

## Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa en especies de *Enterobacteriaceae* aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua

(New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase in *Enterobacteriaceae* species isolated from hospitalized patients, Managua Nicaragua)

Oscar Arbízú-Medina, Kenia García-Rosales, Helen Cerda-Aragón, William Martínez-García, Asdrúbal Pérez-Martínez, Yader Lanzas-Baca

### Resumen

**Objetivo:** determinar la frecuencia de metalo- $\beta$  lactamasa tipo Nueva Delhi (NDM), en aislados de enterobacterias provenientes de pacientes hospitalizados con diferentes procesos infecciosos.

**Método:** se realizó una investigación descriptiva transversal, agosto 2015 - octubre 2016, en el Hospital Alemán Nicaragüense. Se estudiaron 249 cepas en vigilancia activa a los carbapenémicos. La identificación y perfil de resistencia se efectuó en Vitek2; la sospecha de resistencia a los carbapenémicos se tomó cuando la CMI de Imipenem y Meropenem 2-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Ertapenem 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se determinó mediante Kirby Bauer, el test de sinergia triple disco (carbapenémicos y EDTA 10 $\mu\text{g}$ ); se hizo la reacción en cadena de la polimerasa para metalo- $\beta$ -lactamasa Nueva Delhi.

**Resultados:** se analizaron 249 cepas, entre estas se identificó 45 cepas resistentes a los carbapenémicos, correspondiendo al 18%. De estas cepas, 43 dieron positivo para el test de sinergia con EDTA; 21 portaban el gen de Nueva Delhi. El 66% de metalo- $\beta$ -lactamasa Nueva Delhi se encontró en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, seguida de *Escherichia vulneris* en un 14%, *Escherichia coli* en un 5%, *Providencia rettgeri* en un 5%, *Pantoea agglomerans* en un 5% y *Kluyvera cryocrescens* en un 5%.<sup>19</sup>

**Conclusiones:** el hallazgo del presente estudio es una advertencia clara sobre la circulación de cepas de metalo- $\beta$ -lactamasa tipo Nueva Delhi que codifican la resistencia a los carbapenémicos en el hospital analizado.

**Descriptores:** *Enterobacteriaceae*, NDM, Metallo- $\beta$ -lactamasas, *Carbapenem* resistente.

### Abstract

**Objective:** to determine the frequency of New Delhi-type metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) in isolates of enterobacteria from patients hospitalized with different infectious processes.

**Method:** a cross-sectional descriptive study was carried out between August 2015 and October 2016 at Alemán Nicaragüense Hospital. A total of 249 strains were studied in active surveillance of carbapenems resistance. The identification and resistance profile was carried out in Vitek2. Suspected resistance to carbapenems was considered when the MIC of Imipenem and Meropenem was 2-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and for Ertapenem of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , determined by Kirby Bauer, the triple disc synergy test (carbapenems and EDTA 10 $\mu\text{g}$ ). A polymerase chain reaction test was made to determinate New Delhi metallo- $\beta$  lactamase.

**Trabajo realizado en** Laboratorio de Biología Molecular "MA. Elmer Cisneros in memoriam", Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

Abreviaturas: NDM, New Delhi; MBL, Metallo- $\beta$ -lactamasa; UCIN, Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales; UCIP, Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

**Conflicto de interés:** los autores declaran no tener conflicto alguno.

✉ arbizu2006@yahoo.com.mx

**Results:** a total of 249 strains were analyzed, among which 45 strains resistant to carbapenems were identified, corresponding to 18%. Of these strains, 43 were positive for the synergy test with EDTA; 21 carried the New Delhi gene. Of the New Delhi metallo- $\beta$  lactamase. 66% were found in isolates of *Klebsiella pneumoniae*, followed by *Escherichia vulneris* in 6 isolates, *Escherichia coli* in 2, *Providencia rettgeri* in 2, *Pantoea agglomerans* in 2 and *Kluyvera cryocrescens* by 2.

**Conclusions:** the results of the present study are a clear warning about the circulation of New Delhi-type metallo- $\beta$ -lactamase strains that codify for the resistance to carbapenems in the hospital analyzed.

**Fecha recibido:** 17 de agosto 2017

**Fecha aprobado:** 31 de enero 2018

Las infecciones bacterianas por enterobacterias y Gram negativos no fermentadores, son muy frecuentes en pacientes hospitalizados en países subdesarrollados, y se comportan como multirresistentes, agudizando las condiciones de salud de los pacientes. La resistencia antimicrobiana debe considerarse un problema de salud pública, los reportes son alarmantes y en ascenso en diferentes países; las opciones terapéuticas se han reducido, debido al aumento de mecanismos que han desarrollado los microorganismos para defenderse ante el "ataque constante" al que han sido sometidos por los antibióticos. Las carbapenemasas son enzimas que han desarrollado las bacterias para hidrolizar a los carbapenémicos, que son la última línea de antibióticos de uso clínico en este momento, lo que ha producido fracasos terapéuticos. Estas han emergido como un problema potencial para la salud de los pacientes, de manera que controlar los procesos infecciosos producidos por bacterias con este tipo de resistencia, es todo un desafío para cualquier unidad de salud, porque son altamente diseminativas.

Con la aparición de la Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa, la situación es aún más alarmante, porque los microorganismos con este tipo de gen, son cada vez más frecuentes, lo que lleva a pensar que el mecanismo por el cual comparten este gen, son genes móviles fáciles de transferir o compartir entre bacterias Gram negativas muy cercanas.<sup>1-3</sup>

Los carbapenémicos poseen el espectro más amplio de actividad ante microorganismos Gram negativos y son los más usados en los últimos años a raíz del surgimiento de cepas BLEE (Beta lactamasas de espectro extendido); desafortunadamente, las bacterias han desarrollado un nuevo mecanismo que neutraliza la acción de los carbapenémicos convirtiéndose en un problema de salud pública, porque se caracterizan por ser multirresistentes.<sup>4</sup>

La metalo- $\beta$ -lactamasa New Delhi pertenece al grupo B clasificación de Ambler, estas bacterias se conocen tienen un cofactor ion zinc en su estructura, que se caracteriza por neutralizar todos los betalactámicos, excepto Aztreonam; es inhibida solo por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA.<sup>4</sup> Desde su descubrimiento en 2008 en la India, en *Klebsiella*, los reportes en diferentes países son constantes, tanto en *Klebsiella* como en otras enterobacterias; se han aislado en el continente europeo, igualmente en los Estados Unidos, Japón, Brasil, Canadá y en Centroamérica en 2011 Guatemala reporta el hallazgo en *Klebsiella*,<sup>5</sup> y en 2014, Costa Rica refiere

su primer caso de Nueva Delhi.<sup>6</sup> Los reportes son alarmantes en diferentes revistas, lo que ha generado preocupación a la comunidad científica y en organizaciones como la OPS y OMS, por el impacto en el desenlace clínico del paciente. Las cepas productoras de carbapenemasas son un peligro, y el tratamiento de estas infecciones es un desafío para el médico, por lo que los análisis microbiológicos son de gran ayuda para evaluar la terapia del paciente.<sup>5,7-12</sup>

---

## Métodos

---

Se realizó una investigación descriptiva transversal, de agosto de 2015 a octubre de 2016, donde se estudiaron 249 cepas, en pacientes hospitalizados del Hospital Alemán Nicaragüense. Se obtuvieron muestras de las unidades de Cuidado Intensivo Neonatal y Cuidado Intensivo Pediátrico, neonatología, medicina y cirugía. La identificación y perfil de resistencia se realizó en Vitek2 compact; la resistencia a los carbapenémicos se definió cuando las concentraciones mínimas inhibitorias de imipenem y meropenem eran de 2-4  $\mu\text{g/ml}$  y de ertapenem de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Se realizó la caracterización fenotípica por Kirby Bauer mediante el test de sinergia triple disco, EDTA (10 $\mu\text{g}$ ), imipenem (10 $\mu\text{g}$ ) y meropenem (10 $\mu\text{g}$ ). El control de calidad fue establecido con el uso de cepas de referencia, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603.<sup>5,13-15</sup>

**Extracción del ADN.** Las cepas analizadas y los controles fueron cultivados en agar MacConkey, incubado por 18-24 horas a 37°C; del cultivo se tomó tres UFC y fueron inoculadas en crioviales que contenían 100 $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas; se colocó en baño maría en ebullición por 10 minutos; las muestras se dejaron enfriar en hielo por 5 minutos, luego se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, y se extrajo 80 $\mu\text{l}$  del sobrenadante; se determinó la concentración de ADN extraído en nanodrop lite 2763.<sup>4</sup>

**La detección genotípica de la metalo- $\beta$ -lactamasa Nueva Delhi.** Se efectuó por medio de una reacción en cadena de la polimerasa, utilizando la secuencia de nucleótidos: NDMF<sub>5-3</sub> AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC, NDMR<sub>5-3</sub> GGC GTA GTG CTC AGT GTC, en la que se utilizó ADN<sub>5-3</sub> 2,5 $\mu\text{l}$ , buffer 10X (2,5 $\mu\text{l}$ ), solución Enhancer 5x (0,7 $\mu\text{l}$ ), dNTP's mix

(40 mM) 0,5μl, Taq Polymerasa 5U/ul (0,5 ul), Primer Forward 10nM (0,5ul), Primer Reverse 10nM (0,5ul), agua libre de nucleasas (17,6μl), para un volumen final 25μl.<sup>16</sup>

**La amplificación.** Se utilizó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización 94°C, por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, 94°C por 30seg, hibridación 50°C por 30seg, amplificación 72°C por 60seg, extensión final 72°C por 10 minutos y temperatura final de 4°C; las muestras se analizaron en un Máster Cyler, marca Eppendorf, modelo número 5341.<sup>5</sup>

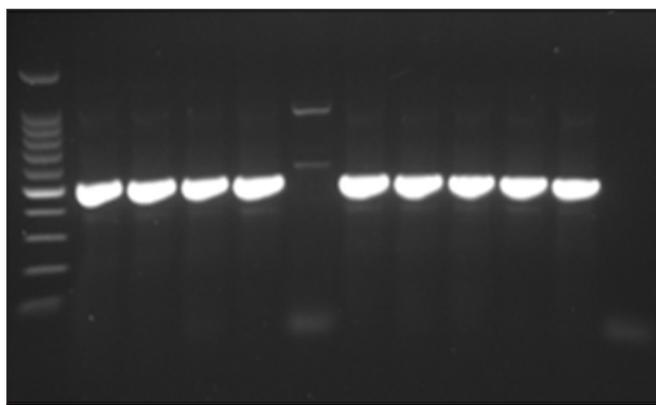
**Electroforesis.** El producto de PCR fue evaluado en un gel de agarosa al 1,5% de con 0,5 μg/mL de bromuro de etidio; la electroforesis se corrió a 120 voltios por 50 minutos; las bandas de ADN fueron visualizadas en una cámara con luz ultravioleta y fotografiadas. Lo anterior correspondió a un peso molecular de 512 bp. Figura 1.

## Resultados

Se analizaron 249 cepas, de las cuales solo 45 fueron resistentes a los carbapenémicos, para un 18%. De estas, 43 dieron positivo para el test de sinergia con EDTA; 20 de las cepas dieron positivas para genes metaloenzimas (IMP, VIM, SPM, SIM, GIM). Sin embargo, 21 cepas no fueron identificadas con ningún gen, aunque la sinergia estaba positiva, y de ahí surge la idea de buscar el gen Nueva Delhi.

Se encontró el gen Nueva Delhi en 22 de las 43 muestras positivas para el test de sinergia. De las 22 muestras con Nueva Delhi, la mayoría fueron aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* (15 muestras, 66%), seguidas de *Escherichia vulneris* con 3 muestras (14%), y se tuvo un aislamiento de las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Providencia rettgeri*, *Pantoea agglomerans* y *Kluyvera cryocrescens*.

La frecuencia y distribución por servicio de New Delhi se ven reflejadas en la figura 2, donde se observa que 62% de los aislamientos provinieron de unidades de cuidados intensivos de niños, 19% de servicios quirúrgicos y 14% de servicios médicos.



**Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% gen New Delhi, Peso Molecular de 512 pb. Pozo 2 control positivo, pozos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, paciente, Pozo 6 control negativo interno, pozo 12 control negativo agua grado PCR.**

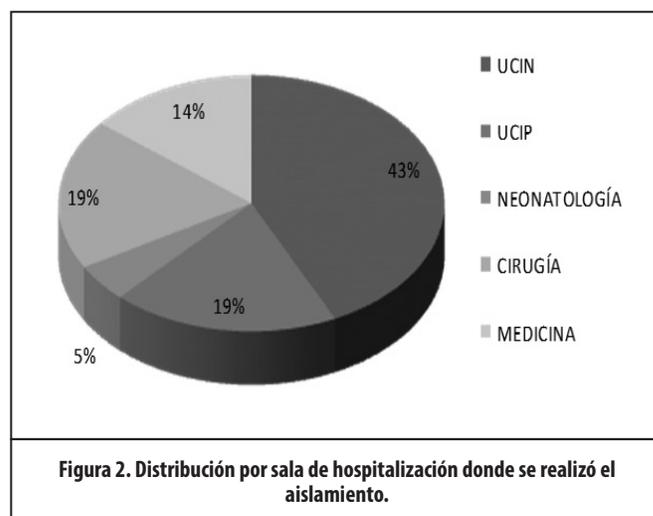
## Discusión

En Nicaragua, por primera vez es reportado NDM, y con porcentaje alarmante. Con frecuencia se aíslan enterobacterias con test de sinergia positivo con EDTA, lo que significa que mayormente se aísla metaloenzimas; muchas publicaciones reportan *blaKPC*. Este comportamiento es particular de nuestro país, quizás obedezca al alto porcentaje de NDM. Desde su descubrimiento en la India, en *Klebsiella*, este gen se ha identificado en varios países, con una rápida dispersión; en Nicaragua, el porcentaje de NDM, también es alarmante.

Las bacterias productoras de NDM son capaces de diseminarse rápidamente, convirtiéndose en un serio problema para cualquier unidad de salud, por las enfermedades nosocomiales y las opciones terapéuticas limitadas; los reportes son muy comunes en *Klebsiella* y *Escherichia coli*, como las más portadoras, lo que puede conllevar a tenerlas en el ambiente extrahospitalario o en diversos procesos infecciosos.

La septicemia neonatal sigue siendo unas de las principales causas de enfermedad nosocomial en nuestros hospitales, y una de las principales causas que podrían producir un desenlace trágico. En nuestro estudio se encontraron 6 tipos de microorganismos portadores del gen de NDM. *Klebsiella* fue el principal causante de sepsis con este gen, acorde con lo que se reporta en la bibliografía internacional. Las 21 cepas resultaron multiresistentes, con las únicas opciones de Colistina y Tigeciclina.<sup>17,18</sup>

Los hallazgos del presente estudio son una advertencia clara sobre la circulación de cepas de Nueva Delhi que codifican la resistencia a los carbapenémicos en los hospitales de Nicaragua. Es fundamental tener esto en consideración en la práctica clínica, dada la reducción drástica de opciones terapéuticas para los pacientes con infecciones por estas cepas. A partir de nuestros resultados, se recomienda algunas medidas de contención para evitar la diseminación, y aporta datos relevantes a las unidades donde se hacen los aislamientos, en cuanto al perfil de resistencia y el gen de resistencia que circula.



**Figura 2. Distribución por sala de hospitalización donde se realizó el aislamiento.**

**Agradecimiento:** al personal del laboratorio de bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense, al equipo de docencia e investigación. El estudio se realizó con fondos para proyectos de investigación (FPI) de la UNAN-Managua, otorgados al autor principal MSc. Oscar Arbizú Medina, y ejecutado por la Dirección Vicerrectorado de investigación y posgrado.

---

## Referencias

---

1. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-Related Acquisition of blaNDM-Like Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2012; 56:1087-1089.
2. Amaya E, Cáceres M, Fang H, Torres Ramirez A, Palmgren A. C, Nord C. E, Weintraub A. Antibiotic Resistance Patterns in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Causing Septicemia in Newborns in León, Nicaragua: Correlation with Environmental Samples. *J Chemother*. 2010; 22:25-29
3. González-Escalante E, Vicente-Taboada, Champi-Merino, Soto-Pastrana, Flores-Paredes W, Lovera-García M, et al. Metallo- $\beta$ -Lactamasas en aislamientos clínicos de pseudomona aeruginosa en Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013; 30:241-245.
4. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamasas. *Antimicrobi Agents and Chemother*. 2010; 54: 969-976.
5. Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J Antimicrobi Chemother*. 2012; 67:1795-1797.
6. Muñoz-Acuña R, Méndez-Rodríguez JD, Villalobos-Vindas J. Bacteriemia por *Kluyvera cryocrescens*. *Acta méd costarric*. 2016; 58:38-39.
7. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, O'Connor FS, Giesecke J. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing. *Euro Surveill*. 2010; 15: pii=19716.
8. Smyth , Kahlmeter G, Olsson Liljequist B, Hoffman B. Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2001;48:103-107.
9. Na Kim M, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee, K, et al. Nosocomial Clustering of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 340 Strains in Four Patients at a South Korean Tertiary Care Hospital. *J Clin Microb*. 2012; 50:1433-1436.
10. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *BioMed Research International*. 2014. 12p doi.org/10.1155/2014/249856.
11. Padgett D, Luque MT, Rivera DM, Galindo C, Zepeda LM, Hernandez AL. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas en el Instituto Hondureño de Seguridad Social. *Rev Med Hondur*. 2011; 79:117-121.
12. Labarca LJ, Araos BR. Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. *Rev Chil Infect*. 2009; 26 (Supl 1): 8-9.
13. Smyth, Kahlmeter G, Olsson Liljequist B, Hoffman B. Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2001;48:103-107.
14. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
15. Nicola FG, Nievas J, Smayevsky J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Argent. Microbiol*. 2012; 44:290-302.
16. Smyth, Kahlmeter G, Olsson Liljequist B, Hoffman B. Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2001;48:103-107.
17. Rahman M, Shukla SK, Prasada K, Ovejeroc C, Patia, B, Tripathia, et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamasas NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44:30-37.
18. Amaya E, Cáceres M, Fanga H, Torres Ramirez A, Cathrin Palmgren A, Norda E, Weintraub Andrej. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit in León, Nicaragua. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33:386-387.