

AKASMERIA



ppi 201502ZU4670
Esta publicación científica en formato digital es continuidad de la
revista impresa ISSN 00755222

Volumen 45. N° 2. Julio - Diciembre 2017

Universidad del Zulia
Facultad de Medicina
Escuela de Medicina
Departamento de Enfermedades
Infecciosas y Tropicales
Maracaibo, Venezuela

Kasmera 45(2): 88-99, Julio-Diciembre 2017

Detección de Betalactamasas de espectro extendido en *Enterobacteriaceae* en un Centro de Salud de Maracaibo, Venezuela

Detection of Extended-Spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Healthcare Center from Maracaibo city, Venezuela

Perozo Mena Armindo¹, Marín Milagros², Castellano Maribel³, Ling Toledo Eliana³, Núñez Daniela², Ginestre Messaria³, Villasmil Jessica³, Bermúdez-González José⁴, Villalobos Rafael⁵ y Gómez-Gamboa Liliana^{6*}

¹ Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. Venezuela.

² Maestría de Diagnóstico Bacteriológico. División de Estudios para Graduados. Facultad de Medicina, La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

³ Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

⁴ Bios Venezuela C.A.

⁵ Cátedra de Microbiología. Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

⁶ Cátedra de Medicina Tropical. Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

Autor de correspondencia: Prof. Liliana Gómez Gamboa.

E-mail: lgomez@fmed.luz.edu.ve

Resumen

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas y el aumento de la resistencia a los antibióticos se han convertido en la actualidad en un problema de salud pública, siendo las enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) un ejemplo de este fenómeno. En el presente estudio se determinó la producción de BLEE en aislados clínicos de la familia *Enterobacteriaceae* procedentes de una institución de salud de la ciudad de Maracaibo, durante el periodo septiembre de 2014 a febrero de 2015. Para la detección de BLEE se utilizó como método preliminar el de Kirby-Baüer, siguiendo los lineamientos del CLSI; adicionalmente se utilizó como prueba confirmatoria fenotípica el método de sinergia del doble disco y como prueba confirmatoria genotípica la detección de los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} mediante PCR. Se analizaron 55 enterobacterias productoras de BLEE, distribuidas de la siguiente manera: *Escherichia coli* 56,36%, *Klebsiella pneumoniae* 21,82%, *Enterobacter cloacae* 7,27%, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens* 5,45% para cada especie, por último, *Salmonella* spp. y *Morganella morganii* 1,82%

Recibido: 12/04/2017 Aceptado: 02/10/2017

respectivamente. En cuanto al tipo de BLEE detectado mediante PCR, se observó que el 83,63% de los aislados presentó el tipo TEM, seguido de CTX-M (23,63%) y SHV (21,81%), mientras que el 27,27% de los aislados produjo dos o tres BLEE de manera simultánea. Los resultados de este estudio confirman la alta diseminación de este mecanismo de resistencia entre las enterobacterias productoras de infecciones en nuestras instituciones públicas de salud, por lo que deben aplicarse medidas de control que permitan controlar y disminuir su incidencia.

Palabras Claves: Enterobacterias, Beta-lactamasas de Espectro Extendido, Resistencia a antibióticos.

Abstract

The high incidence of the infectious diseases and the antimicrobial resistance arise represent a public health threat today. The extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* are an example of this phenomenon. We determined the ESBL-production in *Enterobacteriaceae* isolates from a Healthcare Center in Maracaibo, during September 2014 to February 2015. The Kirby-Baier method was performed to preliminary phenotypic detection of ESBL, according to CLSI guidelines. ESBL-production was confirmed by a double-disk synergy test according to the CLSI standards. To genotypic confirmation, the genes bla_{CTX-M} , bla_{TEM} and bla_{SHV} were amplified by PCR. Fifty-five (n=55) strains were analyzed distributed in *Escherichia coli* (56.36 %), *Klebsiella pneumoniae* (21.82 %), *Enterobacter cloacae* (7.27 %), *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* (5.45 % each one), *Salmonella* spp. and *Morganella morganii* (1.82 % each one). The major encoded ESBL was the bla_{TEM} gene (83.63 %); followed by 23.63% of the bla_{CTX-M} gene, and 21.81 % encoded the bla_{SHV} gene. 27.27 % of the isolates produced two or three ESBL simultaneously. These results confirmed the high spread of this resistant mechanism among *Enterobacteriaceae*-producing infections in our public health institutions, therefore control measures should be applied to control and reduce its incidence.

Key words: Enterobacteriaceae; Extended Spectrum Betalactamase; Antibiotics Resistance, Beta-lactamic Resistance.

INTRODUCCIÓN

Las enterobacterias constituyen el grupo de microorganismos más frecuentemente involucrados en infecciones tanto de la comunidad como en instituciones de atención en salud; aunado a esto, el surgimiento de cepas multiresistentes a los antibióticos, son elementos que constituyen uno de los mayores

problemas de la medicina actual y futura. Las bacterias resistentes a los antibióticos que son difíciles o imposibles de tratar son cada vez más comunes y están ocasionando una crisis de salud de dimensiones globales, lo que deteriora la calidad de vida del hombre y aumenta los costos en salud, convirtiéndose en una carga para el gasto público de los diferentes gobiernos.

Los antibióticos betalactámicos son el

grupo de antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de procesos infecciosos. Estos se clasifican en relación a su estructura nuclear común: el anillo betalactámico, el cual posee similitud estructural con los sitios de unión de los substratos bacterianos, lo que le permite unirse e inactivar las transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas necesarias para la síntesis del peptidoglucano de la pared celular. Entre estos se encuentran: la penicilina, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos, los cuales continúan siendo objeto de modificaciones bioquímicas dirigidas a modular su actividad antimicrobiana (1).

A pesar de que la penicilina (primer betalactámico) fue muy eficaz cuando se comenzó a utilizar, años después de la salida al mercado, se presentaron los primeros casos de resistencia al antibiótico por algunas bacterias que hidrolizaban el anillo betalactámico, a través de la producción de enzimas denominadas betalactamasas (1), estas enzimas han evolucionado a lo largo del tiempo por lo que en la actualidad existen un gran número de enzimas distribuidas en una gran variedad de microorganismos de diferentes géneros y especies.

La resistencia a antibióticos betalactámicos puede atribuirse a diferentes mecanismos como, disminución de la permeabilidad del antibiótico por alteración de porinas presentes en la membrana celular bacteriana, modificación química del sitio de acción del antibiótico como la alteración de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) y el fenómeno de tolerancia (2-4). Sin embargo, el mecanismo más frecuente e importante desde el punto de vista terapéutico en bacilos Gram negativos, es la resistencia bioquímica debida principalmente a la producción de enzimas betalactamasas (2, 3, 5).

Las Betalactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen, bien sea cromosómico o transferido por plásmidos o transposones, actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, lo que provoca que el antibiótico pierda la capacidad de unirse a las PBP; la producción de estas enzimas puede ser constitutiva o inducida (3).

Las betalactamasas de espectro expandido (BLEE), son enzimas derivadas por mutaciones de las betalactamasas clásicas del grupo 2b de la clasificación de Bush (6-8); se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual facilita su diseminación, no sólo entre distintas cepas de la misma especie, sino también entre bacterias de distintos géneros y grupos. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglicósidos o al cotrimoxazol (8). Los diferentes tipos de BLEE confieren un grado de resistencia muy variable, la intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, pudiendo incluso no tener efecto fenotípicamente detectable en algunos casos en los que únicamente tiene lugar un aumento de la concentración inhibitoria mínima (CIM), permaneciendo en el intervalo de sensibilidad (9, 10).

La frecuencia de cepas productoras de BLEE se ha incrementado a lo largo del tiempo en una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, dentro de estas últimas, muchas especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* son responsables de infecciones graves tanto a nivel de la comunidad como intra-hospitalario (11).

El perfil de multiresistencia antibiótica que expresan estas cepas ocasiona, especialmente, en el ámbito hospitalario, un problema terapéutico de notables dimensiones, ya que las cepas productoras de BLEE confieren resistencia a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, así como al aztreonam (12), a su vez estas cepas, también expresan resistencia a otros grupos de antimicrobianos, incluidos los aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol (8). Los genes que codifican las BLEE y los que codifican la resistencia a otros antimicrobianos, pueden residir en el mismo plásmido conjugativo y se transmiten juntos de un microorganismo a otro, confirmando el perfil de resistencia antibiótica múltiple. Esto permite la amplia distribución de la resistencia a los antibióticos y afecta seriamente los tratamientos.

Diferentes investigaciones a nivel mundial

han demostrado que aproximadamente un 38,80% de *K. pneumoniae* y un 19,23% de *E. coli* son productoras de BLEE (9, 10, 13, 14). Sin embargo, es importante conocer la epidemiología local de cada centro de salud con el fin de diseñar los planes y medidas de contención y control en base a la situación presentada por cada institución, por este motivo se determinó la producción de BLEE en cepas de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas en un centro de salud de la ciudad de Maracaibo, durante el periodo comprendido entre septiembre de 2014 y febrero de 2015.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó la determinación de BLEE a enterobacterias (n=55) aisladas de los cultivos procesados de un centro de salud ubicado en la ciudad de Maracaibo, durante el período entre septiembre 2014 y febrero de 2015.

A las cepas se les realizaron pruebas de susceptibilidad mediante el método de Bauer-Kirby (15), siguiendo los lineamientos del CLSI (16, 17). La selección inicial de las cepas productoras de BLEE se realizó mediante los criterios del CLSI (16-17), para ello se utilizaron discos de cefpodoxima (CPD) de 10µg; ceftazidima (CAZ) 30 µg; aztreonam (ATM) 30µg; ceftriaxona (CRO) 30µg y cefotaxima (CTX) 30 µg; si el resultado del antibiograma indicó un halo de inhibición < 17mm para CPD; < 22 para CAZ; < 25 para CRO o < 27 para CTX o ATM, se consideró a la cepa como probable productora de BLEE (17). Toda cepa sospechosa de producir BLEE se confirmó mediante el método fenotípico del doble disco y mediante la detección de los genes *TEM*, *CTX-M* y *SHV* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para el método de sinergia del doble disco (18), se utilizó una placa de Agar Mueller Hinton (MH) y se inoculó con una suspensión bacteriana estandarizada al 0,5 del nefelómetro de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL), colocando sobre ésta discos de CTX, CAZ, CRO y ATM a 20 mm (de centro a centro) de un disco central de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC); la placa se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas y posteriormente se realizó la lectura. La presencia de una zona de inhibición agrandada o distorsionada alrededor del disco de AMC indicó sinergia entre el ácido clavulánico y

cualquiera de los cuatro antibióticos probados, siendo evidencia de producción de BLEE (18, 19).

Para la detección de los genes *TEM*, *SHV* y *CTX-M*, se realizó la extracción del ADN bacteriano, utilizando el método de ebullición (20), colocando en un microtubo con tapa estéril por cada muestra, 100 µL de agua grado molecular autoclavada. Posteriormente, se tomaron con ayuda de un asa estéril varias colonias de un cultivo joven de 18-24 horas dispuestas en agar tripticosa soya y se introdujeron en el microtubo, con el fin de obtener una suspensión homogénea. Simultáneamente, esta suspensión se calentó a 100°C por 15 minutos y después se añadieron 900 µL de agua grado molecular estéril a cada microtubo. Esta suspensión se centrifugó por 15 minutos a 12.000 rpm; con el fin de obtener el sobrenadante, el cual fue recolectado en otro microtubo estéril. Finalmente, esta suspensión de ADN se almacenó a -20°C hasta el momento de la amplificación.

Para la amplificación del ADN bacteriano mediante PCR, se utilizó una reacción de amplificación para cada gen. Los genes se amplificaron usando los primers oligonucleótidos descritos en la Tabla 1 (21).

Para la amplificación de los genes *TEM* y *CTX-M*, se utilizó Buffer GoTaq 1X (Promega), 2,5mM de MgCl_2 , 200µM de cada oligonucleótido (DNTp Mix Promega); 0,4µM de cada primer, 1,25U de Taq-DNA Polimerasa (Promega), 3µL del ADN extraído de cada muestra, para una mezcla de reacción con un volumen final de 50µL. Se utilizó un termociclador PTC 100 (MJ-Research) con la siguiente programación: un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, posteriormente se realizaron 30 ciclos de 30 segundos a 94°C , 30 ciclos de 30 segundos a 50°C , 30 ciclos de 30 segundos a 72°C . A continuación, se realizó un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos (21). Por otra parte, para la amplificación del gen *SHV*, se realizó el mismo protocolo con las siguientes condiciones de amplificación: 30 ciclos de 30 segundos a 94°C , 30 ciclos 30 segundos a 59°C , 30 ciclos de 30 segundos a 72°C . A continuación, se realizó un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos (21).

Tabla 1. Primers a utilizar para la amplificación de genes de BLEE

Iniciador	Secuencia del primer	Gen amplificado	Tamaño del producto (pb)
TEM F TEM R	5`-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3` 5`-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3`	<i>TEM</i>	1080
CTX-M F CTX-M R	5`-TTAATGATGACTCAGAGCATTTC-3` 5`-GATACCTCGCTCCATTTATTG-3`	<i>CTX-M</i>	901
SHV F SHV R	5`-TCGGGCCGCGTAGGCATGAT-3` 5`-AGCAGGGCGACAATCCC GCG-3`	<i>SHV</i>	812

Fuente: Evolution and dissemination of extended-spectrum b-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (21).

La detección de amplificadores se realizó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% en Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x. El gel se cargó con un marcador de peso molecular con bandas desde 100pb hasta 1,5 Kb y en el resto de los pocillos se colocaron 5 µL del producto de la PCR. Se corrió la electroforesis a 80 voltios por aproximadamente 1 hora. Luego, se tiñó el gel con bromuro de etidio (1µg/mL) durante 30 minutos. Una vez teñido el gel, la detección de amplificadores se visualizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta UVP-Chromato-VUE modelo TM-36 de 115 voltios, 60Hz y capacidad de 1,2 amperios, y las bandas electroforéticas resultantes fueron fotografiadas con una cámara fotográfica digital Cyber-Shot con filtro naranja de 5.1 mega píxeles (SONY). Las reacciones de amplificación para los genes se consideraron positivas, al observar una banda única de 1080 pb para el gen *TEM*, de 901 pb para el gen *CTX-M* y de 812 pb para el gen *SHV*. Por otra parte, para el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli* ATCC 35218 y ATCC 25922. Para determinar la sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos, así como de los cebadores o primers se utilizaron cepas control que poseían el mecanismo de resistencia plenamente identificado. Se utilizaron las siguientes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo para el método del doble discos y control negativo para la amplificación de primers, *K. pneumoniae* ATCC 700603 control positivo de amplificación para *SHV*, *Escherichia coli*

CRB-SAHUM 25314-15 como control positivo para la amplificación de *TEM* y *Escherichia coli* CRB-SAHUM 23584-16 como control positivo para *CTX-M*, estas tres últimas también fueron utilizadas como control positivo para el método del doble disco.

RESULTADOS

Durante el período de estudio, se procesaron 1992 muestras para cultivo bacteriológico. Se aislaron 140 miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (7,03%), de las cuales 39,29% (n=55) fueron productoras de BLEE. Estas cepas estuvieron distribuidas de la siguiente manera: 31 cepas de *E. coli* (56,36%), 12 *K. pneumoniae* (21,82%), 4 *E. cloacae* (7,27%), 3 *P. mirabilis* (5,45%), 3 *S. marcescens* (5,45%), 1 *M. morganii* (1,82) y 1 *Salmonella* spp. (1,82%).

Las 55 cepas fueron aisladas de 50 pacientes, por lo que se observaron 5 pacientes multi-infectados (Ver Tabla 2). La mayoría de los pacientes correspondieron al sexo masculino (68%, n=34) y mayoritariamente entre 18-28 años (28%, n=14), seguido de 16% (n=8) entre 40 a 50 años y 12% (n=6) entre 29 a 39 años. Asimismo, las cepas fueron aisladas principalmente de heridas (22%, n=11), orina (20%, n=10) y tráquea (14%, n=7), así como de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (24%, n=12), observación (18%, n=9), cirugía, medicina interna y pediatría (14%, n=7).

Con respecto a la resistencia a los antibióticos, los aislamientos de *E. coli*

BLEE positivos fueron altamente resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (100%), a ciprofloxacina (92%) y levofloxacina (94,7%), a gentamicina (80%) y tobramicina (77,27%), a tetraciclina (96,43%) y a trimetoprim/sulfametoxazole (83,33%). Con respecto a los otros aminoglucósidos ensayados, la resistencia a amikacina (23,53%) y netilmicina (40,91%) fue menor. Todos los aislamientos fueron susceptibles a los carbapenémicos.

Los aislados de *K. pneumoniae* BLEE positivos fueron altamente resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico (100%), amikacina (75%), gentamicina (85,71%) y tobramicina (83,33%), a ciprofloxacina (66,66%) y levofloxacina (80%) y a tetraciclina (50%), mientras que la resistencia a netilmicina fue menor (57,14%) con respecto a los otros aminoglucósidos ensayados. La mayoría de los aislamientos fueron susceptibles a los carbapenémicos (91,67%).

Tabla 2. Características clínicas de los casos multi-infectados y genes de BLEE de los aislamientos.

Información del Paciente	1	2	3		4	5
Edad (años)/sexo	83/M	68/M	25/M		48/F	38/M
Muestra de origen	Secreción traqueal	Secreción traqueal	Secreción traqueal	Orina	Úlcera de pierna	Absceso perianal
Servicio	UCI	UCI	Observación		Obstetricia	Medicina Interna
Especies bacterianas (genes de BLEE)	<ul style="list-style-type: none"> <i>K. pneumoniae</i> (SHV/TEM/CTX-M) <i>E. coli</i> (TEM) <i>S. marcescens</i> (TEM) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>E. coli</i> (TEM) <i>K. pneumoniae</i> (SHV/TEM) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>E. cloacae</i> (CTX-M) <i>E. coli</i> (TEM) 	<i>E. cloacae</i> (TEM/CTX-M)	<ul style="list-style-type: none"> <i>E. cloacae</i> (TEM) <i>K. pneumoniae</i> (SHV/CTX-M) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>P. mirabilis</i> (TEM) <i>E. coli</i> (TEM)

Al analizar la presencia de los genes para BLEE se observó que el 83,63% (n=46) de los aislamientos presentó el tipo TEM, seguido del tipo CTX-M (23,63%; n=13) y SHV (21,81%; n=12). Asimismo, 40 aislados (72,73%) presentaron un solo gen para BLEE, 14 aislados (25,45%) presentaron 2 genes para BLEE, mientras que 1 aislamiento (1,82%) presentó 3 genes para BLEE de manera simultánea. La

Tabla 3 muestra la distribución de los genes para la producción de BLEE presentes en las cepas estudiadas.

Al aplicar el chi-cuadrado, no se encontró asociación significativa (p<0,05) entre el aislamiento de *Enterobacteriaceae* productora de BLEE y el género, la edad, el servicio de hospitalización y el tipo de muestra de los pacientes.

Tabla 3. Distribución de los genes para la producción de BLEE en aislamientos clínicos de *Enterobacteriaceae* (n=55).

Microorganismo	Tipos de genes (n/%)						N° cepas
	TEM	CTX-M	TEM/ CTX-M	SHV/ TEM	SHV/ CTX-M	SHV/TEM/ CTX-M	
<i>E. coli</i>	24/77,4	5 /16,1	2/6,5				31
<i>K. pneumoniae</i>				9/75,0	2/16,7	1/8,3	12
<i>E. cloacae</i>	2/50	1/25	1/25				4
<i>P. mirabilis</i>	3/100						3
<i>S. marcescens</i>	2/67	1/33					3
<i>Salmonella</i> spp.	1/ 100						1
<i>M. morgannii</i>	1/100						1
TOTAL (n/%)	33/60	7/12,7	3/5,5	9/16,4	2/3,6	1/1,8	55/100

DISCUSIÓN

Los microorganismos productores de BLEE constituyen un problema en los centros de salud, siendo *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae* productores de BLEE, bacterias que ocasionan altas tasas de morbilidad y mortalidad (22, 23). La prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE reportada recientemente por diferentes estudios a nivel mundial, varía de 3,8% a 45,4% (23-25). En el hospital objeto de la presente investigación, la prevalencia de BLEE en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* es elevada (39,29%) y similar a los resultados obtenidos en otro centro de salud de Maracaibo (34,40%) (26). Asimismo, estos microorganismos son principalmente aislados de muestras del tracto urinario, sangre y tracto respiratorio (23), similar a lo obtenido en la presente investigación.

Entre las enterobacterias estudiadas, los principales productores de BLEE en esta investigación fueron *E. coli*, seguida por *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, similar a los resultados obtenidos por Moosavian M y Ahmadkhosravy N en Irán (25), quienes también demostraron que *E. coli* es un importante productor de BLEE, sin embargo, el segundo lugar estuvo ocupado por diferentes especies de *Enterobacter*, mientras que *Klebsiella* ocupó el tercer lugar. El estudio realizado por Sangare S y cols. (27), mostró a los aislados de *K. pneumoniae* como principales productores de BLEE, seguido por

E. coli y *E. cloacae* respectivamente. Asimismo, Silva-Sánchez J y cols. en México (22) también demostraron como especie productora de BLEE más prevalente a *K. pneumoniae* (56%), pero a diferencia, *E. cloacae* (29%) ocupó el segundo lugar, seguido de *E. coli* (15%). Por su parte Uemura y cols. (28) estudiaron un brote producido por enterobacterias productoras de BLEE en una unidad de cuidados intensivos hemato-oncológica, encontrando a *K. pneumoniae* como el microorganismo más frecuentemente involucrado en la producción de BLEE, seguido de *E. coli*. Todos estos estudios demuestran diferencias en cuanto al principal agente productor de BLEE, lo que indica que la producción de BLEE por parte de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, está muy ligada a la epidemiología local y condiciones de la institución o lugar donde se realice el estudio.

En cuanto a los genes de resistencia detectados en los aislados de *E. coli*, se encontró que el gen predominante fue TEM, presente en el 83,63% de los aislados; asimismo, este gen se presentó principalmente de manera aislada en el 77,41% de los casos, sin embargo, en dos aislados (6,45%) estuvo de manera concomitante el gen CTX-M y en un solo caso se observó la presencia del gen CTX-M como único gen productor de BLEE. Un estudio realizado por DeFrancesco A y cols. (29), demostró que la BLEE del tipo TEM estuvo presente en el 95,1% de las cepas de *E. coli* estudiadas, solo el 4,9% de las cepas presentó

la BLEE CTX-M, mientras que ninguno de los aislados presentó la BLEE tipo SHV, estos resultados son muy similares a los encontrados en la presente investigación. Sin embargo, el estudio realizado en Irán por Moosavian M y cols. (25) mostró una prevalencia de BLEE del tipo CTX-M del 46,1% en aislados de *E. coli*, mientras que Liao K y cols. (30) en China, encontraron un 62,3% y 5,39% de producción de BLEE tipo CTX-M y SHV respectivamente y Sangare y cols. (27) en Mali demostraron una prevalencia de CTX-M del 100% en *E. coli*. Por otra parte, la producción simultánea de dos o más BLEE por parte de un microorganismo ha sido documentada ampliamente, una de las publicaciones más impactantes a este respecto lo constituye el reporte de Kapmaz M y cols. (31), donde se presentan dos aislados de *E. coli* con la capacidad de producir enzimas de los tipos NDM-1, TEM, SHV y CTX-M de manera simultánea.

En el caso de *K. pneumoniae*, el gen predominantemente producido por las cepas estudiadas fue SHV, seguido de TEM y CTX-M, con 100%, 83,33% y 25% respectivamente. Resultados similares fueron reportados en México por Silva-Sánchez J y cols. (22), quienes obtuvieron como BLEE predominante el tipo SHV (84%), seguido de TLA-1 (11%) y CTX-M (5%). Asimismo, diferentes estudios han demostrado que en *K. pneumoniae* CTX-M tiene importancia después de SHV y TEM (32, 33). Por otra parte, Uemura y cols. (28) detectaron los tipos SHV y CTX-M en el 100% de las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas, mientras que Sangare y cols. (27), encontraron en *K. pneumoniae* una prevalencia de producción de BLEE tipo CTX-M y SHV del 75% y 25% respectivamente, así como Robin y cols. (23), demostraron que CTX-M fue la BLEE predominante en el 81,1% de los aislados de *K. pneumoniae*, resultados que difieren de los nuestros, donde la BLEE predominante fue SHV.

Para el resto de las enterobacterias estudiadas, solo se obtuvieron 4 aislados de *E. cloacae*, dos fueron productores de TEM, uno de CTX-M y otro de TEM y CTX-M de manera simultánea; no es posible sacar conclusiones con el escaso número de cepas probadas, sin embargo la BLEE que predominó fue TEM, y esta puede presentarse de manera concomitante

con CTX-M; Sangare y cols. (27), realizaron un estudio similar y encontraron resultados completamente diferentes, demostrando que todos los aislados de *E. cloacae* produjeron solo BLEE del tipo CTX-M. Por otra parte, Markovska y cols. (34), realizaron un estudio de prevalencia de BLEE en especies de *Enterobacter*, demostrando que el 75% de los aislados fue productor de BLEE del tipo CTX-M, resultados que concuerdan con nuestra investigación.

En el caso de *P. mirabilis* solo se analizaron 3 aislados y todos fueron productores de TEM, al igual que los aislamientos de *Salmonella* y *M. morgani*. En cuanto a *S. marcescens*, de los tres aislados analizados, dos produjeron BLEE del tipo TEM y uno del tipo CTX-M; estos últimos géneros no demostraron la capacidad de producir más de un tipo de BLEE de manera simultánea, a diferencia de los géneros *Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter*. Existe mucha diversidad de reporte en cuanto a la producción de BLEE por parte de estos microorganismos. Sangare y cols. (27), no reportaron producción de BLEE en estos géneros, mientras que Hwang y cols. (35) informaron un caso de bacteriemia debida a *Salmonella enterica* serovar Virchow ST16 productora de BLEE de los tipos CTX-M y TEM. Cartelle Gestal y cols. (36) en Ecuador describieron un brote producido por *Salmonella enterica* serovar Infantis productora de CTX-M, resultados que contrastan con los obtenidos en este trabajo y Markovska y cols. (34), reportaron cepas de *Proteus* y *Serratia* productoras de CTX-M.

El presente estudio demuestra la diversidad de BLEE en la localidad, por lo que los resultados sugieren que la obtención de los genes para la producción de BLEE, en las dos principales especies de enterobacterias aisladas (*E. coli* y *K. pneumoniae*), depende de sus características microbiológicas. Asimismo, se observó la predominancia en nuestros aislados de genes del tipo TEM, resultados que difieren con muchas investigaciones a nivel mundial; sin embargo, se ha comprobado que la presencia y diversidad de BLEE depende en gran medida de la epidemiología local donde se realice el estudio (22, 23, 30, 35, 37), siendo importante resaltar la presencia de pacientes colonizados/infectados por múltiples cepas de enterobacterias productoras de diferentes tipos

de BLEE en el presente estudio. Otro factor no considerado en este estudio es la relación clonal de los aislados, probablemente un clon predominante de cepas productoras de BLEE del tipo TEM, se encuentre en la institución estudiada, lo que alteraría su epidemiología.

Sin embargo, diferentes trabajos (25-28, 38-41) han demostrado que las BLEE del tipo CTX-M se movilizan fácilmente mediante plásmidos en bacterias ambientales (42). En el presente, la emergencia de infecciones por BLEE adquiridas en la comunidad se asocia globalmente con BLEE del tipo CTX-M (43), se asume que este tipo de BLEE se disemina más fácilmente que los genes *TEM* y *SHV* bajo la presión selectiva de un tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro; esto explicaría por qué las BLEE tipo CTX-M han suplantado a las del tipo TEM y SHV en diferentes estudios (44), siendo por lo tanto posible que en el futuro suceda lo mismo con nuestros aislados. En la presente investigación, los resultados indican un predominio de BLEE del tipo TEM, sobre todo en aislados de *E. coli*, debido posiblemente a la presencia de un clon predominante en la institución o al hecho de que los genes BLEE en *E. coli* se adquieren principalmente mediante vectores como bacteriófagos, los cuales permiten la diseminación de varios genes al mismo tiempo (28), esto se apoya también en el hecho de que una importante proporción de nuestros aislados fue capaz de producir diferentes tipos de BLEE de manera simultánea.

En conclusión, nuestro estudio demuestra la presencia de BLEE en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* aisladas de muestras clínicas, con predominio de BLEE del tipo TEM, mientras que una parte importante de los aislados fue capaz de producir más de una BLEE de manera simultánea. Se requieren estudios que permitan establecer los patrones de relación clonal, así como el análisis de plásmidos de resistencia, para realizar una mejor caracterización epidemiológica de las BLEE presentes en nuestro medio y diseñar las medidas de control necesarias para controlar la propagación de este mecanismo de resistencia en nuestras instituciones de salud.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CONDES) por el financiamiento de esta investigación, a través del Proyecto Nro. VAC-CC-0174-15.

Referencias Bibliográficas

1. Forero J. Betalactamasas de Espectro Extendido en Pediatría. *Rev Colomb Ped* 2002;37(4):12-5.
2. Hart CA. Antibiotic resistance: an increasing problem? *BMJ* 1998; 316(7140):1255-6.
3. Washington JA. Functions and activities of the Area Committee on Microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Microbiol Rev* 1991;4(2):150-5.
4. Finch RG. Antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1998;42(2):125-8.
5. Acar JF, Goldstein FW. Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents. *Clin Infect Dis* 1998;Suppl 1:S125-30.
6. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
7. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211-33.
8. Bush K, Miller GH. Bacterial enzymatic resistance: B-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion Microbiol* 1998;1(5):509-15.
9. Camacho-Molina L, Perozo-Mena A, Castellano-Gonzalez M, Bermudez-Navarro E, Harris-Socorro B. Métodos fenotípicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Soc Ven Microbiol*

- 2004;24(1-2):98-103.
10. Hernandez J, Pascual A, Canton R, Martinez-Martinez L. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21(2):77-82.
 11. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24 Suppl 1:S19-S45.
 12. García P. Resistencia bacteriana en Chile. *Rev Chil Infect* 2003;20:11-23.
 13. Perozo-Mena A, Castellano-González M, Ginestre-Perez M, Rincon-Villalobos G, Harris-Reyes B. Caracterización molecular y detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera* 2008;35(2):89-106.
 14. Andrea-Toledo L, Paz-Montes A, Piña-Reyes E, Perozo-Mena A. Enterobacterias productoras de β -Lactamasas de Espectro Extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario. *Kasmera* 2008;35(1):15-25.
 15. Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotics susceptibility testing by a standardize single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45(4):493-6.
 16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. Wayne, PA, USA: CLSI; 2014.
 17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25. Wayne, PA, USA: CLSI; 2015.
 18. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10(4):867-78.
 19. Peixoto A, Pires D, Da Silva F, Barth L. Extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital; Detection, prevalence and molecular typing. *Brazilian J Microbiol* 2003;34:344-8.
 20. De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(6):3456-61.
 21. DiPersio JR, Deshpande LM, Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Evolution and dissemination of extended-spectrum B-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003). *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2005;51(1):1-7.
 22. Silva-Sánchez J, Garza-Ramos JU, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Rojas-Moreno T, Andrade-Almaraz V, et al. Extended-spectrum β -lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Causing Nosocomial Infections in Mexico. A Retrospective and Multicenter Study. *Arch Med Res* 2011;42:156-62.
 23. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, Brieu N, et al. Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France: inventory assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(3):e01911-e6 (en prensa).
 24. Tschudin-Sutter S, Lucet JC, Mutters NT, Tacconelli E, Zahar JR, Harbarth S. Contact precautions for preventing nosocomial transmission of ESBL-producing *Escherichia coli* -a point/counterpoint review. *Clin Infect Dis* 2017; DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix258>.
 25. Moosavian M, Ahmadkhosravy N. Survey of CTX-M Gene Frequency in Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates Using the Combination Disk and PCR Methods in Ahvaz, Iran. *Jundishapur J Microbiol*

- 2016;9(11):e40423 (en prensa).
26. Bonilla X. y Perozo-Mena A. Boletín sobre etiología y resistencia bacteriana. 14^a edición. Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. Maracaibo. Venezuela. Mayo. 2015.
 27. Sangare SA, Rondinaud E, Maataoui N, Maiga AI, Guindo I, Maiga A, et al. Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in bacteriemic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali. PLOS ONE 2017;12(2):e0172652 (en prensa).
 28. Uemura M, Imataki O, Uchida S, Nakayama-Imaohji H, Ohue Y, Matsuka H, et al. Strain-specific transmission in an outbreak of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in the hemato-oncology care unit: a cohort study. BMC Infect Dis 2017;17:26 (en prensa).
 29. DeFrancesco AS, Tanih NF, Samie A, Guerrant RL, Bessong PO. Antibiotic resistance patterns and beta-lactamase identification in *Escherichia coli* isolated from young children in rural Limpopo Province, South Africa: The MAL-ED cohort. South African Med J 2017; 107(3) (en prensa).
 30. Liao K, Chen Y, Wang M, Guo P, Yang Q, Ni Y, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China. Diagnostic Microbiol Infect Dis 2017: 45-48 (en prensa).
 31. Kapmaz M, Erdem F, Abulaila A, Yeniaras E, Oncul O, Aktas Z. First detection of NDM-1 with CTX-M-9, TEM, SHV and rmtC in *Escherichia coli* ST471 carrying IncI2, A/C and Y plasmids from clinical isolates in Turkey. J Global Antimicrob Resistance 2016;7:152-153.
 32. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. J Chemother 2016;28(1):1-19.
 33. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. The Lancet Infect Dis 2008;8(3):159-166.
 34. Markovska RD, Stoeva TJ, Bojkova KD, Mitov IG. Epidemiology and Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* Isolates from a Bulgarian Hospital. Microbial Drug Resistance 2013;20(2):131-137.
 35. Hwang JH, Shin GW, Hwang JH, Lee CS. Bloodstream infection due to CTX-M-15 and TEM-1 extended spectrum B-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow ST16. Japanese J Infectious Dis 2016 2016 (en prensa).
 36. Cartelle Gestal M, Zurita J, Mino A, Ortega-Paredes D, Alcocer I. Characterization of a small outbreak of *Salmonella enterica* serovar Infantis that harbour CTX-M-65 in Ecuador. Brazilian J Infectious Dis 2016;20(4):406-407.
 37. Bai L, Wang L, Yang X, Wang J, Gan X, Wang W, et al. Prevalence and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum B-Lactamase Genes in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic Patients in China. Front Microbiol 2017;8:144 (en prensa).
 38. Hammami S, Dahdeh C, Mamlouk K, Ferjeni S, Maamar E, Hamzaoui Z, et al. Rectal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase and Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacilli in Intensive Care Units in Tunisia. Microbial Drug Resistance 2017 (en prensa).
 39. Maamar E, Ferjani S, Jendoubi A, Hammami S, Hamzaoui Z, Mayonnove-Coulange L, et al. High Prevalence of Gut Microbiota Colonization with Broad-Spectrum Cephalosporin Resistant *Enterobacteriaceae* in a Tunisian Intensive Care Unit. Front Microbiol 2016;7:1859.
 40. Chen PA, Hung CH, Huang PC, Chen JR, Huang IF, Chen WL, et al. Characteristics of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Multiple Rivers in Southern Taiwan. Appl Environ Microbiol 2016;82(6):1889-1897.
 41. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh

- M, Aghazadeh M, Yousefi M. CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Escherichia coli* isolates in Iranian hospitals. *Braz J Microbiol.* 2016;47(3):706-711.
42. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers Microbiol* 2012;3(110):1-19.
43. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, et al. Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *J Med Microbiol* 2013;62(7):1038-1043.
44. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(4):744-758.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

Kasmera

Revista del Departamento de
Enfermedades Infecciosas y Tropicales

Vol. 45 N° 2, Julio - Diciembre 2017

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en diciembre de 2017, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve