

β -lactamasas AmpC plasmídicas tipo CMY-2 emergentes en Tucumán, Argentina

MARÍA A. JURE^{1*}, CONSTANZA PRESTI¹, NORMA M. CUDMANI², LIDIA M. GRELLET³, CAROLINA LÓPEZ⁴, EDUARDO H. MUSA⁴, OLGA C. AULET¹, CARLOS NIETO⁵, LUCILA SAAVEDRA⁶, MARTA CECILIA DE CASTILLO¹

¹Instituto de Microbiología "Dr. Luis C. Verna", Cátedra de Bacteriología, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología, Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 491 2° piso, San Miguel de Tucumán; ²Laboratorio de Bacteriología, Hospital Avellaneda. San Miguel de Tucumán; ³Laboratorio de Bacteriología, Hospital de Concepción. Concepción, Pcia. de Tucumán; ⁴Laboratorio de Bacteriología, Centro de Microbiología Médica. San Miguel de Tucumán; ⁵Instituto de Microbiología "Dr. Luis C. Verna", Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología, Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán; ⁶Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA). San Miguel de Tucumán, Argentina
*Correspondencia. E-mail: majure@fbqf.unt.edu.ar, magejure@gmail.com

RESUMEN

En los últimos años, algunas enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli* adquirieron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (C3G) por la adquisición de β -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas, mecanismo que se está comunicando cada vez con mayor frecuencia en el mundo. El objetivo de esta investigación fue detectar la emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas en Tucumán e identificar sus tipos predominantes. Se estudió la sensibilidad a diferentes antimicrobianos de 733 aislamientos clínicos consecutivos de enterobacterias obtenidos en el período marzo-julio de 2009 en tres centros asistenciales de nuestra provincia. Se realizaron pruebas de sensibilidad por difusión y se seleccionaron tres aislamientos de *E. coli* y uno de *P. mirabilis* resistentes a C3G y a cefoxitina. En estos aislamientos se determinó la CIM por E-test y se evaluó el mecanismo enzimático de resistencia mediante sinergia con discos de ácido aminofenilborónico y ensayo microbiológico de Masuda. Se realizó PCR usando cebadores dirigidos al grupo CIT de las AmpC plasmídicas. Se obtuvo un amplicón de 462 pb que fue secuenciado; presentó un 100% de identidad con *bla*_{CMY-2} en los cuatro aislamientos. En conclusión, las β -lactamasas AmpC tipo CMY-2 emergieron en nuestro medio, de modo que es importante implementar una vigilancia sistemática de estas resistencias para evitar potenciales consecuencias clínicas y epidemiológicas.

Palabras clave: *Enterobacteriaceae*, β -lactamasa AmpC plasmídica, tipo CMY-2

ABSTRACT

CMY-2-type plasmid-mediated AmpC β -Lactamases emerging in Tucumán, Argentina. In the last years, *Enterobacteriaceae* such as *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*, have acquired resistance to third-generation cephalosporins (C3G) because of the presence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases. The aim of this work was to detect plasmid AmpC enzymes and to investigate the predominant types in our region. Between March and July 2009, 733 consecutive isolates of *Enterobacteriaceae* derived from hospitals and outpatient centers were studied. Susceptibility testing was performed by disk diffusion; one *P. mirabilis* and three *E. coli* strains showed resistance to cephamycins (cefoxitin) and C3G. An E-test to determine MIC and a synergy test by aminophenylboronic disks were performed. Enzymatic activity against cefoxitin was confirmed by a microbiological assay. A polymerase chain reaction (PCR) for the detection of plasmid-mediated *ampC* genes of different groups was performed and a 462-bp amplicon was obtained when using primers directed against the CIT group; the obtained sequences were compared to *bla*_{CMY-2} sequences, showing 100% identity. The emergence of CMY-2-type plasmid-mediated AmpC β -lactamases indicated the importance of implementing systematic monitoring of these resistances to avoid potential clinical and epidemiological consequences.

Key words: *Enterobacteriaceae*, plasmid-mediated AmpC β -lactamases, CMY-2 type

En nuestro medio, la presencia de enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (C3G) es una realidad; detectar precozmente esta resistencia en el laboratorio conduce a tratamientos exitosos.

Géneros como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Serratia* spp. pueden hiperproducir β -lactamasa de tipo AmpC en forma cromosómica constitutiva, lo que les

confiere resistencia a las C3G. En los últimos años, otras enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, que naturalmente carecen de estas enzimas, o *Escherichia coli* que la produce en niveles basales, adquirieron también resistencia asociada a la producción de AmpC codificada en plásmidos (en adelante, AmpC plasmídicas).

En Argentina se documentaron dos tipos de AmpC plasmídicas: tipo FOX en *K. pneumoniae* (1994) y tipo CMY-2 en *Citrobacter koseri*, en *K. pneumoniae* (2007) y en *Shigella flexneri* (2008) (6, 10, 11).

El objetivo de este trabajo fue detectar la emergencia de AmpC plasmídicas y caracterizar sus tipos predominantes en nuestra región.

Se estudió el comportamiento antimicrobiano de 733 aislamientos clínicos de *E. coli* y otras enterobacterias que naturalmente no poseen el gen cromosomal *ampC*. Los aislamientos correspondieron a *E. coli* (66%), *Klebsiella* spp. (21%) y *Proteus* spp. (13%), y se obtuvieron en tres centros asistenciales de Tucumán (Hospital Nicolás Avellaneda, Hospital Regional de Concepción y Centro de Microbiología Médica de Tucumán) en el período marzo-julio de 2009.

La prueba de sensibilidad se realizó por difusión con discos siguiendo las normativas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (3). Los antibióticos ensayados fueron ampicilina, amoxicilina/clavulánico, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, ceftacídima, imipenem, cefotaxima/clavulánico, ceftacídima/clavulánico, piperacilina/tazobactama, trimetoprima/sulfametoxazol, ciprofloxacina, gentamicina y ampicacina.

Los criterios para seleccionar cepas probablemente productoras de AmpC plasmídica fueron sensibilidad disminuida o resistencia a C3G y resistencia a cefoxitina. En los aislamientos seleccionados se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por E-test de los siguientes antibióticos: cefoxitina, ceftacídima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepima. No se incluyó en este estudio ningún aislamiento productor de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), por su sensibilidad a cefoxitina.

Las enzimas AmpC plasmídicas son inhibidas por el ácido 3-aminofenilborónico (AFB). Para investigar su presencia se llevó a cabo una prueba de sinergia colocando discos con AFB entre los de cefoxitina y/o ceftacídima/cefotaxima (13), y luego se practicó el ensayo microbiológico de Masuda, que consistió en evaluar diferentes concentraciones del extracto enzimático obtenido a partir de cada aislamiento frente a la cefoxitina (8).

Una vez detectada la presencia de la enzima en términos fenotípicos, se realizó la caracterización genética por PCR. Teniendo en cuenta la prevalencia de enzimas AmpC plasmídicas en nuestro país, se escogieron los cebadores descritos por Pérez-Pérez y Hanson (9), que amplifican genes codificadores de enzimas del grupo CIT (LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7 y BIL 1). Se utilizó como templado el ADN total; como control positivo se empleó un aislamiento de *S. flexneri* productor de AmpC tipo CMY-2 cedido por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán.

El producto de PCR fue enviado a secuenciar con un analizador ABI3130XL (Applied Biosystems, EE.UU.) al Instituto de Biotecnología, Unidad de Genómica, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (INTA Castelar).

Con el objeto de evaluar si el fragmento obtenido se localizaba en un plásmido, se procedió a la extracción del ADN plasmídico de los aislamientos clínicos seleccionados como probables productores de AmpC plasmídica. Esto se realizó por dos metodologías: mediante la técnica de Birnboim y Dolly (2) y con un equipo comercial (Axy Prep Plasmid Miniprep Kit, Axygen Biosciences, Basilea, Suiza), luego se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Los transformantes se seleccionaron en placas que contenían agar Luria-Bertani adicionado con 100 μ g/ml de cefoxitina.

De los 733 aislamientos clínicos de enterobacterias estudiados, se seleccionaron cuatro aislamientos provenientes de orina: tres de ellos correspondieron a *E. coli*

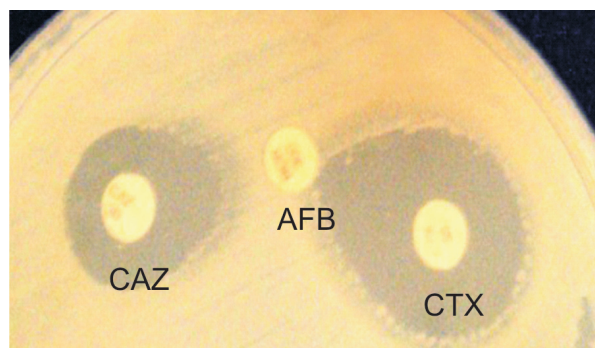


Figura 1. Prueba de sinergia con discos de ácido 3-aminofenilborónico (AFB), ceftacídima (CAZ) y cefotaxima (CTX).

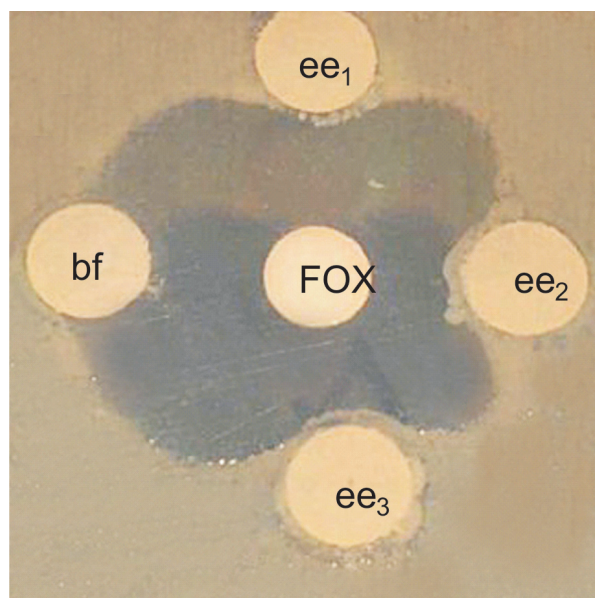


Figura 2. Ensayo microbiológico de Masuda. Placa de agar Mueller Hinton hisopada con *E. coli* ATCC 25923; ee: discos de papel de filtro impregnados con 5 μ l (ee1), 10 μ l (ee2) o 15 μ l (ee3) de extracto enzimático; bf: discos de papel de filtro impregnados con buffer PBS (15 μ l); FOX: cefoxitina (30 μ g).

(aislamientos C20 y A964, de pacientes ambulatorios, y aislamiento C44, de un paciente hospitalizado) y uno correspondió a *P. mirabilis* (aislamiento A2, de un paciente ambulatorio). Todos ellos fueron resistentes a las aminopenicilinas, las cefalosporinas de espectro restringido y la cefoxitina, y presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido, mientras que fueron sensibles a cefepima, piperacilina/tazobactama, meropenem e imipenem.

La prueba de sinergia con AFB y el ensayo de Masuda confirmaron el mecanismo enzimático en los 4 aislamientos (Figuras 1 y 2).

Por PCR se obtuvo un amplicón de 462 pb. Las secuencias de los productos de PCR de los aislamientos seleccionados presentaron un 100% de identidad con *K. pneumoniae bla_{CMY-2}* (n° de acceso a GenBank; X 91840).

El ADN plasmídico obtenido a partir de los aislamientos clínicos de *E. coli* fue transferido por transformación a cepas receptoras de *E. coli* DH5 α .

Los transformantes presentaron valores de CIM de cefoxitina > a 256 μ g/ml (Tabla 1), sinergia con los discos de AFB y el ensayo microbiológico de Masuda positivos, con lo cual se confirmó en términos fenotípicos que se trataba de una resistencia enzimática. Además, se confirmó la presencia del gen *bla_{CMY-2}* en las cepas transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores específicos antes descritos, con los que se obtuvo un fragmento del tamaño esperado (462 pb).

En *P. mirabilis* no se pudieron obtener plásmidos por los métodos empleados, por lo tanto no se confirmó su localización plasmídica.

La búsqueda y detección de las enzimas AmpC en los laboratorios se ve limitada debido a que no existen métodos fenotípicos estandarizados; por otra parte, la resistencia a cefoxitina como una herramienta de detección de AmpC plasmídica es una metodología muy inespecífica, ya que la reducción en la permeabilidad de la membrana externa puede originar un fenotipo de resistencia similar (4, 12).

En este trabajo, de los 733 aislamientos clínicos de enterobacterias obtenidos en un período de 5 meses, sólo 4 presentaron el perfil de resistencia enunciado en el criterio de selección y fueron positivos en la prueba de sinergia con los discos con AFB.

En un período de 6 meses y sobre un total de 25 000 aislamientos clínicos de enterobacterias, Rapoport *et al.* (11) seleccionaron 15 con un perfil de resistencia inusual a β -lactámicos y que resultaron positivos en la prueba de sinergia con discos con AFB. La presencia de AmpC plasmídica perteneciente al grupo CIT se confirmó por PCR en la totalidad de esos casos. Doy *et al.* y Rapoport *et al.* sugirieron implementar el uso de discos de AFB para detectar esta enzima (5, 11); en el presente estudio, dicha metodología nos permitió detectar este mecanismo inusual en cepas resistentes a cefoxitina.

Se han documentado valores variables de incidencia de AmpC plasmídica en *Enterobacteriaceae* en distintas áreas geográficas. Desde el primer informe en Corea del Sur en 1989 (1), se ha detectado AmpC plasmídica en China y en EE.UU., con incidencias de 2,8% y 1,2%, respectivamente (7, 4). En Argentina, Rapoport *et al.* informaron en 2008 un porcentaje menor de 0,1% de enterobacterias productoras de enzimas del grupo CIT (11); en nuestro trabajo este porcentaje fue del 0,55%.

La β -lactamasa CMY-2 fue descrita por primera vez en 1990 y se la ha detectado en *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. Es la enzima de mayor prevalencia y la más ampliamente distribuida en el mundo (1).

En Argentina, la β -lactamasa CMY-2 fue detectada en varias especies bacterianas como *E. coli*, *P. mirabilis*, *C. koseri*, *K. pneumoniae* y *S. flexneri* (10, 11, 14, 15). En Tucumán se detectó por primera vez en *E. coli* y *P. mirabilis*.

En conclusión, hemos demostrado que las β -lactamasas AmpC plasmídicas tipo CMY-2 emergieron en nuestro medio. Consideramos que es muy importante implementar su búsqueda rutinaria en todos los centros asistenciales, para evitar su propagación a otros microorganismos.

Tabla 1. Perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos en los aislamientos clínicos de *E. coli* y *P. mirabilis* seleccionados y en sus respectivos transformantes

Antimicrobianos	CIM por E-test (μ g/ml)							
	C20	DH5 α (TC20)	A964	DH5 α (TA964)	C44	DH5 α (TC44)	A2	DH5 α
FOX	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	-
CAZ	16	32	16	16	16	16	32	-
FEP	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	3	-
CTX	16	16	16	16	16	16	32	-
CRO	16	16	16	16	16	16	24	-

FOX: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona. C20: *E. coli*, Hospital de Concepción; A964: *E. coli*, Hospital Avellaneda; C44: *E. coli*, Hospital de Concepción; A2: *P. mirabilis*, Hospital Avellaneda; DH5 α (TC20): *E. coli* transformante C20; DH5 α (TA964): *E. coli* transformante A964; DH5 α (TC44): *E. coli* transformante C44.

Agradecimientos: los autores agradecen a las Dras. Clara Ruiz y Cristina Allori y a las Bioqcas. Rosa Cangemi y Norma Porcel por su colaboración en la recepción y conservación de las cepas estudiadas, y al Dr. Fernando Pasterán por proveer la cepa de *S. flexneri* utilizada como control positivo. Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán. Programa CIUNT 26/D417.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bauernfeind A, Stemplinger I, Junwirth R, Giamarellou H. Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 221-4.
2. Birnboim H, Dolly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-23.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17th Informational Supplement, 2007; M100-S17. Wayne, PA, EE.UU.
4. Coudron P, Moland E, Thomson K. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1791-6.
5. Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. *Int J Infect Dis* 2007; 11: 191-7.
6. González M, Pérez-Díaz J, Ayala J, Casellas JM, Martínez-Beltrán J, Bush K, Baquero F. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC type plasmid mediated β -lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2150-7.
7. Li Y, Li Q, Du Y, Juang X, Tang J, Wang J, Guilan L, Jiang Y. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in a Chinese University Hospital from 2003-2005: first report of CMY-2 -type AmpC β -lactamase resistance in China. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1317-21.
8. Masuda G, Tomioka S, Hasegawa M. Detection of β -lactamase production by gram-negative bacteria. *J Antibiots* 1976; 29: 662-4.
9. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2153-62.
10. Radice M, Cittadini R, Stortz M, Ruggiero M, Gutkind G, Vay C. Emergence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in ESBL producing enterobacteria in Buenos Aires, Argentina. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2007. Resumen C-2 1512, Chicago, EE.UU.
11. Rapoport M, Monzani V, Pasteran F, Morvay L, Faccione D, Petroni A, Galas M. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC β -lactamase finally emerging in Argentina. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 385-7.
12. Tan T, Yong L, He J, Koh T, Yang Hsu L. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 146-9.
13. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, Shibata N, Uato H, Shibayama K, Arakawa Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2551-8.
14. Cejas D, Radice M, Almuzara M, Quinteros M, Famiglietti A, Vay C, Gutkind G. Detección y caracterización de enzimas de tipo AmpC de localización plasmídica en *Escherichia coli*. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología, 2008. Resumen p. 389, Rosario, Santa Fe, Argentina.
15. Cejas D, Almuzara M, Giovanakis M, Fernández Canigia L, Vay C, Quinteros M, Pagnila G, Lascialandare S, Mutti D, Gutkind G, Radice M. Análisis de prevalencia de enzimas de tipo AmpC de codificación plasmídica (PAMPC) en *Enterobacteriaceae*. X Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, 2010. Resumen 26906, p. 75, Mar del Plata, Argentina.