

Trabajo completo

Detección de genes *qnr* en aislamientos de enterobacterias con resistencia simultánea a fluorquinolonas y oximinocefalosporinas

RECIBIDO: 03/06/2010

ACEPTADO: 23/08/2010

Escobar, A.¹ • Porto, A.² • Joris, R.² • Sansevich, M. E.¹ • Gutkind, G.³ • Di Conza, J.² • Truppia, L. A.^{1*}

¹ Sección Bacteriología, Sanatorio Medico de Diagnóstico y Tratamiento, Santa Fe, 25 de mayo 3240, Santa Fe, Argentina.

² Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), Paraje El Pozo, Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina.

³ Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, Buenos Aires, Argentina

* E-mail: ltruppia@yahoo.com.ar. Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: Se analizaron cepas de enterobacterias con resistencia simultánea a oximinocefalosporinas y fluorquinolonas aisladas entre febrero y agosto de 2007 de pacientes hospitalizados en el Sanatorio Médico de Diagnóstico y Tratamiento, Santa Fe Argentina. Mediante PCR multiplex, se detectó la presencia de genes *qnr* en 4 de las 30 cepas analizadas, representando el 13% de las cepas estudiadas. Se detectó la presencia del gen *qnrB* en dos cepas de *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae* respectivamente. Ninguna de las cepas estudiadas mostró la presencia de genes *qnrA* ni *qnrS*.

PALABRAS CLAVE: Enterobacterias. Resistencia simultánea. Genes *qnr*.

SUMMARY: Detection of *qnr* genes in enterobacteriaceae isolates

with simultaneous resistance to oximinocephalosporins and fluoroquinolones.

Enterobacteriaceae strains with simultaneous resistance to oximinocephalosporins and fluoroquinolones isolated from hospitalized patients in Sanatorio Medico de Diagnóstico y Tratamiento, Santa Fe Argentina, between February and August 2007 were analyzed.

qnr genes was detected by multiplex PCR, in 4 of 30 tested strains, representing 13% of them. *qnrB* gene was detected in two strains of *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* respectively. *qnrA* and *qnrS* genes were not detected in the studied strains.

KEYWORDS: Enterobacteriaceae. Simultaneous resistance. *qnr* genes.

Introducción

Los β -lactámicos y las fluorquinolonas constituyen dos familias de antibióticos de importante aplicación clínica ya que poseen un amplio espectro de acción frente a diversas especies bacterianas y versatilidad en cuanto a su forma de administración. Sin embargo, las bacterias han desarrollado una variedad de estrategias que les permite evadir su acción letal. El uso y abuso de antibióticos juega un papel decisivo en la evolución, diseminación y el establecimiento de los elevados niveles de resistencia al cual nos enfrentamos hoy en día, siendo muchas cepas clínicas sólo sensibles a los carbapenems (1,2,3,4,5,6). Así mismo, la selección de mutantes resistentes a los carbapenems tiene relación directa con la forma y frecuencia de su uso, hecho que ha sido debidamente documentado por diversos autores (6,7,8,9,10,11,12,13,14). La hidrólisis enzimática mediada por β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más eficiente frente a oximinocefalosporinas, siendo CTX-M-2 la β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) de mayor prevalencia en Argentina (3,5). Se ha descrito su ubicación en un integrón (In) compuesto de clase I, el cual ha sido secuenciado a partir de aislamientos de *Salmonella enterica serovar Infantis* (InS21) (4), *Morganella morganii* (In116) (13) y *Proteus mirabilis* (In35) (1). Debido a las ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas, las fluorquinolonas son una alternativa de primera línea en el tratamiento de infecciones con cepas multiresistentes en pacientes internados y de la comunidad. Entre los mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos, es de creciente interés mundial el análisis de los determinantes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*; con sus diversas variantes alélicas.

Los genes *qnr* se encuentran localizados por lo general en plásmidos transmisibles por conjugación y asociados a transposones e integrones clase I, lo que determina un gran potencial de diseminación. Este mecanismo fue reportado por primera vez en 1998 en un aislamiento clínico de *Klebsiella pneumoniae*, reconociéndose el gen *qnrA*, que codifica para una proteína de 218 aminoácidos que ejerce una acción de protección del sitio blanco, la cual interfiere en la interacción DNA-girasa y DNA-topoisomerasa IV, confiriendo resistencia al ácido nalidíxico e incrementando más de 20 veces los valores de CIM a fluorquinolonas. En la actualidad se reconocen 7 variantes de *qnrA* (*qnrA1*–*qnrA7*). Posteriormente se reconocieron otros 4 genes de resistencia mediado por plásmidos denominados *qnrB* (25 variantes alélicas, *qnrB1*–*qnrB25*), *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* (4 variantes alélicas, *qnrS1*–*qnrS4*) (15, 16, 17, 18, 19). El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de genes *qnr* en aislamientos clínicos de enterobacterias con resistencia simultánea a oximinocefalosporinas y fluorquinolonas.

Materiales y métodos

Sobre un total de 788 enterobacterias aisladas entre febrero y agosto de 2007, 56 aislamientos (7,1%) mostraron resistencia simultánea a oximinocefalosporinas, ácido nalidíxico y ciprofloxacina; tomando como puntos de corte los propuestos por el CLSI[®].

Se seleccionaron al azar 30 cepas aisladas consecutivamente con esta resistencia simultánea. La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales. La susceptibilidad a β -lactámicos y fluorquinolonas se realizó por el método de difusión con discos (Difco), siguiendo las recomendaciones del CLSI[®];

ensayándose los siguientes antibióticos: ampicilina (10 μ g), ampicilina + ácido clavulánico (20/10 μ g), piperacilina (100 μ g), cefalotina (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), cefotaxima + ácido clavulánico (30/10 μ g), ceftazidima (30 μ g), ceftazidima + ácido clavulánico (30/10 μ g), cefepime (30 μ g), imipenem (10 μ g), ácido nalidixico (30 μ g), norfloxacin (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), levofloxacina (5 μ g), gatifloxacina (10 μ g), moxifloxacina (10 μ g) y pefloxacina (5 μ g). Por el método de dilución en agar se siguieron las normas establecidas por el CLSI²¹, ensayándose los siguientes antibióticos: ampicilina (Bago), ampicilina (Bago) + clavulanato de litio (Roemmers), piperacilina (Wyeth), cefalotina (Glaxo), cefoxitina (Saporiti), cefotaxima (Hoechst Marion Roussel), cefotaxima (Hoechst Marion Roussel) + clavulanato de litio (Roemmers), ceftazidima (Glaxo), ceftazidima (Glaxo) + clavulanato de litio (Roemmers), cefepime (Bristol-Myers Squibb), imipenem (Merck-Sharp and Dohme), ciprofloxacina (Roemmers) y ácido nalidixico (Delta). Para la detección fenotípica de BLEE se realizó el método de sinergia de doble disco, ensayando discos de cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepime (30 μ g) y amoxicilina + ácido clavulánico (20 μ g /10 μ g) de acuerdo a lo descrito en la literatura²². Las placas se incubaron 18-24 hs a 37°C en atmósfera aeróbica. Los aislamientos que presentaron un ensanchamiento en el área de inhibición comprendida entre los discos de cefotaxima (30 μ g) - amoxicilina + ácido clavulánico (20 μ g /10 μ g), ceftazidima (30 μ g) - amoxicilina + ácido clavulánico (20 μ g /10 μ g) y cefepime (30 μ g) - amoxicilina + ácido clavulánico (20 μ g /10 μ g), se consideraron positivos para la presencia de BLEE. Para la confirmación de BLEE se ensayaron discos de cefotaxima (30 μ g),

ceftazidima (30 μ g) y cefepime (30 μ g) suplementados con 10 μ g de clavulanato de litio en agar Müller-Hinton, siguiendo los lineamientos propuestos por el CLSI²⁰. Se compararon los diámetros de halos de inhibición de los discos con y sin inhibidor. Un incremento \geq 5 mm en el halo de inhibición del disco que contiene inhibidor fue considerado positivo para la presencia de BLEE. Así mismo se estudió el perfil de hidrólisis enzimático evaluando la actividad enzimática de los extractos crudos por el método iodométrico en placas de 150 mm de diámetro con 50 ml de agar almidón al 1,5% y 800 μ l de una solución I₂/IK con los siguientes antibióticos β -lactámicos como sustrato: ampicilina (500 μ g/ml), amoxicilina + ácido clavulánico (500/4 μ g/ml), cefalotina (1000 μ g/ml), cefotaxima (1000 μ g/ml), ceftazidima (1000 μ g/ml) e imipenem (500 μ g/ml). Se sembraron en placas por triplicado, 20 μ l de cada extracto y se incubaron a 37°C.

Detección de genes de resistencia

Para estudiar la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* se amplificó un fragmento interno mediante PCR, según el protocolo detallado en la tabla 1 y utilizando los primers específicos detallados en la tabla 2. Como controles positivos específicos se utilizaron cepas de *Klebsiella pneumoniae* B1 *qnrB1* (+), *Escherichia coli* S7 (E57) *qnrS1* (+) y *Escherichia coli* *qnrA1* (+).

Los genes que codifican las BLEEs prevalentes se detectaron por PCR usando como molde ADN plasmídico según metodología descrita oportunamente por Truppia et al. Los amplicones *qnrB* obtenidos fueron tercerizados para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando las herramientas informáticas disponibles *on line* (BLAST, CLUSTALW2).

Tabla 1: Protocolo PCR múltiple genes *qnr*.

Reactivo	Volumen (μ l)	Programa de termociclado		
		Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (seg)	Ciclos
Buffer 10X (libre de Mg)*	5	95	300	1 (desnaturalización inicial)
MgCl ₂ 25 mM*	4	94	60	30
dNTP 10mM**	2,5	48	60	
Primer 10 μ M	5	72	45	
Taq DNA pol* 5000 U/ml	0,5	72	600	1 (extensión final)
DNA molde (20-50 ng/ μ l)	3			
H ₂ O milliQ c.s.p.	25			

*Inbio-Highway; **Promega, ***Fagos, Ruralex

Tabla 2: Protocolo PCR múltiple para genes *qnr*.

Primera ^a	Secuencia 5'→3'	Gen	Tm ($^{\circ}$ C)	Tamaño del amplicón (bp*)
qnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA1</i> a <i>qnrA7</i>	62	580
qnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		62	
qnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTGb	<i>qnrB1</i> a <i>qnrB25</i>	60	264
qnrBm-R	TTGCGYGYCGCCAGTCGAAb		62	
qnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS1</i> a <i>qnrS4</i>	58	428
qnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		66	

F y R, primer en sentido y antisentido, respectivamente; M= A o C, H= A, C o T, Y= C o T.

* bp: pares de bases

Tabla 3: Difusión con discos y CIM de las quinolonas ensayadas.

CEPA	Diámetros de halo (mm)							ORIGEN	CIM (μ g/ml)	
	NAL	NOR	CIP	LEVO	MOX	GAT	PEF		ácido nalidixico	ciprofloxacina
<i>Enterobacter cloacae</i> ecl8	6	6	6	6	8	8	6	Herida	> 1024	128
<i>Enterobacter cloacae</i> ecl9	6	6	6	6	8	10	6	Orina	> 1024	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> kpn35	6	6	6	6	10	10	6	Orina	> 1024	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> kpn36	6	6	6	6	10	8	6	Orina	> 1024	64

NAL: ácido nalidixico NOR: norfloxacina CIP: ciprofloxacina LEVO: levofloxacina MOX: moxifloxacina GAT: gatfloxacina PEF: pefloxacina

Resultados y conclusiones

De los 30 aislamientos analizados, se obtuvo amplificación para alguno de los alelos *qnr* en 4 cepas, lo que representó el 13% de los aislamientos estudiados. El resto de los aislamientos que mostraron co-resistencia fenotípica, podrían presentar otros mecanismos de resistencia a quinolonas (alteración del sitio diana, eflujo, modificación enzimática).

El alelo *qnrB* se detectó en 2 aislamientos de *Enterobacter cloacae* y en 2 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*. No hubo amplificación para ninguna de las variantes alélicas de *qnrA* ni *qnrS* en las cepas estudiadas. Los 4 aislamientos *qnrB* positivos exhibieron fenotípicamente la presencia de β -lactamasa de espectro extendido y mostraron resistencia a todas las quinolonas ensayadas (tabla 3). Para confirmar la identidad de los amplicones *qnrB* obtenidos (264 bp), los mismos fueron secuenciados y posteriormente comparados con las secuencias depositadas en bases de datos. En 3 casos (correspondiente a los aislamientos ecl8, ecl9 y kpn35) se obtuvo alta homología para los alelos *qnrB10/qnrB6*, ya descritos en Argentina, y mediante PCR fueron coligados al gen *bla*_{PER-2} que codifica para la BLEE PER-2. El aislamiento Kpn36 mostró homología con *qnrB2/qnrB20* y el mismo fue asociado al gen del grupo *bla*_{CTX-M-2}. El alelo *qnrB10* fue previamente descrito en Argentina en aislamientos clínicos de enterobacterias (23). Este estudio provee los primeros reportes de detección de genes *qnrB* en aislamientos clínicos provenientes de un centro de salud de la ciudad de Santa Fe. Es importante destacar la relación establecida entre la presencia de los determinantes *qnr* y la producción de β -lactamasas de espectro extendido en

aislamientos clínicos de enterobacterias de nuestro medio. Esto tiene un impacto clínico directo debido a que los elevados niveles de resistencia a los cuales se asocian dichos determinantes, expresados como mecanismos de resistencia simultánea, co-transmisibles y seleccionables, impiden la utilización de grandes familias de antibióticos con excelentes ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas, como las penicilinas, cefalosporinas y quinolonas, limitando drásticamente el espectro de antibióticos a utilizar en el tratamiento de estas cepas asociadas a diversas infecciones.

Agradecimientos

Hacemos una mención especial a Nicolás Figueroa por su apoyo técnico. Se agradece al Dr. P. Nordmann y su equipo de trabajo por ceder gentilmente las cepas controles empleadas en la detección de genes *qnr*. Parte de este trabajo fue realizado con fondos CAI+D 2006/2009, UNL (otorgado a JDC). JDC es investigador adjunto del CONICET.

Bibliografía

1. Rossi, A., H. Lopardo, M. Woloj, M.D. Picandet, M. Mariño, M. Galas, M. Radice, and G. Gutkind. (1995). Non-typhoid *Salmonella* spp. resistant to cefotaxime. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:697-702.
2. Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, S. Ernst, and J. M. Casellas. (1996). Sequences of β lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:509-513.
3. Trupia, L. A., Mollerach, A., Di Conza, A., Radice, M., Mugna, V., Mendez, E.,

- Gutkind, G. (2005). Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de β -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; **23**(9):525-8.
4. Di Conza, J., Ayala, J. A., Power, P., Mollerach, M. and Gutkind, G. (2002). Novel Class 1 integron (InS21) carryng *bla*CTX-M-2 in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46** (7): 2257-2261.
5. Quinteros M., M. Radice, N. Gardella, M.M. Rodríguez, N. Costa, D. Korbenfeld, E. Couto and G. Gutkind. (2003). Extended-spectrum β -lactamasas in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(9):2864-2867.
6. Humeniuk, C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia, A. Philippon. (2002). β -lactamase of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**:3045-3049.
7. Radice, M. Power, P. Gutkind, G., Fernandez, K. Vay, C., Famiglietti, A., Ricover, N. and Ayala, J. A. (2004). First Class A Carbapenemase Isolated from Enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1068-1069.
8. Nordmann, P. And L. Poirel (2002). Emerging Carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:321-331.
9. Yigit, H., A.M. Queenan, G.J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J.W. Biddle, C.D. Stewart, S. Alberti, K. Bush and F.C. Tenover (2001). Novel Carbapenem-hydrolyzic β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1151-1161.
10. Woodford, N., Tierno, P. M. Young, K., Tysall, L., Palepou, M. F. I., Ward, E., Painter, R. E., Suber, D. F., Shungu, D., Silver, L. L., Inglima, K., Kornblum, J. and Livermore D. M. (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4793-4799.
11. Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M. J. and Correia, A. (2003). Molecular Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD 54. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2321-2324.
12. Yigit, H., A.M. Queenan, J. Kamile Rasheed, J.W. Biddle, A. Domenech-Sanchez, S. Alberti, K. Bush and F.C. Tenover (2003). Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzic β -lactamase, KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3881-3889.
13. Mainardi, P, Mugnoier, A., Coutrot, A., Buu-Hoi, E., Clatz, E. and Gutaman, L. (1997). Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2352-2354.
14. Pasteran F, Cagnoni V, Rapoport M, Faccione D, Guerriero L, Red Whonet-Argentina, et al. (2004). *Klebsiella pneumoniae* con actividad enzimática frente a carbapanemes en Argentina: Desde la franca resistencia hasta la aparente sensibilidad. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología. Resumen 17, Buenos Aires, Argentina.
15. RobicsekA, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergente of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**:629-40.
16. Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D. C., and Wang, M. (2009). New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, qnrC, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1892-1897.
17. Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S. and Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance

in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin.

Antimicrob. Agents Chemother. 53:603-608.

18. Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. and Robicsek, A. (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. Clinical Microbiology Reviews **22** (4): 664–689.

19. Jacoby, G., V. Cattoir, D. Hooper, L. Martínez-Martínez, P. Nordmann, A. Pascual, L. Poirel, and M. Wang. 2008. *qnr* gene nomenclature. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:2297-2299.

20. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, Seventh Edition, Approved standard, Document M2-A7, Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos de America.

21. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000). Methods for dilution susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Fifth Edition, Approved standard, Document M7-A5, Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos de America.

22. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases Conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988; **10**:867-78. [Medline]

23. Quiroga, M. P., Andres, P. Petroni, A., Soler Bistué, A. J. C. Leonor Guerriero, Liliana Jordá Vargas, L., Zorreguieta, A., Tokumoto, M., Quiroga, C., Tolmasky, M. E., Galas, M. and Centroón, D. (2007). Complex Class 1 Integrons with Diverse Variable Regions, Including *aac(6)-Ib-cr*, and a Novel Allele, *qnrB10*, Associated with ISCR1 in Clinical Enterobacterial Isolates from Argentina. Antimicrob. Agents Chemother **51**(12): 4466–4470.