Universitat
de les Illes Balears

# Actividad de una nueva combinación de β-lactámico e inhibidor de β-lactamasas (imipenem/relebactam).

Rocío Antonela Orellana Ponce

**Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

Máster Universitario en Microbiología Avanzada
(Especialidad/Itinerario Investigación en Microbiología Sanitaria)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2018-2019

*Fecha: 17/09/209*

*Nombre Tutor del Trabajo: Dra. Laura Zamorano*

# ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas con mayor capacidad de desarrollar resistencia a antibióticos, ya sea por mutaciones cromosómicas o por la adquisición de genes de resistencia; lo que conlleva a la necesidad de desarrollar nuevos fármacos. El relebactam, un nuevo inhibidor de β-lactamasas no β-lactámico, es capaz de actuar juntamente con el imipenem, un antibiótico carbapenémico, y han demostrado un aumento de sensibilidad en cepas de *K. pneumoniae*. Por esto, la combinación imipenem/relebactam es una de las apuestas para tratar infecciones causadas por cepas MDR y XDR de *P. aeruginosa*. Mediante microdiluciones en caldo, se realizaron CMIs de 946 cepas (pertenecientes a una colección más grande) de *P. aeruginosa* ampliamente caracterizadas. Las tasas de sensibilidad obtenidas fueron más altas (96,2%) que las conocidas hasta el momento, como ceftolozano/tazobactam (94,6%) o ceftazidima/avibactam (94,2%). Las cepas de *P. aeruginosa* que presentaron resistencia a esta combinación eran productoras de carbapenemasas. La combinación imipenem/relebactam, por tanto, ha demostrado ser una combinación atractiva para el tratamiento de cepas de *P. aeruginosa* MDR y XDR, ya que el relebactam redijo notablemente el desarrollo de resistencia a imipenem.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN ..... 1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ..... 7
**Hipótesis** ..... 7
**Objetivos** ..... 7
MATERIALES Y MÉTODOS ..... 8
**Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*** ..... 8
**Microdilución en caldo** ..... 8
RESULTADOS ..... 9
**Prevalencia de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos** ..... 9
**Epidemiología molecular de cepas *P. aeruginosa* XDR** ..... 12
**Prevalencia de *P. aeruginosa* productoras de BLEEs y carbapenemasas** ..... 13
DISCUSIÓN ..... 15
CONCLUSIÓN ..... 18
BIBLIOGRAFÍA ..... 19

# INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista, bacilo gramnegativo móvil, no fermentador, aerobio, oxidasa y catalasa positivo (Azam & Khan, 2019; Pang, Raudonis, Glick, Lin, & Cheng, 2019). Su nombre proviene del griego *pseudes*, "falso", y *monas*, "unidad", debido a la gran diversidad de las especies que se engloban en este género, y *aeruginous* en referencia al pigmento verde que sintetiza. El genoma de *P. aeruginosa*, comparado con bacterias como *Escherichia coli* (4.6 Mpb) o *Mycobacterium tuberculosis* (4.4 Mpb), es relativamente grande, ya que su longitud puede variar de 5.5 Mpb a 7 Mpb; se ha visto que el genoma de *P. aeruginosa* codifica para una gran cantidad de enzimas implicadas en el metabolismo, transporte y salida de compuestos orgánicos, lo que le confiere una gran versatilidad metabólica y una gran adaptabilidad frente a cambios ambientales (Pang et al., 2019). *P. aeruginosa* es capaz de infectar/colonizar diversos nichos ecológicos, entre ellos hábitats acuáticos y suelos, animales o plantas (Oliver, Mulet, López-Causapé, & Juan, 2015), en la actualidad, las cepas de *P. aeruginosa* han conseguido adaptarse al ambiente hospitalario, donde provoca el 10% de las infecciones a nivel mundial (Azam & Khan, 2019; Chatterjee et al., 2016). Al tratarse de un patógeno oportunista, posee unas tasas de morbilidad y mortalidad elevadas en pacientes con fibrosis quística o pacientes inmunocomprometidos (pacientes con cáncer o SIDA); rara vez provocará infecciones en individuos sanos (Azam & Khan, 2019; Pang et al., 2019). *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria más común asociada a infecciones nosocomiales, neumonía asociada a ventilación, fibrosis quística, meningitis, abscesos, infecciones de tejidos blandos, infecciones del tracto urinario, dermatitis, otitis externa, entre otras (Azam & Khan, 2019; Chatterjee et al., 2016; Pang et al., 2019); debido a esto, las cepas de *P. aeruginosa* se pueden aislar de varias fuentes, por ejemplo: pacientes con infecciones nosocomiales, heridas por quemaduras, infecciones del tracto urinario e infecciones pulmonares; también se pueden aislar de las instalaciones hospitalarias, como del equipo médico, inhaladores, equipos de diálisis, respiradores, equipos de anestesiología y vaporizadores, así como de inodoros y lavabos (Azam & Khan, 2019).

La patogénesis de *P. aeruginosa* es multifactorial y combinada, hasta el momento se sabe que produce dos tipos de infecciones: agudas (se liberan células citotóxicas que inducen una reacción inflamatoria aguda) y crónicas; las infecciones crónicas se producen en pacientes inmunocomprometidos, pacientes con fibrosis quística y en pacientes que estén bajo

tratamiento con quimioterapia, y se caracteriza por el desarrollo de biopelículas (biofilms) (Valentini, Gonzalez, Mavridou, & Filloux, 2018).

Una de las características más importantes es la capacidad que presenta *P. aeruginosa* en desarrollar resistencia a diferentes tipos de antibióticos, lo que dificulta su tratamiento y erradicación. La creciente prevalencia de infecciones adquiridas en el hospital, producidas por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos (MDR) o ampliamente resistentes a fármacos (XDR), está asociada a tasas de morbilidad y mortalidad significativas (Pea et al., 2015). Según Magiorakos *et al.*, el perfil MDR se define como la no sensibilidad a, al menos, un agente en, al menos tres clases de antibióticos; mientras que el perfil XDR se define como la no sensibilidad a, al menos, un agente en todas las clases de antibióticos (Magiorakos et al., 2012). La resistencia desarrollada por *P. aeruginosa* a diferentes fármacos viene dada por los mecanismos de defensa que posee esta bacteria, que son tres:

- Resistencia intrínseca: es la capacidad innata de un microorganismo para resistir a los agentes antimicrobianos. En *P. aeruginosa* implica varios mecanismos: disminución de la permeabilidad de la membrana externa, producción de enzimas inhibidoras de antibióticos y la expresión de bombas de eflujo en bacterias resistentes a múltiples fármacos, que se explicarán a continuación.
    - En primer lugar, la barrera de permeabilidad de membrana externa evita que entren los antibióticos en las células bacterianas (Azam & Khan, 2019; Pang et al., 2019; Pea et al., 2015), y en *P. aeruginosa* es una bicapa asimétrica de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS), contiene cuatro tipo de porinas incrustadas: no específicas (OprF), específicas (OprB, OprD, OprE, OprO y OprP), cerradas (OprC y OprH) y de flujo (OprM, OprN, OprJ), que forman estructuras secundaria de tipo barril β. La permeabilidad de esta membrana es extremadamente restringida, ya que la porina predominante, OprF, tiene una conformación de canales cerrados superior al 95%, frente a una pequeña fracción de canales abiertos (<5%), lo que explica la permeabilidad de la membrana externa; la ausencia de OprF en *P. aeruginosa* también produce un incremento en la formación de biopelículas (Pang et al., 2019). OprD es una porina específica que está involucrada en el proceso de captación de antibióticos, tiene sitios de unión a carbapenemas (antibiótico β-lactámico), por lo que la ausencia de OprD incrementa la resistencia de *P. aeruginosa* a esta clase de antibióticos (Azam & Khan, 2019; Pang et al., 2019).

- En segundo lugar, la producción de enzimas inhibidoras de antibióticos confiere resistencia al hidrolizar los antibióticos, por ejemplo, la enzima hidrolítica AmpC β-lactamasa, que es secretada por la inducción del gen *ampC*, y que no se inhibe por la presencia de ácido clavulánico; es capaz de hidrolizar a la mayoría de los antibióticos β-lactámicos, como carbapenémicos. Este tipo de resistencia incluye la producción de enzimas por parte del DNA cromosómico y plasmídico (Azam & Khan, 2019; Pang et al., 2019).
- En tercer y último lugar, *P. aeruginosa* cuenta con mecanismos de resistencia producidos por sistemas de flujo, que permiten regular el ambiente interno mediante el bombeo de antibióticos al exterior celular. Las bombas de flujo están divididas en cinco familias, de las cuales las más relevantes en la resistencia de *P. aeruginosa* son la familia de resistencia-nodulación-división (RND), que expulsan β-lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos; la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE), y la familia de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR) (Azam & Khan, 2019; Pang et al., 2019).

➢ Resistencia adquirida: es la capacidad que tienen las bacterias para ganar resistencia a antibióticos a través de mutaciones de genes cromosómicos o mediante la adquisición de genes de resistencia a través de transferencia horizontal de genes, de los que cobran especial importancia aquellos que codifican para carbapenemasas de clase B (metalo-β-lactamasas) o β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs). Este tipo de resistencia, junto con la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*, contribuye al desarrollo de cepas resistentes a múltiples fármacos y a cepas ampliamente resistentes a fármacos, aumentando de esta manera la dificultad de erradicar este microorganismo. La resistencia aumentará en *P. aeruginosa* si los genes mutados son claves en la resistencia intrínseca, por ejemplo: sobreexpresión de genes de las bombas de flujo, hidrolasas β-lactámicas o inactivación de la porina OprD. La adquisición de genes de resistencia en *P. aeruginosa* se obtienen mediante transferencia horizontal de genes por transformación, transducción y conjugación (Azam & Khan, 2019; Pang et al., 2019).

➢ Resistencia adaptativa: este tipo de resistencia difiere un poco de los primeros casos, ya que depende del ambiente en que se encuentre el microorganismo, y consiste en la capacidad de la bacteria para sobrevivir a un ataque con antibióticos debido a

alteraciones en la expresión de genes y/o proteínas en respuesta a un estímulo ambiental; en *P. aeruginosa* encontramos como respuesta adaptativa la formación de biopelículas y la generación de células resistentes a antibióticos (células que no son genéticamente resistentes a los fármacos, pero que son tolerantes a altas concentraciones del mismo, es decir, tienen un fenotipo transitorio, posiblemente adquirido por formar parte de una biopelícula) (Azam & Khan, 2019; Pang et al., 2019).

La epidemiología molecular de aislados de P. aeruginosa revelan una gran diversidad clonal, donde la mayoría están representados por genotipos únicos. Existen más de 2000 secuenciotipos (ST) descritos, aun así, la detección de nuevas variantes es muy frecuente (Oliver et al., 2015). El estudio multicéntrico de infecciones del torrente sanguíneo de *P. aeruginosa* realizado en España reveló que la gran mayoría de aislados sensibles a fármacos pertenecían a genotipos únicos (Cabot et al., 2012; Mulet et al., 2013), mientras que en cepas MDR y especialmente, XDR, la diversidad clonal es mucho mayor; donde el 90% de los aislados XDR pertenecían a tres clones mayoritarios: ST111, ST175 y ST235, que son los principales clones distribuidos a nivel mundial de alto riesgo (Pea et al., 2015). El ST235, que tiene una distribución más amplia que el resto de *ST's*, y está asociado con el serotipo O11; el ST111, está asociado con el serotipo O12 y presenta también una distribución mundial; el ST175, distribuido en la mayoría de los países europeos; y asociado con el serotipo O4. Además, se ha visto que existe una asociación entre los clones de alto riesgo y los mecanismos de resistencia transferibles, especialmente en la adquisición de β-lactamasas por transferencia horizontal (Oliver et al., 2015); también se observó que los clones de alto riesgo están estrechamente relacionados con mecanismos de resistencia mutacional (Oliver et al., 2015). Un ejemplo de los mecanismos de resistencia responsables del fenotipo XDR de ST175 en hospitales españoles, incluyen mutaciones en la proteína expresada por el gen ampR (AmpR) que conlleva a una hiperproducción de AmpC, siendo el gen ampR el inductor de la β-lactamasa AmpC; una mutación inactivadora en la porina OprD, una mutación en MexZ (que conduce a una sobreexpresión de MexXY) y tres mutaciones específicas que conducen a alteraciones de aminoácidos en las regiones determinantes de la resistencia quinolonas (mutaciones QRDR), dentro de las subunidades que constituyen las topoisomerasas II (GyrA y GyrB) y IV (ParC y ParE) (Hocquet, Bertrand, Köhler, Talon, & Plésiat, 2003; Oliver et al., 2015).

Como se ha comentado anteriormente, la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a los antibióticos y su capacidad de desarrollo de nuevas resistencias mediante mutaciones puntuales, por ejemplo, en *ampR*, que induce a la hiperproducción de la β-lactamasa AmpC, conlleva a la resistencia a todas las penicilinas (incluyendo combinaciones con inhibidores de betalactamasas, como piperaciclina-tazobactam), cefalosporinas (ceftazidima y cefepima) y monobactámicos (aztreonam); otros factores que ayudan en la resistencia intrínseca son la hiperexpresión de bombas de flujo codificadas por su genoma (como MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM, que dependiendo de la bomba implicada, puede afectar a la mayoría de β-lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos), así como la porina OprD, cuya inactivación confiere resistencia a carbapenemas (como imipenem y meropenem) (Livermore, 2002). Además, *P. aeruginosa*, al ser capaz de adquirir resistencias mediante transferencia horizontal en forma de casetes génicos situados entre integrones, presentes en plásmidos o transposones, ha adquirido a lo largo del tiempo β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), carbapenemasas (en especial de clase B, metalo-β-lactamasas) y, frecuentemente, genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Nicolau & Oliver, 2010; Oliver et al., 2015). La adquisición de estos genes lleva a la formación de cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR) y ampliamente resistentes a fármacos (XDR). Las carbapenemasas más diseminadas en *P. aeruginosa* pertenecen a tres de las cuatro clases de Ambler: A y D, cuyo centro activo tiene una serina, y B (metalo-β-lactamasas (MBL), dependientes de zinc). En España, el segundo estudio nacional sobre la evolución de la resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* ha mostrado que, en los últimos años, la resistencia a imipenem (carbapenemasa) ha pasado de un 14% a un 18% (Sánchez-Romero et al., 2007). Las carbapenemasas de clase A, que pertenecen al grupo 2f (Bush et al), son: SME, IMI, NMC, KPC y GES; todas presentan tres motivos altamente conservados que son esenciales para su actividad hidrolítica sobre β-lactámicos. Las carbapenemasas de clase B representan el grupo más importante de las carbapenemasas, en especial las de clase B1, las metalo-β-lactamasas (MBL), que disponen de un motivo de unión al zinc tipo His-X-His-X-Asp. Existen ocho grupos de MBLs: IMP, VIM, SPM, SIM, entre otras; donde las más relevantes en *P. aeruginosa*, debido a que las más extendidas son IMP y VIM. De las carbapenemasas de clase D, la que cobra más importancia es OXA, con cuatro motivos bien conservados, que contribuyen a la hidrólisis de β-lactámicos, ésta hidrólisis es más eficaz sobre el imipenem que sobre el meropenem (Nicolau & Oliver, 2010).

Los mecanismos de resistencia previamente descritos y la adquisición de genes de resistencia a antibióticos hacen que el tratamiento dirigido a *P. aeruginosa* sea extremadamente delicado. Hasta el momento, la única opción terapéutica para pacientes con infecciones graves causadas por cepas MDR, era la colistina, que es un fármaco concentración-dependiente; sin embargo, estudios recientes han observado que, a pesar de haber superado los riesgos de nefrotoxicidad y neurotoxicidad, algunas cepas han comenzado a desarrollar resistencia a la colistina (Pérez et al., 2019; Sorlí et al., 2017). Ante esta situación, han surgido nuevas combinaciones como posibles tratamientos contra *P. aeruginosa* MDR, entre ellos ceftolozano/tazobactam o ceftazidima/avibactam, que presentan porcentajes de resistencia de 5.4% y 5.8% respectivamente, según un estudio realizado en España (Del Barrio-Tofinõ et al., 2019), sin embargo, el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos es una prioridad clave frente a este tipo de patógenos.

El relebactam es un nuevo inhibidor de β-lactamasas, desarrollado para el uso combinado con carbapenemas (como imipenem). Se trata de un inhibidor no β-lactámico de β-lactamasas de clase A, entre ellas las BLEEs y KPC, además de β-lactamasas de clase Cb, como la cefalosporinasa AmpC. Un estudio ha demostrado que, cuando se combina con imipenem contra *K. penumoniae*, productora de KPC, los valores de CMI disminuyen 64 veces (Del Barrio-Tofinõ et al., 2019; Lob et al., 2019; Schmidt-Malan, Mishra, Mushtaq, Brinkman, & Patela, 2018). Las cepas de *P. aeruginosa* poseen múltiples mecanismos de resistencia, sin embargo, la resistencia a imipenem resulta de la pérdida de la permeabilidad de la membrana junto con la producción de AmpC. La combinación imipenem/relebactam es una de las apuestas para tratar infecciones causadas por cepas de *P. aeruginosa* MDR y XDR, ya que el imipenem no es sustrato de la bomba de eflujo principal (MexA-MexB-OprM) y el relebactam no es inductor de cefalosporinasas derivadas de *Pseudomonas* (PDCs, del inglés *Pseudomonas-derived cephalosporinases*), como AmpC; además, el relebactam es un potente inactivador de PDCs, por lo que inhibe la hidrólisis de imipenem a nivel basal (Lob et al., 2019).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

- La combinación del imipenem/relebactam podría ser altamente activo contra aislados MDR/XDR de *P. aeruginosa*, incluidas las cepas de clones de alto riesgo más extendidos.
- El uso del relebactam reduciría notablemente el desarrollo de resistencia al imipenem.

## Objetivo

El objetivo del presente trabajo consiste en analizar la actividad de la combinación de imipenem/relebactam contra una colección nacional de aislados clínicos de *P. aeruginosa* ampliamente caracterizadas.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Se analizaron 946 cepas, pertenecientes a un estudio nacional realizado por el Grupo de Estudio de Pseudomonas GEMARA-SEIMC/REIPI. Las muestras se recogieron durante el mes de octubre de 2017, en 51 hospitales de las 17 regiones de España. Las cepas se clasificaron tanto por el tipo de muestra (abscesos, aspirado traqueal, biopsias, broncoaspirado, orina, sangre, esputo, piel y tejidos blandos, etc.), como por su origen (UCI, servicios quirúrgicos, urgencias, consultas externas).

## Microdilución en caldo

El protocolo utilizado para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI, entendida como la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano) de imipenem e imipenem/relebactam se basó en el método de microdiluciones en caldo de MHB (Mueller-Hinton Broth). Para ello, se utilizó una placa de 96 pocillos para cada tratamiento, es decir, una para imipenem y otra para la combinación imipenem/relebactam. La concentración de imipenem en ambas placas fue decreciente (desde 64µg/mL a 0.125µg/mL); mientras que en la placa de imipenem/relebactam, se añadió una concentración fija de relebactam (4µg/mL). En cada pocillo se añadió una concentración de bacterias de 10^5 UFC/mL (0.5 McFarland Standard) para la inoculación en las placas. Las CMIs se determinaron según las directrices de EUCAST (www.eucast.org), utilizando los puntos de corte clínicos EUCAST v 8.1 y la nueva versión 9.0 para la interpretación (Version 9.0, 2005). Los perfiles de resistencia se definieron de acuerdo con Magiorakos *et al.* El perfil MDR se definió como la no-sensibilidad a, al menos, un agente en, al menos, tres clases de antibióticos; el perfil XDR se definió como la no-sensibilidad a, al menos, un agente en todas las clases de antibióticos, excepto una o dos (Magiorakos et al., 2012). La cepa de referencia utilizada fue PAO1.

## RESULTADOS

Las cepas analizadas en este proyecto pertenecen, como se ha comentado anteriormente, al Grupo de Estudio de Pseudomonas GEMARA-SEIMC/REIPI y se encuentran ampliamente caracterizadas. En los estudios realizados por este grupo, se secuenció el genoma de varias cepas y se realizó un análisis de la sensibilidad a trece antibióticos (ticarcilina, tazobactam, ceftazidima, cefepima, ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, aztreonam, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, tobramicina, amikacina y colistina), obteniendo los perfiles de sensibilidad de las cepas. La presencia de carbapenemasas y BLEEs se determinó mediante métodos fenotípicos y PCR. La epidemiología clonal se evaluó mediante PFGE y MLST (Del Barrio-Tofinõ et al., 2019). Los datos obtenidos por el grupo serán de gran importancia para el presente trabajo .

### Prevalencia de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos

De las 946 cepas estudiadas, y gracias a los estudios previamente realizados, se ha visto que el 8,6% corresponde a cepas MDR, el 19,2% a cepas XDR y el 0,1% a cepas panresistentes (PDR, definidas como cepas resistentes a todos los agentes antimicrobianos probados), como se puede observar en la *Figura 1*.

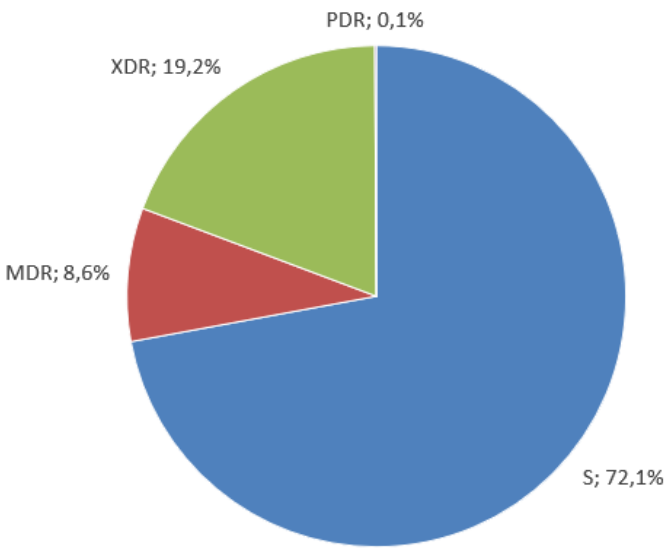


*Figura 1. Distribución de los perfiles de sensibilidad en cepas de P. aeruginosa*

El análisis de sensibilidad antimicrobiana, mediante CMIs, mostró diferencias entre el tratamiento con imipenem y la combinación imipenem-relebactam. Como se puede observar en la distribución de las CMIs (*figura 2*) y en la *tabla 1*, el porcentaje de resistencia que presentan las cepas frente al imipenem es del 22,1%, mientras que frente a imipenem-relebactam el porcentaje es más bajo, 3,6%. También en la CMI50/90 se ven diferencias, para imipenem la CMI50 es de 2 mg/L y la CMI90 de 16 mg/L, mientras que para la combinación imipenem-relebactam la CMI50 es de 0,25 mg/L y la CMI90 de 1 mg/L, según los puntos de corte establecidos por EUCAST del 2019; si se comparan estos resultados con la versión 8.1, se observan ligeras diferencias, en especial en el porcentaje de resistencia del imipenem, ya que en la nueva versión no existe la categoría intermedio (I).

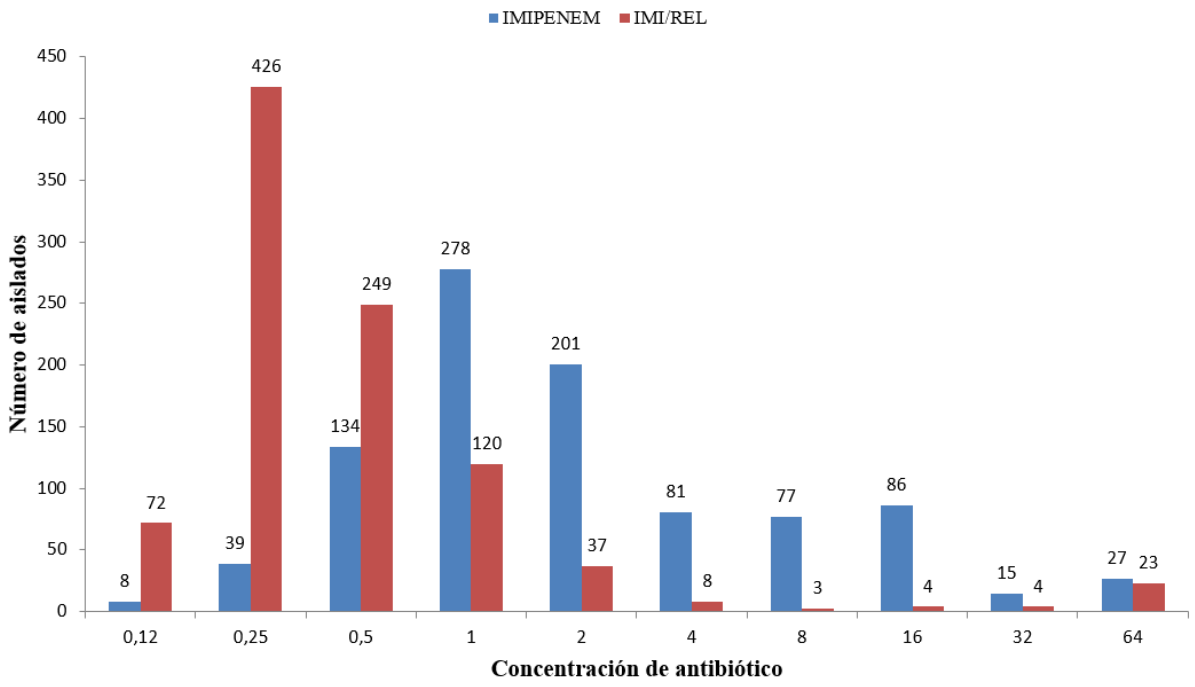


*Figura 2. Distribución de CMIs. Imipenem e imipenem/relebactam*

*Tabla 1. Sensibilidad antimicrobiana de las 946 cepas de P. aeruginosa analizadas*

| | **ANTIBIÓTICOS** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | IMIPENEM | | IMIPENEM/RELEBACTAM | |
| | EUCAST 2018 | EUCAST 2019 | EUCAST 2018 | EUCAST 2019 |
| CMI50 | 2 | 2 | 0,25 | 0,25 |
| CMI90 | 16 | 16 | 1 | 1 |
| %S | 78,16% | 77,9% | 96,2% | 96,4% |
| %R | 13,53% | 22,09% | 3,3% | 3,6% |

Las muestras de origen respiratorio (33,4%), piel, tejidos blandos y osteoarticulares (PBO, 29,4%) y orina (24,7%) fueron las más frecuentes, mientras que las muestras de origen sanguíneo representan un 6,7% del total de las muestras (*figura 3a*). Como se puede observar en la *figura 3b*, la mayor parte de las cepas de *P. aeruginosa* según el servicio del cual se extrajo, provienen de la categoría "otros" (54,2%), compuesta por servicios médicos adultos y pediátricos, centros sociosanitarios, consultas externas, entre otras; mientras que las cepas que provienen de servicios médicos quirúrgicos representan un 18,8%, las de urgencias un 17,4% y las de la UCI un 9,5%.

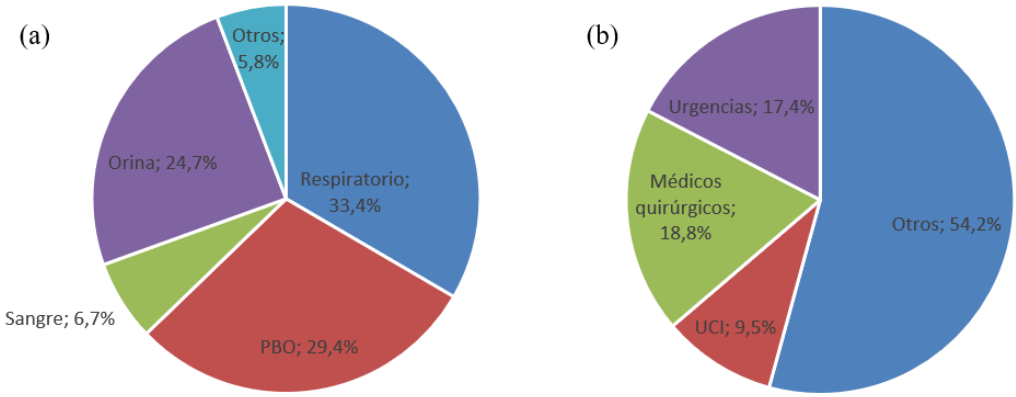


*Figura 3. Distribución de los aislados (a) según el tipo de muestra, (b) según el servicio*

Según el tipo de muestra, también se analizó el porcentaje de resistencia a cada tratamiento (imipenem e imipenem/relebactam). En la *figura 4a* se puede observar una gran diferencia

entre los dos tratamientos, las mayores diferencias se encuentran en las muestras de "otros", donde pasa de un 23,6% de resistencia a imipenem a un 1,8% de resistencia a la combinación de imipenem/relebactam; seguido de las muestras de origen respiratorias, donde el porcentaje de resistencia a imipenem es de 23,7% y el de imipenem/relebactam de 3,5%; en tercer lugar, están las muestras de piel, tejidos blandos y osteoarticulares (PBO), que pasa de un 19,8% de resistencia a imipenem a un 2,5% de resistencia a imipenem/relebactam.

De la misma manera, se analizó el porcentaje de resistencia de cada tratamiento según el servicio del que proviene la muestra **(***figura 4b***)**, donde la mayor diferencia se encuentra en las muestras provenientes de la UCI, que pasa de un 36,7% de resistencia a imipenem a un 3,1% de resistencia a imipenem/relebactam; le siguen las muestras quirúrgicas, donde hay un 27% de resistencia a imipenem, y 3,4% de resistencia a imipenem/relebactam.

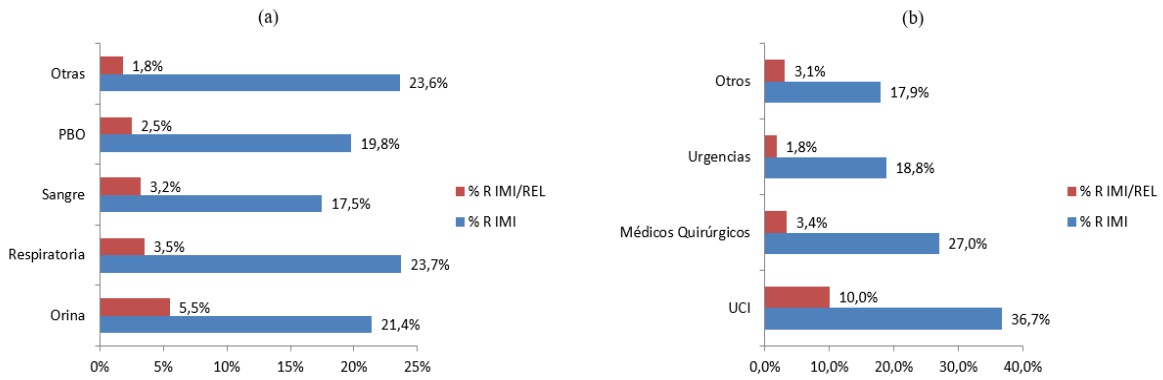


*Figura 4. Porcentaje de aislados resistentes a la nueva combinación imipenem/relebactam: (a) según el tipo de muestra, (b) según el servicio*

## Epidemiología molecular de cepas *P. aeruginosa* XDR

El 19,2% (182 aislados) de las cepas estudiadas presenta un perfil XDR. Gracias a los estudios previamente realizados con estas muestras, se ha podido conocer el porcentaje de los principales ST, como ST235, ST175 y ST111, en España. El de mayor prevalencia es el ST175 (44,5%), seguido de ST235 (12,6%) y, por último, el ST111 (2,7%); el resto de *ST's* conforma el 40,1% del total de los 182 aislados (*figura 5).*

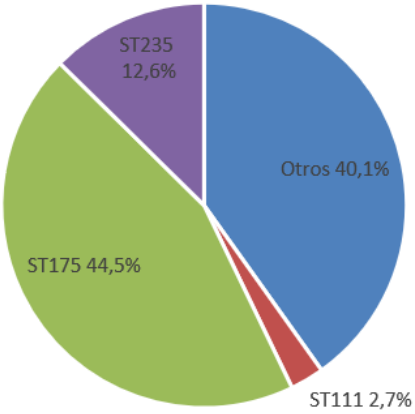


*Figura 5. Distribución de los ST principales en cepas XDR*

**Prevalencia de *P. aeruginosa* productoras de BLEEs y carbapenemasas**

De las 946 cepas, 56 aislados (5,9%) producen carbapenemasas o BLEEs adquiridas (doce cepas presentan ambas) (*tabla 2)*. Todas las cepas, menos cuatro, presentan un perfil XDR, siendo el 28,6% de los aislados XDR. Las carbapenemasas mayormente detectadas fueron MBLs, entre ellas, las VIM (2,54% del total de aislados, 11,54% de aislados XDR), que incluye: VIM-1 (n=3), VIM-2 (n=9) y VIM-20 (n=12); se detectó BLM IMP (0,21% del total de aislados, 1,1% de aislados XDR), donde encontramos IMP-1 (n=1) e IMP-8 (n=1); de las carbapenemasas GES había un total de nueve aislados (representado un 0,95% del total de aislados y un 4,9% de aislados XDR), entre los que se encuentran GES-1 (n=2), GES-5 (n=4) y GES-1 y GES-5 (n=3). Las β-lactamasas presentes en estas cepas son: CARB, OXA y PER. CARB está presente en cuatro aislados (0,42% de aislados totales, 2,2% aislados XDR), que incluye CARB-1 (n=3) y CARB-12 (n=1); OXA, la β-lactamasa más numerosa, se encuentra en un total de 25 aislados (representa el 2,64% de los aislados totales y un 13,2% de aislados XDR), e incluye OXA-2 (n=18), OXA-10/46/210 (n=2 c/u) y OXA-15 (n=1); por último, en cuatro aislados se encontró la β-lactamasa PER-1 (representando el 0,42% de los aislados totales y el 2,2% de aislados XDR).

*Tabla 2. Prevalencia de carbapenemas y BLEEs en aislados de P. aeruginosa*

| Carbapenemasas y BLEEs | Nº aislados | Proporción del total de aislados | Proporción de aislados XDR |
|---|---|---|---|
| BLEEs y carbapenemas totales | 56 | 5,90% | 28,60% |
| VIM totales | 24 | 2,54% | 11,54% |
| VIM-1 | 3 | 0,32% | 1,65% |
| VIM-2 | 9 | 0,95% | 3,30% |
| VIM-20 | 12 | 1,30% | 6,60% |
| IMPs totales | 2 | 0,21% | 1,10% |
| IMP-1 | 1 | 0,10% | 0,55% |
| IMP-8 | 1 | 0,10% | 0,55% |
| GES totales | 9 | 0,95% | 4,90% |
| GES-1 | 2 | 0,21% | 1,10% |
| GES-5 | 4 | 0,42% | 2,20% |
| GES-1 y GES-5 | 3 | 0,32% | 1,60% |
| CARB | 4 | 0,42% | 2,20% |
| CARB-2 | 3 | 0,32% | 1,65% |
| CARB-12 | 1 | 0,10% | 0,55% |
| OXA totales | 27 | 2,90% | 14,30% |
| OXA-2 | 20 | 2,11% | 10,44% |
| OXA-10 | 2 | 0,21% | 1,10% |
| OXA-46 | 2 | 0,21% | 1,10% |
| OXA-210 | 2 | 0,21% | 1,10% |
| OXA-15 | 1 | 0,10% | 0,55% |
| PER-1 | 4 | 0,42% | 2,20% |

## DISCUSIÓN

La capacidad de generar resistencia de *P. aeruginosa* representa un grave problema de salud pública. Según la OMS, *P. aeruginosa* MDR junto con *Acinetobacter baumanni* y *Enterobacteriaceae* encabezan la lista de patógenos para los cuales es crítico el desarrollo de nuevos tratamientos (Tacconelli et al., 2018). La combinación de imipenem (carbapenema) y relebactam (nuevo inhibidor de β-lactamasas) es una de las opciones actuales más viables para el tratamiento de infecciones generadas por *P. aeruginosa*. En este trabajo se pudo observar que hasta el 96,2% de los aislados de *P. aeruginosa,* de las 946 cepas obtenidas de hospitales españoles, son sensibles a la combinación imipenem/relebactam. El porcentaje de sensibilidad es ligeramente más alto que los obtenidos en estudios de vigilancia de Europa (92,4%) (Lob et al., 2019). La resistencia a imipenem/relebactam en cepas no productoras de carbapenemasas es extremadamente baja, tan solo un aislado de *P. aeruginosa* no productor de carbapenemasas mostró una CMI de 8 mg/L (Intermedio, según la clasificación EUCAST 2018).

La combinación imipenem/relebactam ha demostrado, *in vitro*, una respuesta positiva frente a cepas MDR y XDR, con un porcentaje de resistencia del 3,3% (EUCAST 2018; 3.6% en la nueva versión) que, comparado con otras opciones terapéuticas, como ceftolozano/tazobactam (5,4% de resistencia) y ceftazidima/avibactam (5,8% de resistencia), tendría, en principio, una mayor eficacia (Del Barrio-Tofinõ et al., 2019).

De las cepas analizadas, el 8,6% corresponde al fenotipo MDR, el 19,9% al XDR, el 0,1% a PDR y el resto a cepas sensibles. Las cepas MDR presentan un 3,7% de resistencia frente a la combinación imipenem/relebactam, mientras que las cepas XDR presentan un 17% de resistencia a la misma combinación. Gracias a los estudios previamente realizados, sabemos que las cepas MDR y XDR que presentan resistencia han adquirido, mediante transferencia horizontal, genes que codifican para carbapenemasas y BLEEs. Del total de las cepas estudiadas, un 5,9% de los aislados han adquirido alguna carbapenemasa y/o β-lactamasas de espectro extendido. De hecho, la relación resistencia a la combinación imipenem/relebactam y la producción de carbapenemasas de los aislados estudiados es perfecta, ya que todas las cepas resistentes son productoras de carbapenemasas. Estos datos concuerdan con la prevalencia reportada por otros países de Europa (Giani et al., 2018).

Las cepas con fenotipo XDR resistentes a imipenem/relebactam han adquirido genes *bla*$_{VIM}$ (blaVIM-1, blaVIM-2 y blaVIM-20), *bla*$_{IMP}$ (blaIMP-1 y blaIMP-8), *bla*$_{GES}$ (blaGES-5 y blaGES-1/blaGES-5), es decir, carbapenemasas capaces de hidrolizar imipenem. Las carbapenemasas VIM e IMP pertenecen a la clase B (MBL) de la clasificación de Ambler, y son las más relevantes debido a su amplia diseminación mundial como por sus variantes aminoacídicas. Los genes de IMP y VIM están en casetes de integrones plasmídicos, principalmente de clase 1. En cuanto a la hidrólisis, blaVIM-1 parece hidrolizar mejor a los β-lactámicos que blaVIM-2 (esto podría deberse a cambios aminoacídicos cercanos al centro activo del enzima); las IMP, en general, podrían tener una menor eficiencia en la hidrólisis de β-lactámicos que las VIM. Ante estas dos carbapenemasas, VIM e IMP, el relebactam no podrá actuar, ya que solo son sensibles a inhibidores β-lactámicos. La carbapenemasa de clase A, GES, hidroliza a β-lactámicos, aunque su eficacia podría ser menor que el resto de carbapenemasas descritas anteriormente. En los aislados analizados, se encontraron dos tipos de GES: blaGES-1 y blaGES-5, de los cuales, el primero se define como una BLEE con una tasa de hidrólisis de carbapenemas prácticamente nula (por lo que las dos cepas que adquirieron esta carbapenemasa son sensibles a la combinación de imipenem/relebactam), mientras que blaGES-5 es una de las pocas variantes descritas con actividad carbapenemasa. Existe una asociación de dos GES diferentes, blaGES-1 y blaGES-5, en un mismo integrón, debido, posiblemente a una duplicación del gen *bla*$_{GES-1}$, lo que podría aumentar el espectro de la enzima blaGES-5 sobre las carbapenemas (Nicolau & Oliver, 2010). En cuanto al fenotipo MDR, sólo tres cepas resultaron resistentes a imipenem/relebactam, debido a la adquisición de la carbapenemasa blaVIM-2.

Las cepas con fenotipo XDR (y una PDR) que adquirieron otro tipo de β-lactamasas, como *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{PER}$ y *bla*$_{CARB}$, presentan un 36,4% de resistencia a la combinación de imipenem/relebactam. Las cepas resistentes, se caracterizan por la presencia de β-lactamasas blaOXA-2 y blaOXA-210 y por la presencia de carbapenemasas de tipo blaVIM-20 o la combinación blaGES-1 y blaGES-5. Las β-lactamasas de espectro extendido tipo OXA poseen una capacidad hidrolítica que afecta a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y también a monobactámicos, pero no tienen actividad carbapenemasa. El resto de β-lactamasas encontradas en las cepas, blaCARB-2, blaCARB-12, blaOXA-10, blaOXA-46, blaOXA-15 y blaPER-1, parecen no tener efecto sobre la combinación imipenem/relebactam, ya que las cepas son sensibles.

La distribución de los *ST's* de los aislados analizados muestra que, el clon de alto riesgo predominante es el ST175, seguido del ST235 y por último el ST111. El 19,5% de los ST175 (ST distribuido en la mayoría de los países europeos) generan resistencia, es decir, aquellos en los que se ha adquirido genes $bla_{\mathrm{VIM}}$ y $bla_{\mathrm{GES}}$; el patrón de resistencia de ST175, como se ha comentado anteriormente, implica, además, mutaciones cromosómicas específicas en OprD, AmpR, MexZ y QRDR de GyrA y ParC. Del ST235, que tiene una distribución más amplia que el resto de *ST's* (mundial), el 25% de los aislados genera resistencia a imipenem/relebactam, ya que es susceptible a adquirir genes $bla_{\mathrm{GES}}$, sin embargo, solo conferirán resistencia las carbapenemasas blaGES-5 y la unión de blaGES-1 y blaGES-5. Por último, el ST111, que presenta también distribución mundial, en los aislados estudiados no presenta resistencia a imipenem/relebactam, ya que no han adquirido ningún tipo de carbapenemasa, sino genes $bla_{\mathrm{OXA}}$ y $bla_{CARB,}$ cuya acción se ve bloqueada por la presencia de relebactam, ya que éste es un inhibidor de β-lactamasas no β-lactámico.

De los fenotipos MDR, XDR y PDR, analizados según el tipo de muestra y servicio, cabe destacar una mayor presencia de cepas resistentes en muestras provenientes del tracto respiratorio y de orina (*Figura 4a*), mientras que los servicios hospitalarios que presentan mayor proporción de cepas resistentes son los servicios de urgencias, quirúrgicos y la UCI (*Figura 4b)*. Esto se debe a que las cepas de *P. aeruginosa*, capaces de causar infecciones nosocomiales, aisladas han adquirido $bla_{\mathrm{VIM}}$, $bla_{\mathrm{GES}}$, dos tipos de carbapenemasas capaces de hidrolizar el imipenem. Todas las cepas resistentes a imipenem/relebactam son aislados de pacientes adultos, y la mayoría pertenece al ST175. La única cepa PDR analizada es sensible a imipenem y a la combinación imipenem/relebactam; pertenece al ST235 y posee una β-lactamasa de espectro extendido blaOXA-2; procede de una infección de orina y del servicio de urgencias.

## CONCLUSIÓN

- La adquisición de carbapenemasas y β-lactamasas de espectro extendido mediante transferencia horizontal de genes, contribuyen a la resistencia de fármacos.
- La combinación imipenem/relebactam ha demostrado, *in vitro*, ser una combinación atractiva para el tratamiento de *P. aeruginosa* con un 96,2% de sensibilidad.
- La combinación imipenem/relebactam es altamente activa frente a cepas MDR y XDR.
- El relebactam redujo notablemente el desarrollo de resistencia al imipenem.
- Las cepas resistentes a imipenem/relebactam presentan genes $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ y $bla_{GES}$ y siguen siendo un desafío para el desarrollo de fármacos antimicrobianos.

## BIBLIOGRAFÍA


Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003

Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Gago, J. F., Juan, C., Tubau, F., … Oliver, A. (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. https://doi.org/10.1128/AAC.01388-12

Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., Anil Kumar, V., Gopi Mohan, C., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.004

Del Barrio-Tofinõ, E., Zamorano, L., Cortes-Lara, S., López-Causape, C., Sánchez-Diener, I., Cabot, G., … Oliver, A. (2019). Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. https://doi.org/10.1093/jac/dkz147

Giani, T., Arena, F., Pollini, S., Di Pilato, V., D'Andrea, M. M., De Angelis, L. H., … Rassu, M. (2018). Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: Activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. https://doi.org/10.1093/jac/dkx453

Hocquet, D., Bertrand, X., Köhler, T., Talon, D., & Plésiat, P. (2003). Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. https://doi.org/10.1128/AAC.47.6.1887-1894.2003

Livermore, D. M. (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1086/338782

Lob, S. H., Karlowsky, J. A., Young, K., Motyl, M. R., Hawser, S., Kothari, N. D., … Sahm, D. F. (2019). Activity of imipenem/relebactam against MDR *Pseudomonas aeruginosa*

in Europe: SMART 2015–17. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. https://doi.org/10.1093/jac/dkz191

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., … Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Mulet, X., Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Zamorano, L., Juan, C., … Oliver, A. (2013). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. https://doi.org/10.1128/AAC.01481-13

Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5

Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*. https://doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.002

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

Pea, C., Cabot, G., Gómez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., … Oliver, A. (2015). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clinical Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1093/cid/ciu866

Pérez, A., Gato, E., Pérez-Llarena, J., Fernández-Cuenca, F., Gude, M. J., Oviaño, M., … Bou, G. (2019). High incidence of MDR and XDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. https://doi.org/10.1093/jac/dkz030

Sánchez-Romero, I., Cercenado, E., Cuevas, O., García-Escribano, N., García-Martínez, J., Bouza, E., … Ramos, P. (2007). Evolution of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: Second National Study (2003). *Revista Espanola de Quimioterapia*.

Schmidt-Malan, S. M., Mishra, A. J., Mushtaq, A., Brinkman, C. L., & Patela, R. (2018). In vitro activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against resistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. https://doi.org/10.1128/AAC.00533-18

Sorlí, L., Luque, S., Segura, C., Campillo, N., Montero, M., Esteve, E., … Horcajada, J. P. (2017). Impact of colistin plasma levels on the clinical outcome of patients with infections caused by extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1186/s12879-016-2117-7

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., … Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3

Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.006

Version 9.0, valid from 2019-01-01. (2005). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Anatomy*, *[1] valid*. https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2005.00369.x