

Título del artículo.

Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México

Título del artículo en lenguaje Inglés

Characterization of β -lactamases of extended spectrum produced by *Escherichia coli* in urinary tract acquired at the community of Chilpancingo, Guerrero, Mexico

Autores.

Natividad Castro Alarcón
José Francisco Salgado Gonzalez
Raquel Lisseth Ocampo Sarabia
Jesús Silva Sánchez
María Ruíz Rosas

Referencia bibliográfica:

MLA

Natividad Castro Alarcón, José Francisco Salgado Gonzalez, Raquel Lisseth Ocampo Sarabia, Jesús Silva Sánchez, y María Ruíz Rosas. Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. *Tlamati*, 5.1 (2014): 14-23. Print

APA

Castro-Alarcón, N., Salgado-Gonzalez, J. F., Ocampo-Sarabia, R. L., Silva-Sánchez, J., y Ruíz-Rosas, M. (2014). Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. *Tlamati*, 5(1), 14-23.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 29 de Abril del 2014.

© 2014 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAG. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México

Natividad Castro Alarcón^{1*}
José Francisco Salgado Gonzalez¹
Raquel Lisseth Ocampo Sarabia¹
Jesús Silva Sánchez²
María Ruíz Rosas³

¹ Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Cd. Universitaria Sur, Chilpancingo, Guerrero, México. Tel. +52(747) 4725503

² Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas. Universidad No. 655, Col. Santa María Ahuacatitlán, Cerrada los Pinos y Caminera. CP. 62100. Cuernavaca Morelos, México. Tel: +52 (777) 3293000

³ Clínica Hospital ISSSTE, Chilpancingo, Laboratorio Clínico. Av. Ruffo Figueroa s/n. Col. Burócratas. C.P.39090 Chilpancingo, Guerrero, México. Tel: +52(747) 4723413

*Autor de correspondencia
natycaastro2@hotmail.com

Resumen

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un grave problema de salud pública, en particular la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas hidrolizan antibióticos betalactámicos, los cuales son utilizados comúnmente para tratar infecciones del tracto urinario (ITU). Las BLEE son enzimas derivadas de mutaciones de las β -lactamasas clásicas y varían en su capacidad para hidrolizar cefalosporinas. Las BLEE más frecuentes producidas por Enterobacterias son tipo TEM, SHV y CTX-M. La mayoría de los genes que codifican para estas enzimas se encuentran codificados en elementos genéticos transferibles. El objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípica y molecularmente las BLEE producidas por *Escherichia coli* aisladas de pacientes con ITU en la clínica hospital ISSSTE de Chilpancingo, Guerrero, México. Se analizaron 86 aislamientos clínicos de *E. coli*. La susceptibilidad a antibióticos se determinó por el método de difusión en disco y la detección de BLEE mediante la prueba de doble disco combinado, siguiendo las indicaciones del CLSI. La identificación de BLEE se llevó a cabo por PCR utilizando oligos específicos para genes *bla*. Las extracciones de plásmidos se llevaron a cabo utilizando la técnica de Kieser y las conjugaciones se realizaron por el método de Miller seleccionando en medios con azida de sodio con ampicilina (AMP) y cefotaxima (CTX). El 83% de las cepas fueron productoras de β -lactamasas, de las cuales el 21% (18) fueron productoras de BLEEs. Obteniendo una mayor frecuencia del gen *bla*_{TEM} 94.4% seguida del gen *bla*_{CTX-M} con 50% y 5.5% del gen *bla*_{SHV}. El 61.1% de cepas productoras de BLEE lograron conjugarse, transfiriendo un plásmido de 170 kb. Las cepas transconjugantes fueron multirresistentes. La resistencia de *E.coli* a cefalosporinas de tercera generación se correlacionó con la producción de BLEE tipo CTX-M, la multirresistencia de las cepas productoras de BLEE está codificada en un plásmido de 170 kb que es transferido a otras bacterias por conjugación.

Palabras clave: infecciones del tracto urinario, β -lactamasas de espectro extendido, multirresistencia.

Como citar el artículo:

Castro-Alarcón, N., Salgado-Gonzalez, J. F., Ocampo-Sarabia, R. L., Silva-Sánchez, J., y Ruíz-Rosas, M. (2014). Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. *Tlamati*, 5(1), 14-23.

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics is a mayor public health problem, particularly the Extended-spectrum β -lactamases (ESBL). These enzymes hydrolyzed beta-lactam antibiotics, which are commonly utilized as treatment for urinary tract infections (UTI). ESBL are enzymes that derive from classic β -lactamases mutations and vary in their capacity to hydrolyze cephalosporin. The most frequent ESBL produced by *Enterobacteriaceae* are type TEM, SHV and CTX-M. Most of the genes encoded for these enzymes are found codified in mobile genetic elements. The aims of this study was to characterize phenotypically and molecularly ESBL produced by *Escherichia coli* isolated from patients with UTI from ISSSTE's Hospital at Chilpancingo, Guerrero, México. 86 *E. coli* clinical isolated samples were analyzed. Antibiotics susceptibility was determined by disk diffusion and ESBL detection was done through combination disk method, following CLSI indications. ESBL identification was accomplished by PCR, using specific primer for *bla* genes. Plasmids extraction was performed using Kieser's technique and conjugations were carried out according to the method proposed by Miller, besides selections of sodium azide agar with ampicillin environment (AMP) and cefotaxime (CTX). 83% of the analyzed strains were β -lactamases producers, from which 21% (18) were ESBL producers. The *bla*_{TEM} gene was the most frequent (94.4%), followed by *bla*_{CTX-M} (50%) and *bla*_{SHV} (5.5%). 61.1% of ESBL strains producers could be conjugated, transferring a 170 kb plasmid. All of the transconjugant strains were multi resistant. Resistance of *E. coli* to third generation cephalosporin was correlated with the CTX-M ESBL type presence, multi resistance of ESBL-producing strain is encoded within a 170 kb plasmid transferred to other bacteria by conjugation.

Keywords: urinary tract infections, extended-spectrum β -lactamases, multidrug resistant.

Introducción

Las β -lactamasas son proteínas globulares monoméricas, pequeñas, solubles, la mayoría se expresan constitutivamente y son codificadas por genes *bla*. Las β -lactamasas son ubicuas en las bacterias Gram negativas y representan una forma importante de resistencia, pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Estas enzimas son producidas por bacterias patógenas, hidrolizan los anillos betalactámicos, formando derivados acíclicos incapaces de fijarse en sus dianas en la pared celular bacteriana y en consecuencia, volviéndolos ineficaces en su actividad antimicrobiana (Harada, Ishii, y Yamaguchi, 2008).

La clasificación de β -lactamasas ha sido tradicionalmente basada en sus características funcionales de la enzima o en su estructura primaria. En base a su secuencia de aminoácidos, están clasificadas en cuatro clases moleculares: A, B, C y D. La clase A, C y D incluye enzimas que hidrolizan su sustrato por formación de un acil enzima a través de un sitio activo serina, mientras que las β -lactamasas de clase B son metaloenzimas que utilizan en su sitio activo un ion de Zinc para facilitar la hidrólisis de los beta-lactámicos.

Además, se pueden clasificar de acuerdo a la comparación de su actividad funcional, la capacidad que tiene cada enzima para diferenciar las clases de compuestos betalactámicos, la sensibilidad a los inhibidores y las diferencias entre los parámetros bioquímicos. Un sistema funcional actualizado incluye el grupo 1 (clase C) cefalosporinas; grupo 2 (clase A y D) amplio espectro, resistente a inhibidores, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas; y el grupo 3 metalo- β -lactamasas (Bush y Jacoby, 2010).

Las BLEE son enzimas capaces de conferir resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y al aztreonam (pero no cefamicinas y carbapenémicos), por hidrólisis de estos antibióticos y son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico. Las BLEE se originaron a partir de las betalactamasas de amplio espectro del grupo 2e (TEM-1 y SHV-1) al grupo 2be que denota el espectro extendido y difieren de su progenitor por pocos cambios en su secuencia de aminoácido (Paterson y Bonomo, 2005).

La diseminación de las BLEE se ha convertido en un problema epidemiológico de gran importancia clínica, ya que los mecanismos de resistencia

bacteriana hacia antibióticos betalactámicos han aumentado, sobre todo en bacterias Gram negativas. La mayoría de los genes que codifican para estas enzimas, se encuentran en plásmidos conjugativos, transposones e integrones que mueven genes de un sistema de DNA a otro y de una célula bacteriana a otra, no necesariamente una relacionada al gen donador. Los plásmidos bacterianos sirven como un transportador en el cual son ensamblados los genes de resistencia por transposición o mecanismos de recombinación sitio específica. Los plásmidos tienen un papel central, sirven como vehículo para la captura de genes de resistencia y su subsecuente diseminación. Las evidencias sugieren que los genes de resistencia a antibióticos en patógenos bacterianos humanos se originaron de una multitud de fuentes bacterianas, generando bacterias multirresistentes (Benet, 2008).

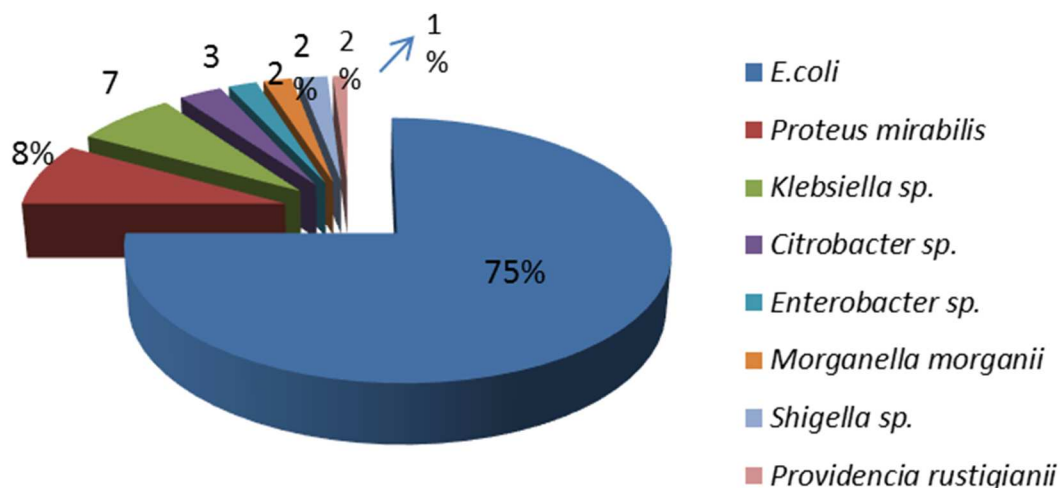
Las bacterias productoras de BLEE han emergido como el principal problema en pacientes hospitalizados, así como en pacientes en la comunidad. Estos organismos son responsables de una variedad de infecciones tales como infecciones del tracto urinario (ITU), septicemia, neumonía adquirida en el hospital, abscesos intra-abdominales, abscesos del cerebro e infecciones relacionadas con dispositivos médicos (Rawat y Nair, 2010).

En México, hay pocos reportes sobre los genotipos de BLEE producidas en grupos comunitarios, donde la

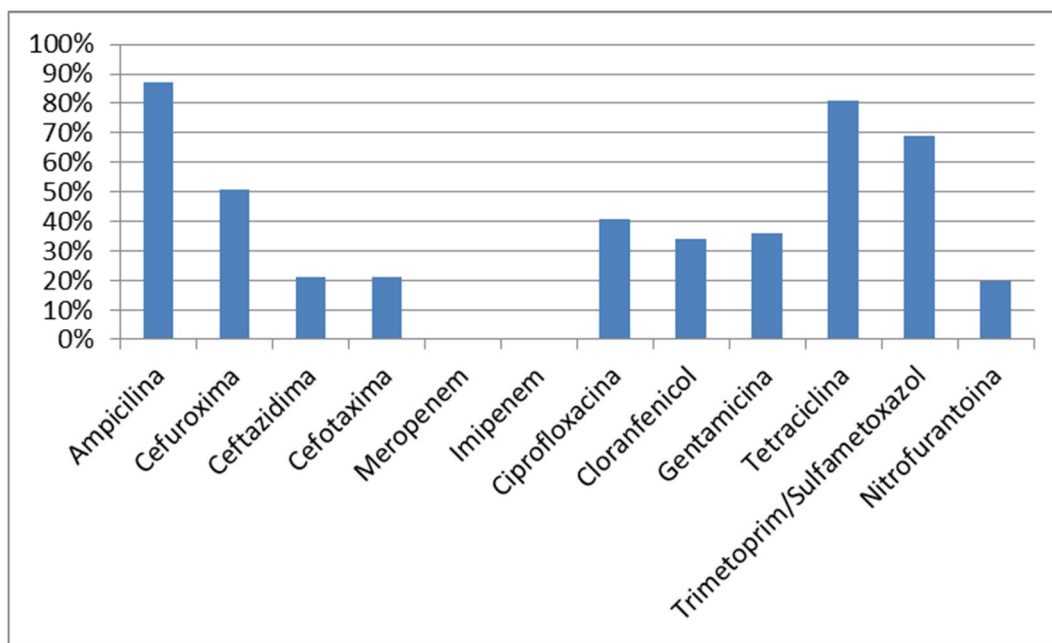
diseminación de estas enzimas puede tener graves implicaciones para los sistemas de salud. Las BLEE son el factor más importante de resistencia en Enterobacterias patógenas, y el incremento de su prevalencia, así como las tasas de evolución pueden estar ligadas al uso de nuevas subclases de betalactámicos. Entre las Enterobacterias, *Escherichia coli* es el microorganismo más aislado en ITU, el conocimiento de la prevalencia de genotipos en cierta localidad es importante en la vigilancia de la diseminación de la resistencia a antibióticos, que pueden diferir de una región a otra. El objetivo del estudio fue caracterizar fenotípica y molecularmente las BLEEs producidas por *E. coli* aisladas de pacientes con ITU en la clínica hospital del Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) de Chilpancingo, estado de Guerrero, México.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas. Se analizaron 86 aislamientos clínicos de *E. coli* recuperados de muestras de orina de pacientes ambulatorios derechohabientes de la clínica del ISSSTE, durante el periodo comprendido de Septiembre de 2010 a Agosto del 2011. Las que fueron identificadas con el sistema API 20 E (BioMérieux). Se utilizaron las siguientes cepas controles para las



Gráfica 1. Frecuencia de Enterobacterias en Infecciones del tracto urinario



Grafica 2. Frecuencia de resistencia en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*

diferentes metodologías: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterobacter cloacae* R55, *E. coli* S4, *E. coli* J53, *E. coli* SHV, *E. coli* CTX-M, *E. coli* TEM.

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos. A partir de un cultivo fresco de la cepa, se seleccionaron las colonias y se realizó una suspensión la cual se ajustó a la escala 0.5 de Mc Farland. Posteriormente se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión, se removió el exceso de líquido del hisopo rotándolo por las paredes del tubo y se procedió a realizar el sembrado cubriendo totalmente toda placa de agar Mueller Hinton (4 mm de espesor), repitiendo de dos a tres veces este paso para asegurar que el inóculo fuera distribuido homogéneamente. Se colocaron los discos con los antibióticos (cinco en cada placa) y se incubaron por 24 horas a 35°C, para medir después los halos de inhibición (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2012).

Detección de β -lactamasas. Se realizó la prueba de nitrocefina en las placas agar Muller-Hinton, donde se determinó la susceptibilidad, colocando una gota de nitrocefina sobre el cultivo. Si la prueba es positiva se observa una coloración rojiza en el medio al momento que se coloca la gota, si no hay cambio de color dentro de 30 segundos, la prueba se considera negativa. La prueba de doble disco combinado para la detección de BLEE se llevó a cabo de la misma manera que la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos, utilizando los discos con CAZ (30 μ g) y CTX (30 μ g) y

discos de estos mismos antibióticos adicionados con 10 μ g de clavulanato de potasio. Se incubaron a 35°C durante 16-18 horas. La producción de BLEE fue inferida si los halos de inhibición de los discos con clavulanato fueron ≥ 5 mm que los discos que no tenían inhibidor (Stuart, Diederer, Al Naiemi, Fluit, Arents, Thijsen, Vlamincx, (...), 2011; Wang, Hu, Xiong, Ye, Zhu, Wang, Wang (...), 2011).

Isoelectroenfoque (IEF). Para determinar los puntos isoeléctricos (pI) de las β -lactamasas, primero se procedió a obtener los extractos crudos de estas enzimas por roturación de cultivos celulares con perlas de vidrio y se realizó una prueba de nitrocefina. Los extractos crudos positivos a esta prueba se analizaron mediante IEF sobre geles de poliacrilamida con rangos de pH 3-9. Los valores de los pI se determinaron por la hidrólisis de nitrocefina que se hace evidente por la presencia de bandas anaranjadas (Matthew, Hedges, y Smith, 1979).

Extracción de DNA. Disolver de 2 a 3 colonias en 100 μ l de agua, hervir durante 5 min la suspensión bacteriana y colocar en hielo 5 min, repetir el procedimiento una vez más. Centrifugar 3 min a 10 000 rpm y recuperar el sobrenadante.

Amplificación de genes *bla*. Se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final, para genes *bla* (TEM, SHV y CTX-M) utilizando iniciadores específicos descritos anteriormente (Castro-Alarcón, Carreón-Valle, Moreno-Godínez, y Alarcón-Romero, 2008). La mezcla de reacción se realizó en un

volumen de 20 μ l, 5 unidades de Taq-polimerasa, 10 mM de dNTP's, 25 mM de $MgCl_2$, buffer amplificador de PCR 10 X, se emplearon 10 pmol de cada oligonucleótido y 5 μ l de ADN molde. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% a 100 V por 30 min, donde se verificó el tamaño del ADN a amplificar, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transluminador de luz UV.

Extracción de plásmidos. Se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Kieser (1984). Las cepas se sembraron en 5 ml de caldo Luria-Bertoni y se incubaron en agitación a 37°C toda la noche, se obtuvo la pastilla de las células bacterianas centrifugando a 5 000 rpm durante 3 min, la obtención del DNA se obtuvo con fenol-cloroformo, el patrón de plásmido se analizó en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis a 150 V por 6 horas.

Conjugaciones. Se utilizó el método descrito por Miller (1992), que consiste en hacer crecer un cultivo bacteriano de la cepa receptora (*E.coli* J53) y de la donadora (aislamientos clínicos). Posteriormente se hace una mezcla en proporción 1:10 de las cepas y se incuban a 37°C sin agitación. Se tomaron 100 μ l de la mezcla y se espatularon en medio de azida de sodio con ampicilina (AMP) y azida de sodio con cefotaxima (CTX). Las colonias obtenidas se replican con palillos en el medio M9 y MM.

Resultados

De 115 cepas de Enterobacterias aisladas de ITU, *Escherichia coli* fue el principal agente etiológico aislado en un 75 %, *Proteus mirabilis* en un 8%, *Klebsiella sp* se aisló en un 7%, también se aislaron algunas especies de *Citrobacter sp* con un 4%, *Enterobacter sp*, *Morganella morganii*, *Providencia rustgiani* y *Shigella sp* con un porcentaje menor (véase gráfica 1). Así mismo, se muestra la frecuencia de resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli*, el 21% fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y Cefotaxima), (véase gráfica 2). Se realizó la prueba de nitrocefina para detectar la producción de β -lactamasas en 115 cepas de enterobacterias incluidas en el estudio, de las cuales 71 cepas (62%) fueron positivas a la producción de β -lactamasas, y las 44 cepas restantes (38%) no produjeron β -lactamasas. Con la prueba de doble disco combinado se determinó que *Escherichia coli* fue la única especie productora de BLEE (véase figura 1). De las 86 cepas de *E. coli* aisladas de ITU, 71 cepas (83%) fueron positivas a la prueba de nitrocefina y las 15 cepas restantes (17%) fueron negativas. De las cepas *E. coli* analizadas, el 21% (18 cepas) fueron productoras de BLEE.

Los valores de *pI*, se determinaron por las bandas de hidrólisis de nitrocefina. En la figura 2 se muestran bandas detectables en el isoelectroenfoque, las cuales son compatibles con β -lactamasas tipo TEM y CTX-M.

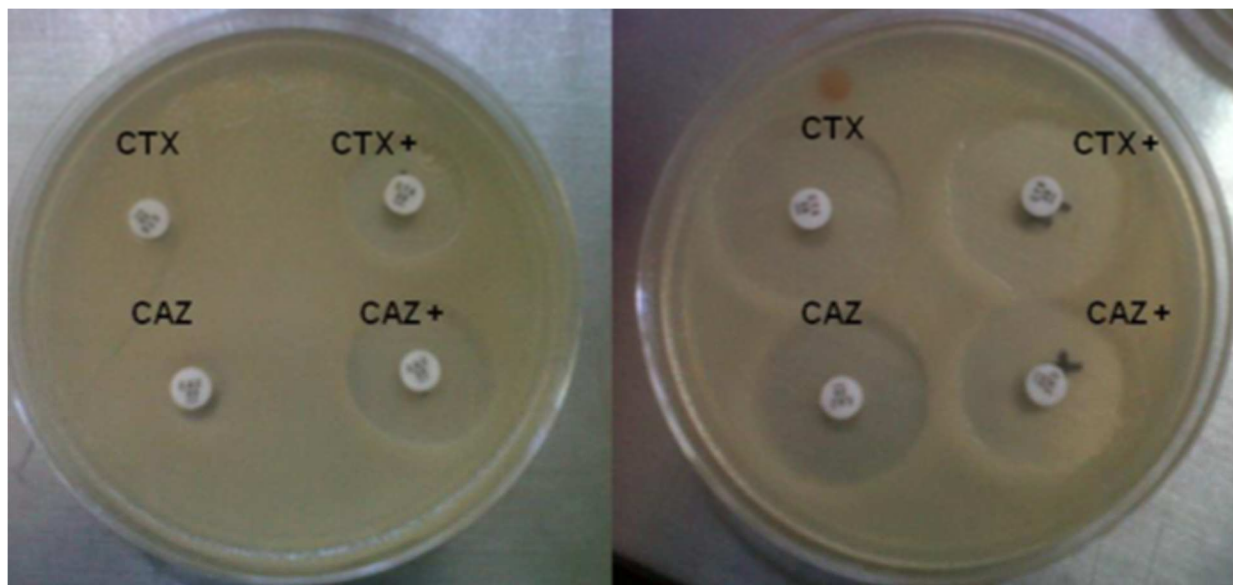


Figura 1. Prueba de doble disco combinado, A) Positiva y B) Negativa

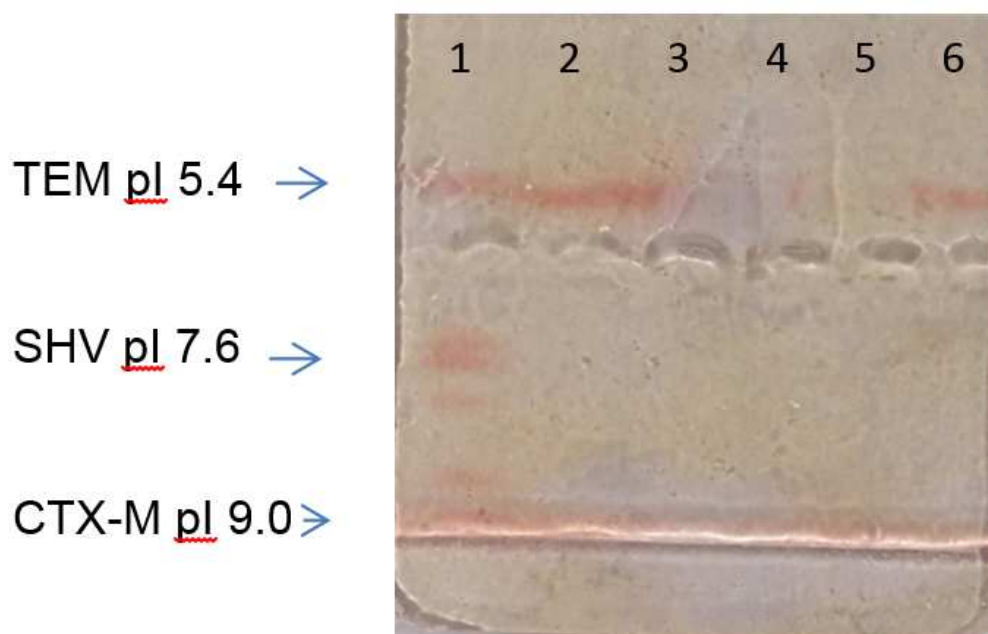


Figura 2. Gel de isoelectroenfoque. Carril 1. Cepas control, carril 2. 1351, carril 3. 1536, carril 4. 1539, carril 5. 1365, carril 6. 1415

La amplificación del gen *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX}* se realizó mediante una PCR en las 18 cepas productoras de BLEE, obteniendo productos de PCR de acuerdo al tamaño esperado. Se obtuvo una mayor frecuencia del gen *bla_{TEM}* 95 % (17 cepas) lo cual se correlaciona con un *pI* de 5.4, mientras que el gen *bla_{CTX-M}* se encontró con una frecuencia del 50% (9 cepas), solo una cepa presentó el gen *bla_{SHV}* (5.5%).

A las cepas productoras de BLEEs se les realizaron conjugaciones, seleccionando en medios con azida de sodio + AMP y azida de sodio + CTX. Se verificaron las cepas transconjugantes por la técnica de replicación en palillo, usando placas de medio mínimo (MM) comparado con M9 (prolina y metionina). Se obtuvieron transconjugantes en el 61.1% (11 cepas) de *E. coli* productoras de BLEE, mientras que el 38.9% (7 cepas) no lograron conjugarse.

También se realizó PCR a las cepas transconjugantes para corroborar la presencia del gen *bla_{CTX}*, (véase figura 3). En los aislamientos clínicos y en las transconjugantes se determinó la presencia de un solo megaplásmido de aproximadamente 170 kb. De manera simplificada se muestran los resultados de las cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (véase tabla 1).

Discusión y conclusiones

En este estudio se caracterizaron los aislamientos

clínicos de *E. coli* causante de ITU en la comunidad de Chilpancingo, Gro., para la determinar los genotipos de BLEE, su asociación con los perfiles de resistencia a antibióticos y transferencia horizontal. Como antecedente, en un estudio publicado por Carreón-Valle, Castro-Alarcón, Cruz-Mora, y Manrique-García (2010), realizado en la misma localidad, se encontró una prevalencia de *E.coli* del 71.9 % en pacientes con ITU, de las cuales el 16% fueron productoras de BLEE. En nuestro estudio, se detectó la producción de β -lactamasas en el 83% de las cepas, y el 21% fueron productoras de BLEE, lo que representa un incremento de *E. coli* productoras de BLEE en la comunidad. La prevalencia de BLEE varía, dependiendo del tipo de infección en las diferentes regiones del mundo. En un estudio publicado por Rodríguez-Avial, C., Rodríguez-Avial, I., Hernández, y Picazo, (2013) realizado en España a pacientes con ITU en los años 2005, 2009 y 2011, se encontró una producción de BLEE de 3.9%, 7.3% y el 8.7%, respectivamente en enterobacterias. Comparado con la presente investigación la prevalencia de BLEE es menor, pero también ha ido en aumento a través de los años.

El isoelectroenfoque es utilizado para determinar el punto isoelectrico de enzimas en un campo de pH, las β -lactamasas presentan un rango de pH que va de 5.2 a 9. En los últimos años, este método de identificación ya no es utilizado debido a que las bacterias han sufrido numerosas mutaciones, lo que ha originado cambios de

Tabla 1. Caracterización fenotípica y molecular de *E.coli* productoras de BLEE

Cepa	Resistencia a antibióticos	PCR gen <i>bla</i>			Plásmido donadora	Conjugación		Plásmidos > 170kb	Resistencia en cepas transconjugantes
		TEM	SHV	CTX-M		AMP	CAZ		
1351	AMP, CXM,CAZ,CTX, CIP,TE,SXT	+		+	+	+		+	AMP, CXM, CAZ,CTX
1365	AMP,CXM,CAZ,CTX,CIP,GM,TE,SXT	+		+	+	+	+	+	AMP,CXM, CAZ,CTX,GM,CIP,TE,SXT
1372	AMP, CXM, CTX,CIP,GM,TE,SXT	+			+	+	+	+	AMP,CTX,TE
1373	AMP,CXM,CAZ,CTX,CIP,GM,TE,SXT	+		+	+	+	+	+	AMP,CAZ,CTX
1386	AMP, CXM,CAZ,CTX	+		+	+				
1396	AMP, CXM,CAZ,CTX,	+		+	+				
1397	AMP, CXM,CAZ,CTX, CIP,GM,TE	+		+	+	+	+	+	AMP, CXM,CTX, GM,TE
1415	AMP,CAZ,CTX,CIP,TE,SXT,GM	+		+	+	+		+	AMP,CAZ,CTX
1451	AMP, CXM,CAZ,CTX	+			+				
1503	AMP, CXM,CAZ,CTX, TE,GM	+			+	+	+	+	AMP,CAZ,CTX,TE
1515	AMP, CXM,CAZ,CTX,	+			+				
1535	AMP, CXM,CAZ,CTX,CIP, GM, TE	+		+	+	+	+	+	AMP,CAZ, CTX
1536	AMP,CXM,CAZ,CTX,CIP,GM,TE,SXT	+		+	+		+	+	AMP, CXM, CTX, GM, SXT
1539	AMP, CXM,CAZ,CTX,		+		+				
1572	AMP, CXM,CAZ,CTX,	+			+				
1573	AMP, CTX,CIP,GM,C, TE,SXT	+			+	+		+	AMP,CTX, CIP, GM,TE,C
1574	AMP, CXM,CAZ,CTX,	+			+				
1575	AMP, CXM,CTX, CIP,TE,SXT	+			+	+	+	+	AMP, CTX

AMP, Ampicilina; CXM, Cefuroxima; CAZ, Ceftazidima, CTX, Cefotaxima; CIP, Ciprofloxacina, C, Cloranfenicol; GM, Gentamicina; TE, Tetraciclina; SXT, Trimetoprim/Sulfametoxazol

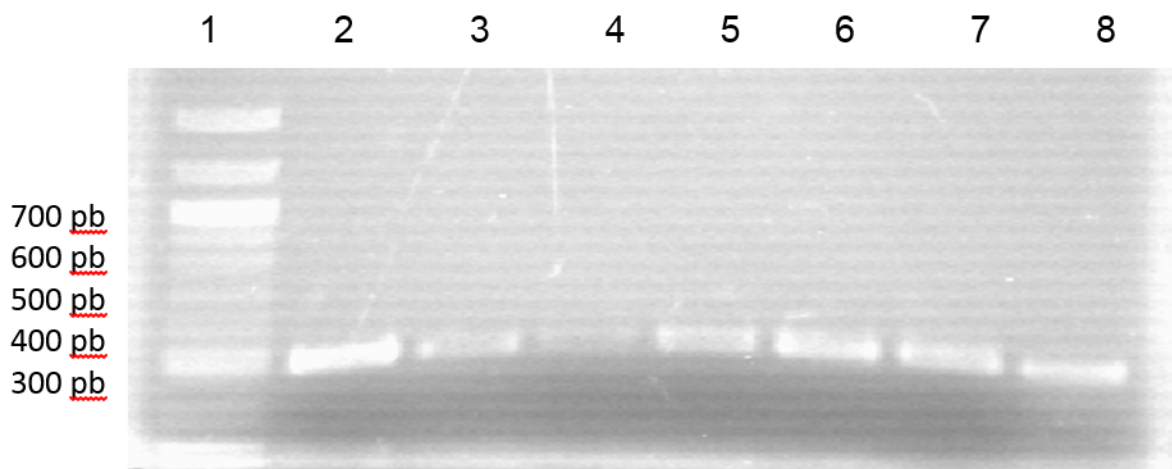


Figura 3. Productos de PCR del gen *bla*_{CTX} en transconjugantes. Carril 1: Marcador 100 pb; Carril 2: Control 544pb Carril 3: Cepa 1415 Carril 4: Cepa 1365 Carril 5: Cepa 1351 Carril 6: Cepa 1397 Carril 7: Cepa 1503 Carril 8: 1536

pI en las β -lactamasas. Aun así, se realizó esta prueba para poder orientarnos sobre qué tipo de β -lactamasas están presentes en cada aislamiento clínico y poder comprobarlo con la PCR. Los *pI* de 5.4 encontrados se correlacionaron con β -lactamasas de tipo TEM de amplio espectro y el *pI* de 9.0 con CTX-M de espectro extendido, de manera similar como lo han reportado Castro-Alarcón et al. (2008).

Los genes que codifican para β -lactamasas son probablemente los más distribuidos internacionalmente. Zaniani, Meshkat, Nasab, Khaje-Karamadini, Ghazvini, Rezaee, et al (2012), reportan una frecuencia de SHV y TEM de 14.4% y 20.6% respectivamente en Irán. De la misma forma Akpaka, Legall, y Padman (2010), en un estudio realizado en la ciudad de Trinidad y Tobago, también reportaron cepas de β -lactamasas de tipo TEM-1 (84.3%) en cepas de *E. coli*. En nuestro estudio la prevalencia de enzimas TEM fue muy alta (94%). Cabe mencionar que estas fueron de amplio espectro y a las bacterias que producen este tipo de enzimas le confieren resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación.

En un estudio en México en aislamientos clínicos de *E. coli* aisladas de ITU adquiridas en la comunidad (Reyna-Flores, Barrios, Garza-Ramos, Sánchez-Pérez, Rojas-Moreno, Uribe-Salas, Fagundo-Sierra, et al, 2013), el 10.2% fueron productoras de BLEE, y el tipo de BLEE identificadas fueron CTX-M-15 (96.4%) SHV-2^a (3%) y TLA-1 (1%). En otro estudio realizado en aislamientos de Enterobacterias obtenidos en un hospital de México (Morfin-Otero, Mendoza-Olarzaran, Silva-Sánchez, Rodríguez-Noriega, Lacadiaz, Tinoco-Carrillo, Petersen, et al, 2013), CTX-M-

15 fue detectada en el 85% de *E. coli* y en 76% de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE. SHV-5 fue identificada en el 17% de aislamientos de *E. coli* y en el 86% de aislamientos de *K. pneumoniae*. Pitout y Gregson en el 2005 realizaron un estudio en cepas aisladas de pacientes de la comunidad en la región de Calgary en Canadá en donde el 55% las cepas fueron positivas para el gen *bla*_{CTX-M} y mostraron resistencia a cefotaxima, además encontraron que todos los aislamientos presentan una producción adicional de enzimas de tipo TEM-1. Maina, Revathi, Kairuki, y Ozwara (2012), reportaron *bla*_{CTX} en 88.5%, *bla*_{SHV} en 25% y *bla*_{TEM} en 34.6% de los aislamientos de Enterobacterias de la comunidad en Kenya. De las 18 cepas productoras de BLEEs analizadas en este estudio, el 50% fueron positivas para el gen *bla*_{CTX-M}, el cual codifica para β -lactamasas de espectro extendido, con un *pI* de 9.0 que se relacionó con la resistencia a cefalosporinas de tercera generación (21%). Estos resultados demuestran que el tipo de BLEE más prevalente tanto en hospitales como en la comunidad es CTX-M. Mientras que las β -lactamasas de tipo SHV han disminuido notablemente.

Los mecanismos de resistencia a antibióticos en las bacterias son variados, incluyen la hidrólisis de antibiótico, modificación del sitio blanco y alteración de la permeabilidad del antibiótico. La adquisición de genes necesarios para la elaboración de estos mecanismos es muy alta debido a la variedad de sistemas de transferencia de genes, tales como plásmidos conjugativos. Pallecchi, Bartoloni, Fiorelli, Mantella, Di Maggio, Gamboa, Gotuzzo, et al (2007), reportaron la presencia de plásmidos en aislamientos de *E. coli* comensales en niños sanos de bajos recursos de

regiones de Perú y Bolivia. Estos plásmidos contenían genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} y otros genes de resistencia para antibióticos no beta-lactámico, tres plásmidos portaban genes que codifican para la resistencia a quinolonas; estos plásmidos fueron transferidos por conjugación. En nuestro estudio se encontró que el 61% de cepas productoras de BLEE fueron capaces de transferir un plásmido de aproximadamente 170 kb. De igual manera se realizó la búsqueda en las cepas transconjugantes del gen *bla*_{CTX-M} y se determinó la susceptibilidad a antibióticos. Se encontró que las transconjugantes adquirieron el gen de su célula donadora, presentaron resistencia a los mismos antibióticos beta-lactámicos y adicionalmente resistencia de uno a cuatro antibióticos no betalactámicos. Estos resultados indican que este plásmido porta genes que confieren multiresistencia (resistencia a más de dos tipos de antibióticos) y la rápida diseminación y diversidad de BLEE en aislamientos clínicos de la comunidad.

En conclusión, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación se correlacionó con la presencia BLEE de tipo CTX-M, la multiresistencia de las cepas productoras de BLEE está codificada en un plásmido de 170 kb que es transferido a otras bacterias por conjugación.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma de Guerrero en la convocatoria 2012.

Referencias

- Akpaka, P.E, Legall. B., y Padman, J. (2010). Molecular detection and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase genes prevalent in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* from Trinidad and Tobago. [Detección molecular y epidemiología de amplio-espectro de genes beta-lactamasa prevalentes en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* en Trinidad y Tobago]. *West Indian Medical Journal*, 59,591–596.
- Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. [Resistencia a antibióticos del plásmido codificado: adquisición y transferencia de genes de resistencia a antibióticos en bacterias]. *Journal of Pharmacology*, 153, S347-S357.
- Bush, K., y Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. [Clasificación funcional actualizada de β -lactamases]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 969-76.
- Carreón-Valle, E.D., Castro-Alarcón, N., Cruz-Mora, J., Manrique-García, M. S. (2010). Caracterización molecular de β -lactamasas en Enterobacterias aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 30, S81.
- Castro-Alarcón N, Carreón-Valle, E.D., Moreno-Godínez, M.E., y Alarcón-Romero, L.M. (2008). Molecular characterization of extended spectrum β -lactamasas producing *Escherichia coli*. [Caracterización molecular del amplio-espectro de β -lactamasas produciendo *Escherichia coli*]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 28, 114-120.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement*. [Normas de funcionamiento de pruebas de susceptibilidad Antimicrobiana; Vigésimosegundo suplemento de información]. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- Harada, S., Ishii, Y., Yamaguchi, K. (2008). Extended spectrum beta lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. [Amplio-espectro de beta lactamasas: implicaciones en el laboratorio clínico y terapia]. *The Korean Journal of Laboratory and Medicine*, 28, 401-12.
- Kiesser T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. [Factores que afectan el aislamiento de CCC DBNA desde *Streptomyces lividans* y *Escherichia coli*]. *Plasmid*, 12, 19-36.
- Maina, D., Revathi, G., Kairuki, S., Ozwara, H. (2012). Genotypes and cephalosporin susceptibility in extended-spectrum beta-lactamasas producing enterobacteriaceae in the community. [Susceptibilidad de genotipos y cefalosporina en beta-lactamasas de amplio-espectro produciendo enterobacterias en la comunidad]. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6, 470-477.
- Matthew, M., Hedges, R.W., Smith, J.T. (1979). Types of β -lactamasas determined by plasmid in gramnegative bacteria. [Tipos de β -lactamasas determinados por plásmidos en bacterias gramnegativas]. *Journal of Bacteriology*, 138, 657-672.
- Miller, J.H. (1992). *Experiments in molecular genetics*. [Experimentos en genética molecular]. Cold Spring

- harbor Laboratory, Nueva York; USA: Cold Spring Harbor. 82-85p.
- Morfin-Otero, R., Mendoza-Olarzarán, S., Silva-Sánchez, J., Rodríguez-Noriega, E., Laca-Díaz, J., Tinoco-Carrillo, P., Petersen, L., López, P., Reyna-Flores, F., Alcantar-Curiel, D., Garza-Ramos, U., Garza-González, E. (2013). Characterization of Enterobacteriaceae isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum β -lactamases. [Caracterización de enterobacterias aisladas obtenidas de un hospital de cuidados terciarios en México, que producen β -lactamasas de amplio-espectro]. *Microbial Drug Resistance*, 19, 378-83.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H., Gotuzzo, E., Kronvall, G., Paradisi, F., Rossolini, G.M. (2007). Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. [Rápida difusión y diversidad de genes beta-lactamasa CTX-M -amplio-espectro en comensales de *Escherichia coli* aislados de niños sanos de entornos de bajos recursos en América Latina]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 2720-2725.
- Paterson, D.L., y Bonomo, R.D. (2005). Extended spectrum β -lactamases: a clinical update. [β -lactamasas de amplio-espectro: Una actualización clínica]. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 657-86.
- Pitout, J., Gregson, D. (2005). Community-Wide Outbreaks of Clonally Related CTX-M-14 -Lactamase-Producing *Escherichia coli* strains in the Calgary Health Region. [Brotos comunitarios de CTX-M-14-lactamasa producidas por cepas de *Escherichia coli* en Calgary Health Región]. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2844-9.
- Rawat, D., Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative Bacteria. [β -lactamasas de amplio-espectro en bacterias Gram negativas]. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2, 263-74.
- Reyna-Flores, F., Barrios, H., Garza-Ramos, U., Sánchez-Pérez, A., Rojas-Moreno, T., Uribe-Salas, F.J., Fagundo-Sierra, R., Silva-Sánchez, J. (2013). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 isolates causing community UTIs in Mexico. [Epidemiología molecular de *Escherichia coli* aisladas que causan UTI's (enfermedades del tracto urinario) en comunidades de México]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76, 396-8.
- Rodríguez-Avial, C., Rodríguez-Avial, I., Hernández, E., Picazo, J.J. (2013). Increasing prevalence of fosfomycin resistance in extended-spectrum-beta-lactamase producing *Escherichia coli* urinary isolates (2005-2009-2011). [Incremento de prevalencia de fosfomicina en beta-lactamasa de amplio-espectro produciendo infecciones urinarias aisladas por *Escherichia coli*]. *Revista Española de Quimioterapia*, 26, 43-46.
- Stuart, J.C., Diederer, B., Al Naiemi, N., Fluit, A., Arents, N., Thijsen, S., Vlamincx, B., Mouton, J.W., Leverstein-van Hall, M. (2011). Method for phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases in enterobacter species in the routine clinical setting. [Método para detección fenotípica de beta-lactamasas de amplio-espectro en especies de enterobacterias mediante ajustes clínicos de rutina]. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 2711-2713.
- Wang, P., Hu, F., Xiong, Z., Ye, X., Zhu, D., Wang, Y.F., Wang, M. (2011). Susceptibility of extended-spectrum -beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae according to the new CLSI breakpoints. [Susceptibilidad de beta-lactamasas de amplio-espectro produciendo enterobacterias de acuerdo a los nuevos puntos de corte del CLSI]. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 3127-3131.
- Zaniani, F.R., Meshkat, Z., Nasab, M.N., Khaje-Karamadini, M., Ghazvini, K., Rezaee, A., Esmaily, H., Navabinia, M.S., Hoseini, M.D. (2012). The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. [La prevalencia de los genes TEM y SHV entre beta-lactamasas de amplio-espectro produciendo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 5, 654-660.