatro cepas resistentes a colistín, sugiriendo que dicha combinación en estas cepas no es recomendable para su aplicación. De allí la importancia de utilizar el método de elución para informar la susceptibilidad a colistín.

Un estudio realizado por Batire y col., demuestra que una de las combinaciones más efectivas con el 47,7 % en la terapia combinada es la de un carbapenémico/colistín comparado con sulbactam/colistín (32,2 %) y tigeciclina/colistín (20,1 %)¹⁴, resultados similar en cuanto a la combinación entre carbapenémico/colistín obtenidos en el presente estudio con un porcentaje del 41,6 % donde se utilizó meropenem/colistín. Otros investigadores recomiendan determinar CMI de meropenem en enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC, para incluir o no este carbapenems en la terapia combinada¹⁵.

CONCLUSIONES

La presente investigación realza el uso efectivo del método de elusión de disco de colistín en relación a *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas de tipo KPC generando datos importantes sobre la susceptibilidad del colistín en este tipo de cepas; siendo un procedimiento fácil, sencillo y poco costoso de realizar, con resultados aceptables y reproducibles, por lo que se recomienda la implementación de la técnica en el laboratorio de microbiología, con la finalidad de detectar resistencia a colistín y evaluar la posibilidad de la aplicación de una terapia combinada del colistín con otro antimicrobiano como meropenem, para infecciones complicadas causadas por enterobacterias con múltiples resistencias. También se recomienda evaluar por técnicas moleculares las resistencias a colistín para definir la presencia del gen *mcr-1*.

REFERENCIAS

1. Pérez-Cano HJ, Robles-Contreras A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev Med MD*. 2013;4.5(3):186-191.
2. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Gudiol C, Martínez JA. Treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(4):49-55 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70174-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70174-0)
3. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hormero A, Ruiz-Garbajosa P, et al. La amaneza de enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: Documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(10):666-670 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.011>
4. Luque S, Grau S, Berenguer N, Horcajada JP, Sorlí L, Montero MM, et al. Luces y sombras en el uso de colistina: falta mucho por conocer. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(4):287-296. DOI:10.1016/j.eimc.2011.02.003
5. Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G. Colistin en la era post-antibiótica. *Rev Chil Infectol*. 2016;33(2):166-176. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000200006>.
6. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill*. 2016;21(9):30155. DOI:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155
7. Organización Mundial de la Salud (OMS). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra, Suiza. 2016:30. Disponible en: http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html.
8. Delgado-Blas JF, Ovejero CM, Abadia-Patiño L, Gonzalez-Zorn B. Coexistence of mcr-1 and blaNDM-1 in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6356-6358. DOI:10.1128/AAC.01319-16
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard-30th ed. CLSI document M100S. Wayne, PA: CLSI; 2020.
10. Torres L, Gagliotta V, Torres O, Benítez M, Domínguez M, Pedrosa R. β -Lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Rev Soc Ven*. 2006;26(2):80-88. ISSN: 1315-2556
11. Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte C, Salgado N, et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multiresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Publica*. 2019;43(65). DOI: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
12. Wang R, Van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature Communications*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-03205-z.
13. Martínez-Sagasti F, González-Gallego M, Moneo-González A. Monoterapia vs. terapia combinada en el tratamiento de las infecciones por bacterias gramnegativas multiresistentes. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29(1):43-46 ID: ibc-155920
14. Batirel A, Balkan I, Karabay O, Agalar C, Akalin S, Alici O, et al. Comparison of colistin-carbapenem, colistin-sulbactam, and colistin plus other antibacterial agents for the treatment of extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;33(8):1311-1322. DOI:10.1007/s10096-014-2070-6
15. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2322-2328. DOI: 10.1128/AAC.02166-13