

Diversidad de β -lactamasas en aislamientos clínicos de enterobacterias*

β -lactamases diversity in clinical isolates of enterobacterias

Diversidade de β -lactamasas em isolamentos clinicos de enterobactérias

► Cecilia Casabonne¹, Jorgelina Pérez², Claudia Balagué³, Luisa Fernández⁴

Resumen

La rápida emergencia de resistencia a antimicrobianos debida a la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) tiene un impacto significativo en la salud pública. Las BLEEs son enzimas producidas por bacilos gram-negativos y confieren resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenemes ni a las cefamicinas y la mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia a antibióticos β -lactámicos en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* y caracterizar las β -lactamasas responsables de dicha resistencia. Se analizaron 2.030 aislamientos (362 *Klebsiella pneumoniae*, 1.250 *Escherichia coli* y 175 *Proteus mirabilis*) provenientes de diferentes materiales clínicos de pacientes que concurren al Hospital Provincial del Centenario de la ciudad de Rosario (Santa Fe) durante el período 2008-2009. Los ensayos de sensibilidad antibiótica se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standard Institute. Se confirmó la presencia de los genes codificantes de BLEE bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} y bla_{PER} mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos. Los aislados fueron caracterizados fenotípicamente como productores de BLEE y demostraron poseer varios genes *bla*. Se detectaron tres diferentes β -lactamasas BLEE derivadas de SHV, TEM y CTX-M y se demostró que pueden coexistir dos o más de estos genes en una misma bacteria.

Palabras clave: β -lactamasas de espectro extendido * *Enterobacteriaceae* * reacción en cadena de la polimerasa

Summary

The rapid emergence of antimicrobial resistance due to extended spectrum β -lactamases (ESBL) has a significant impact on public health. ESBL, produced by gram-negative bacilli, are enzymes that confer resistance to penicillins,

¹ Bioquímica Especialista en Bacteriología (Auxiliar de Primera Categoría dedicación semi-exclusiva).

² Bioquímica Especialista en Bacteriología (Jefe de Trabajos Prácticos dedicación simple).

³ Doctora de la Universidad Nacional de Rosario (Profesora adjunta).

⁴ Doctora de la Universidad Nacional de Rosario (Profesora).

* Departamento de Microbiología. Área de Bacteriología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario - Rosario (Santa Fe) - Argentina.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

cephalosporins and aztreonam, but not to carbapenems or cephamycins, and are usually inhibited by clavulanic acid. The aim of this study was to evaluate β -lactam resistance within isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* and to characterize the β -lactamases responsible for this resistance. A total of 2,030 strains (362 *Klebsiella pneumoniae*, 1,250 *Escherichia coli*, and 175 *Proteus mirabilis*) isolated from patients at Hospital Provincial del Centenario in Rosario-Santa Fe were analyzed from 2008 to 2009. Antibiotic sensitivity tests were performed according to Clinical and Laboratory Standard Institute recommendations. Molecular detection of ESBL-related *bla* genes, including *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{PER} was performed by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. The strains were phenotypically confirmed as ESBL producers and the isolates carried several *bla* genes. Three different β -lactamases were detected: SHV-related, TEM-related and CTX-M-related, showing that two or more genes may coexist in the same bacterium.

Key words: extended spectrum β -lactamases * Enterobacteriaceae * polymerase chain reaction

Resumo

A rápida emergência de resistência a antimicrobianos devida à presença de β lactamases de espectro estendido (BLEE) tem um impacto significativo na saúde pública. As BLEEs são enzimas produzidas por bacilos gram-negativos e conferem resistência às penicilinas, a todas as cefalosporinas e ao aztreonam, mas não aos carbapenêmicos nem às cefamicinas e a maioria são inibidas pelo ácido clavulânico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência a antibióticos β -lactâmicos em isolamentos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* e caracterizar as β -lactamases responsáveis por tal resistência. Foram analisados 2.030 isolamentos (362 *Klebsiella pneumoniae*, 1.250 *Escherichia coli* e 175 *Proteus mirabilis*) provenientes de diferentes materiais clínicos de pacientes que foram ao Hospital Provincial do Centenário da cidade de Rosario (Santa Fe) durante o período 2008-2009. Os ensaios de sensibilidade antibiótica foram realizados de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute. Confirmou-se a presença dos genes codificantes de BLEE *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{PER} mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando cebadores específicos. Os isolados foram caracterizados fenotipicamente como produtores de BLEE e demonstraram possuir vários genes *bla*. Foram detectadas três diferentes β -lactamases derivadas de SHV, TEM e CTX-M e se demonstrou que podem coexistir dois ou mais destes genes numa mesma bactéria.

Palavras chaves: β -lactamases de espectro estendido * Enterobacteriaceae * reação em cadeia da polimerase

Introducción

La aparición de cepas bacterianas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) constituye un problema de salud pública que afecta a todo tipo de instituciones y a la comunidad en general. Las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), TEM-1, TEM-2 y SHV-1, pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush y *et al.* son codificadas en genes plasmídicos y se encuentran ampliamente distribuidas en bacilos gram-negativos. Las BLEA son las primeras β -lactamasas que confieren resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas (1).

La presencia de mutaciones en los genes que codifican a las BLEA, dieron lugar a las llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). La aparición de estas enzimas ha estado asociada a la introducción y uso masivo de cefalosporinas de amplio espectro y de aztreonam. La primera de estas BLEE, descubierta en Alemania en 1984, se denominó como TEM-3 por ser una variante

de la TEM-2 (2). En general, las mutantes de TEM-1 y TEM-2 han sido denominadas como TEM-3 a TEM-139, y de SHV-1, SHV-2 a SHV-63, todas éstas ampliamente diseminadas por el mundo. Si bien la mayoría de las BLEE derivan de las BLEA, existen otras BLEE que difieren de TEM y SHV en su historia evolutiva. Entre éstas se pueden mencionar a las BLEE tipo CTX-M, PER, OXA, entre otras. En la actualidad, la producción de BLEE en aislamientos de origen clínico es un problema serio en pacientes hospitalizados por las implicaciones clínicas, terapéuticas y económicas, principalmente en infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y en algunos casos, por *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis*. Los microorganismos productores de BLEE son resistentes a penicilina, cefalosporinas y aztreonam, pero no a las cefamicinas ni carbapenems y son inhibidas por ácido clavulánico. Sumado a esto, se describe un elevado porcentaje de estos aislamientos caracterizados por presentar resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol (3). Múltiples

estudios demuestran que los aislamientos de *Klebsiella* en América Latina presentan la mayor prevalencia de BLEE en el mundo (45,4-51,9%), en tanto la prevalencia de aislamientos de *Escherichia coli* productores de BLEE es de 8,5-18,1% en países de América Latina, cifras superiores a las que presentan otros países en desarrollo. Sin embargo, la prevalencia de aislamientos de *Proteus mirabilis* productores de BLEE difiere de un país a otro, con cifras que alcanzan 33-40% en Argentina (3) (4). El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia a antibióticos β -lactámicos en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* y caracterizar las β -lactamasas responsables de dicha resistencia.

Materiales y Métodos

AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

Se estudiaron 2.030 aislamientos de enterobacterias durante el período 2008-2009, provenientes de diferentes materiales clínicos de pacientes internados y ambulatorios del Hospital Provincial del Centenario, Rosario-Santa Fe. Las muestras de las que se obtuvieron los microorganismos fueron orina, líquido de punción, sangre, secreciones bronquiales, catéteres, materia fecal y materiales varios como secreciones oculares y de heridas.

La identificación a nivel de especie se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y mediante el equipo comercial Api 20E (bioMérieux Argentina).

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Se efectuó por método de difusión en agar con discos de papel impregnados en antibióticos. Los antibacterianos probados (monodiscos de papel, BBL o Difco) fueron: ampicilina (AMP), 10 μ g; ampicilina/sulbactama (AMS), 10/10 μ g; amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), 20/10 μ g; cefalotina (CEF), 30 μ g; ceftazidima (CAZ), 30 μ g; cefotaxima (CTX), 30 μ g; piperacilina/tazobactam (TAZ), 100/10 μ g; cefepime (FEP), 30 μ g; cefoxitina (FOX), 30 μ g; imipenem (IMP), 10 μ g; meropenem (MEM), 10 μ g; gentamicina (GEN), 10 μ g; amicacina (AKN), 30 μ g; ciprofloxacina (CIP), 5 μ g; ácido nalidíxico (NAL), 30 μ g; trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) 1,25/23,75 μ g. Se utilizaron las siguientes cepas controles: *Escherichia coli* ATCC 25922 para los discos de antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenemes) y *Escherichia coli* ATCC 35218 para la combinación β -lactámico/inhibidor de β -lactamasas (ampicilina-sulbactama, piperazilina-tazobactama, amoxicilina-ácido clavulánico). La lectura de los halos de sensibilidad se realizó de acuerdo a las normas del *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)* (5).

DETECCIÓN DE BLEE MEDIANTE LA PRUEBA DE SINERGIA CON DOBLE DISCO

La identificación de cepas productoras de BLEE se realizó mediante la técnica de la sinergia del doble disco descrita por Legrand *et al.* Está basada en la propiedad del ácido clavulánico de inhibir estas enzimas. Se realiza por difusión en agar utilizando una placa de Mueller-Hinton inoculada con una suspensión bacteriana ajustada al patrón de 0,5 de la escala McFarland; sobre ella se colocan los discos con carga estándar (30 μ g) de cefotaxima, ceftazidima, o ceftriaxona y aztreonam dispuestos a una distancia de 25-30 mm de discos de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g). Se considera sinergia positiva y, por tanto, presencia de una BLEE, cuando se observa una ampliación del halo de inhibición en alguna de las cefalosporinas o del aztreonam (6).

DETECCIÓN DE BLEE MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL FENOTIPO CON ÁCIDO CLAVULÁNICO

Este ensayo según las normas de la CLSI es confirmatorio de la presencia de BLEE, porque mide el aumento del tamaño del halo de inhibición en la combinación del antibiótico más el inhibidor comparado con el halo generado por el antibiótico sin inhibidor. Para la realización de este ensayo se utilizaron los siguientes monodiscos: cefpodoxima (10 μ g), cefpodoxima/ácido clavulánico (10/1 μ g) (PAC); cefotaxima (30 μ g), cefotaxima/ácido clavulánico (30/10 μ g) (CTC) y ceftazidima (30 μ g), ceftazidima/ácido clavulánico (30/10 μ g) (CAC). Los monodiscos comerciales de cefotaxima, ceftazidima, y aztreonam, fueron impregnados con 10 mL de una solución de clavulanato de litio de 1000 μ g/mL. El aumento en 5 mm del halo de inhibición en el disco del antibiótico más el inhibidor, en comparación al del antibiótico sólo, indicaban que la bacteria era productora de BLEE (7).

DETECCIÓN DE LOS GENES bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{PER} Y bla_{CTX-M} MEDIANTE PCR

El ADN plasmídico se obtuvo mediante la técnica del herido a partir de un cultivo en 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) con el agregado de 5 μ g de cefotaxima (8). Se realizó la técnica de PCR para detectar los genes que codifican la producción de BLEE en todos los aislamientos caracterizados fenotípicamente como productores de esta enzima. Se seleccionaron al azar 90 aislamientos de enterobacterias caracterizadas fenotípicamente como productoras de BLEE los cuales posteriormente fueron ensayados para detectar la presencia de los genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{PER} y bla_{CTX-M} utilizando los cebadores específicos: bla_{TEM} -1 (5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3') y bla_{TEM} -2 (5'-CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA-3'), bla_{SHV} -1 (5'-GGG TTA TTC TTA

TTT GTC GC-3') y *bla_{SHV}-2* (5' GGT TAT GCG TTA TAT TCG CC 3'), *bla_{PER}-1* (5'-CGC TTC TGC TCT GCT GAT-3') y *bla_{PER}-2* (5'-GGC CAG CTT CTT TAA CGC C-3') y *bla_{CTX-M}-1* (5'-GGA ATT CAT GAT GAC TCA GAC CAT TGC-3') y *bla_{CTX-M}-2* (5'-GCT CTA GAT TAT TGC ATC AGA AACCGT G-3') (10-12). Las condiciones de amplificación se realizaron de acuerdo con las descritas en trabajos anteriores (9). Los productos amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% que contenían 0,5 µg/ mL de bromuro de etidio. Para visualizar los fragmentos amplificados se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta y se los comparó con el marcador de peso molecular One Kb (Promega).

Resultados

Se identificaron 362 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, 1.250 de *Escherichia coli* y 175 de *Proteus mirabilis*. Los aislamientos se obtuvieron a partir de muestras asociadas a diferentes patologías. La distribución de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* en los diferentes materiales clínicos se observa en la Figura 1.

El análisis del antibiograma empleando la técnica de difusión de Kirby Bauer y teniendo en cuenta los crite-

rios de sensibilidad, sensibilidad disminuida y resistencia del CLSI, de acuerdo a los tamaños de los halos de inhibición, demostró resistencia a uno o más tipos de antibacterianos. Prevalció la resistencia a β-lactámicos, principalmente oximino-cefalosporinas (cefotaxima y/o cefotaxima) y la sensibilidad a cefoxitina y aminoglucósidos. Este comportamiento frente a los antibióticos β-lactámicos permitió inferir que las cepas expresaban la producción de BLEE.

Se detectó la presencia de cepas productoras de BLEE mediante la técnica de sinergia con doble disco. En la Figura 2.A, se observa una ampliación del halo de inhibición en las cefalosporinas de tercera generación debido a la propiedad inhibitoria del ácido clavulánico sobre estas enzimas. Esto se considera sinergia positiva y, por lo tanto, aislamiento sospechoso de producción de BLEE. Siguiendo el criterio aconsejado por el CLSI, a todas las cepas en estudio se les confirmó la presencia de BLEE mediante el ensayo de inhibición del fenotipo por ácido clavulánico. El aumento en 5 mm del halo de inhibición con el disco antibiótico/ inhibidor, indicaba que la bacteria es productora de BLEE. Figura 2.B.

Del total de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* estudiados (362), el 30,9% de los mismos fueron con-

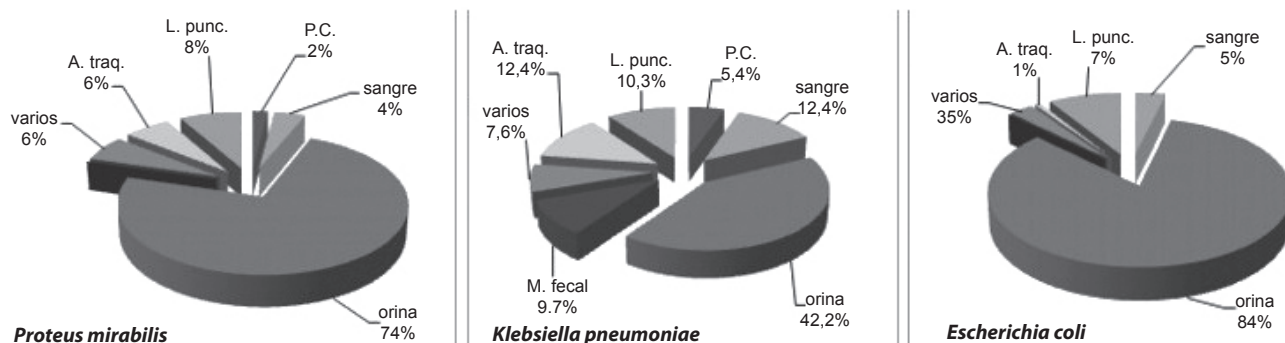


Figura 1. Distribución de *K. pneumoniae*, *E.coli* y *P.mirabilis* en los diferentes materiales clínicos estudiados. A.traq: aspirado traqueal; L.punc.: líquido de punción; P.C: punta de catéter; M fecal: materia fecal.

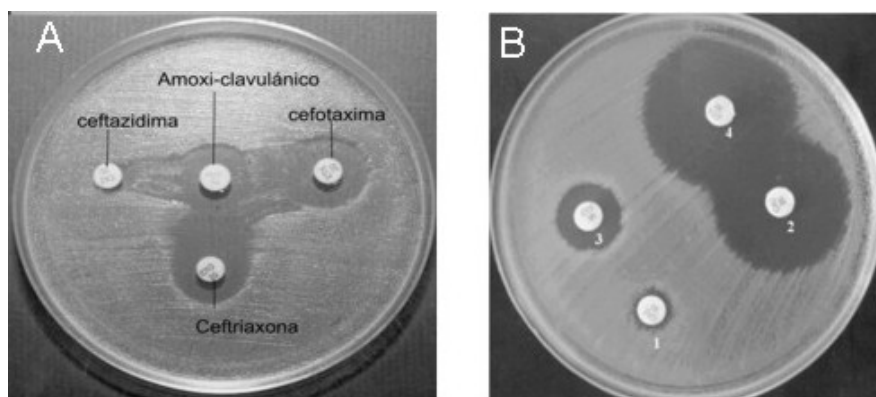


Figura 2.A. Efecto de la sinergia entre amoxicilina-ácido clavulánico y cefotaxima, ceftriaxona o ceftazidima y 2.B: Agrandamiento del tamaño del halo de inhibición producido por el disco del antibiótico impregnado con 10 µg de clavulanato de litio. 1: ceftazidima (30 µg); 2: ceftazidima (30 µg)/clavulanato de litio (10 µg); 3: cefotaxima (30 µg) y 4: cefotaxima (30 µg)/clavulanato de litio (10 µg).

firmados, mediante los métodos antes mencionados, como productores de BLEE. Analizando los aislamientos de *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* un 1,9% y 16%, respectivamente, fueron caracterizados como productores de dichas enzimas. En la Tabla I se muestran en forma discriminada los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* productoras de BLEE y el porcentaje correspondiente al total de enterobacterias productoras de BLEE.

Los 90 aislamientos seleccionados para el análisis genotípico de BLEE correspondieron a 57 *Klebsiella pneumoniae*, 19 *Escherichia coli* y 14 *Proteus mirabilis*.

Se analizaron los fragmentos de 860, 900 y 930 pares de bases, correspondientes a los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV} respectivamente. No se obtuvo amplificación del gen *bla*_{PER} en los aislamientos seleccionados en este estudio, en comparación con *Escherichia coli* C600 como control positivo. *Escherichia coli* C600 es una transconjugante que posee el plásmido pMVP-5 portador del gen *bla*_{PER}.¹³ Los patrones de amplificación de estos genes se observan en la Figura 3.

El porcentaje de cepas de las especies de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* analizadas de acuerdo al perfil de genes codificantes de BLEE mencionados, se observa en la Tabla II.

Los resultados obtenidos al aplicar esta metodología demostraron que CTX-M fue la BLEE predominante en 54 (95%) aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, en 10 (52%) de *Escherichia coli* y en 14 (100%) de *Proteus mirabilis*.

La β-lactamasa tipo TEM predominó en 55 (96%) aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, en 12 (63%) de *Escherichia coli* y 10 (71%) de *Proteus mirabilis*, considerándose a esta β-lactamasa como una BLEA presente en la mayoría de los aislamientos clínicos de las especies estudiadas.

En menor número se detectó SHV en los diferentes aislamientos estudiados. Se encontraron 7 (12%) *Klebsiella pneumoniae*, 10 (52%) *Escherichia coli* y 2 (14%) *Proteus mirabilis* productoras de β-lactamasa tipo SHV.

Del total de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* (57), *Escherichia coli* (19) y *Proteus mirabilis* (14) se obtuvieron amplímeros para los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV}. El número de estos 5 para *Klebsiella pneumoniae* y 1 para *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* enviados a secuenciar, se seleccionaron al azar en un número proporcional al número de aislamientos de cada especie estudiada.

Las secuencias de los fragmentos obtenidos para el gen *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} correspondieron a las β-lactamasas tipo TEM o CTX-M con un 98-99% de identidad para ambas proteínas respectivamente.

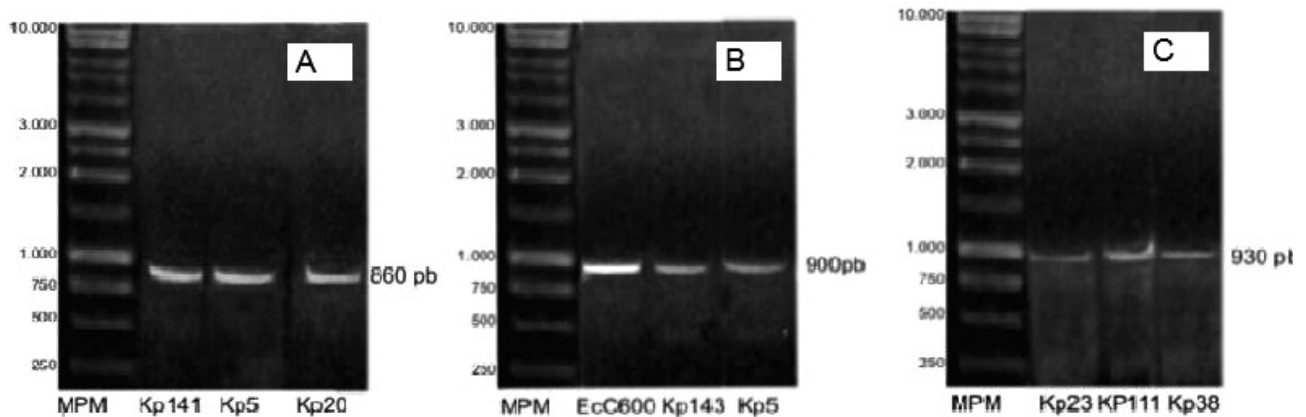


Figura 3. Amplímeros obtenidos por PCR de los genes *bla*_{TEM} (A), *bla*_{CTX-M} (B) y *bla*_{SHV} (C) de los aislamientos Kp141, Kp5 y Kp143 Kp23 y Kp111 obtenidas en este estudio y cepas controles Kp20 y Kp38, (11), Ec C600 transconjugante M 1538 (5).

Tabla I. Número total de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*

Aislamientos totales de enterobacterias		BLEE positivas	
Enterobacterias (2.030)	N° total de BLEE(+)	% en relación al total de enterobacterias	% en relación al total de la especie
<i>K.pneumoniae</i> (362)*	112	5,5	30,9
<i>E.coli</i> (1.250)*	24	1,2	1,9
<i>P.mirabilis</i> (175)*	28	1,4	16

*: Número de especies, +: producción de b-lactamasas de espectro extendido, %: porcentaje

Tabla II. Perfil de β -lactamasas en *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*

Especie (N° total de aislamientos)	N° y % de aislamientos	Perfil de β -lactamasas
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (57)	2 (3,5%)	CTX-M, SHV
	50 (87,7%)	CTX-M, TEM
	3 (5,3%)	TEM, SHV
	2 (3,5%)	CTX-M, TEM, SHV
<i>Escherichia coli</i> (19)	5 (26,3%)	CTX-M
	5 (26,3%)	SHV, TEM
	2 (10,5%)	TEM
	5 (26,3%)	CTX-M, TEM, SHV
	1 (5,2%)	
<i>Proteus mirabilis</i> (14)	3 (21,4%)	CTX-M
	1 (7,1%)	CTX-M, SHV
	9 (64,3%)	CTX-M, TEM
	1 (7,1%)	CTX-M, TEM, SHV

Porcentaje de aislamientos que presentaban los genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M}

Los resultados de la secuenciación mostraron que el amplímero del gen bla_{TEM} de *Escherichia coli* y de *Proteus mirabilis* presentaban alineamientos significativos con la β -lactamasas TEM-1. En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, de los 5 amplímeros estudiados del mismo gen, 3 presentaban secuencias semejantes con la β -lactamasas tipo TEM-1, y 2 de estos amplímeros con la TEM-104. Este resultado llevó a inferir sobre la posibilidad de una gran variación de β -lactamasas tipo TEM asociada a otros tipos de enzimas o viceversa. A diferencia todas las amplificaciones del gen bla_{CTX-M} presentaron alineamiento significativo con β -lactamasas CTX-M-2, enzima prevalente en Argentina.

Discusión y Conclusiones

Los antibióticos β -lactámicos son ampliamente aplicados en la terapia antibacteriana a pacientes internados y de consulta externa en el ámbito hospitalario. La utilización de los mismos para el tratamiento de diferentes procesos infecciosos y durante extensos intervalos de tiempo ha dado lugar a la selección de cepas de enterobacterias resistentes a ellos por expresión de β -lactamasas que son enzimas hidrolizantes de los antibióticos β -lactámicos (13) (14).

Este trabajo analiza la distribución de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* productores de estas enzimas y en especial referencia a β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en diferentes materiales clínicos provenientes de pacientes internados en diferentes unidades clínicas y de consulta externa en un Hospital Universitario de la ciudad de Rosario-Santa Fe.

Durante el período en que se desarrolló este estudio, a partir de 2.030 aislamientos de enterobacterias se identificaron bioquímicamente 112 (30,9%) *Klebsiella pneumoniae*, 24 (1,9%) *Escherichia coli* y 28 (16%) *Proteus mirabilis* productores de BLEE y BLEA que provinieron de diferentes materiales clínicos, de pacientes internados en diversas unidades clínicas y de la comunidad. La distribución observada en la Figura 1 demuestra que *Klebsiella pneumoniae* es una especie productora de BLEE que se encuentra ampliamente distribuida en diversos materiales clínicos obtenidos de diferentes procesos infecciosos. Asimismo, esta especie fue la que demostró el mayor porcentaje de cepas productoras de β -lactamasas.

Para obtener estos datos se utilizó la metodología clásica de los métodos fenotípicos propuestos en la literatura (15) (16), es decir utilizando monodiscos de cefalosporinas de tercera generación (CAZ o CTX) y/o aztreonam y confirmado por el método propuesto por el CLSI de inhibición de BLEE por medio del ácido clavulánico. La utilización de estos métodos permite, desde el punto de vista clínico-epidemiológico, realizar un tamizaje de las cepas productoras de BLEE. En el presente análisis se utilizaron ambos métodos con el fin de discriminar entre las especies en estudio las cepas productoras de BLEE y BLEA (no inhibibles por ácido clavulánico) (5).

Los resultados de este análisis mostraron en relación al total de cepas de cada especie un porcentaje relativamente menor para *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* y mucho menor en *Escherichia coli* a la descrita en la literatura para América Latina.

La importancia clínica de cepas de enterobacterias productoras de BLEE ha sido expuesta en numerosos estudios realizados en hospitales y centros de salud en diferentes partes del mundo y estas cepas son objeto de una constante vigilancia epidemiológica (17) (18).

La importancia de la detección de las BLEE en las unidades nosocomiales se debe a que este factor de resistencia en su origen genómico es plasmídico y por lo tanto de fácil transmisión. Conjuntamente, estas cepas multirresistentes representan un problema importante a resolver en el ámbito hospitalario por los inconvenientes que generan en el tratamiento de los pacientes infectados (18) (19).

La aplicación de métodos de amplificación de los genes específicos bla_{TEM} , bla_{CTX} y bla_{SHV} mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió determinar el tipo de β -lactamasas existente en cada especie bacteriana.

Lo remarcable de estos resultados son las combinaciones de dos o más tipos de β -lactamasas determinadas en las diferentes especies. En 50 cepas (87%) de *Klebsiella pneumoniae* prevalecieron las β -lactamasas tipo TEM y CTX-M, en 5 cepas (26,3%) de *Escherichia coli* se destacó la combinación de los tipos SHV y TEM y en 9 cepas (64,3%) de *Proteus mirabilis* se observó un patrón

semejante al de *Klebsiella pneumoniae*. Resultados similares fueron observados en unidades nosocomiales de Europa y América del Norte (19-21).

El presente trabajo está limitado a la detección y caracterización de β -lactamasas como objetivo primordial debido a la amplia aparición de las mismas tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad, sin llegar a un estudio epidemiológico. Sin embargo, es de interés diferenciar el tipo de β -lactamasas que intervienen en las diferentes asociaciones, lo que permitiría una mejor selección de los antimicrobianos a utilizar en la terapia antibacteriana.

La presencia de dos tipos de β -lactamasas en las cepas mencionadas indica la evolución de las mismas, que les permite adaptarse a tratamientos antibacterianos complejos.

La detección de mecanismos de resistencia a antibióticos debe ser una constante preocupación en el laboratorio de microbiología clínica para conocer el comportamiento de las poblaciones bacterianas intrahospitalarias y en la comunidad que asiste a éste para la consulta externa, facilitando de este modo al Comité de Infecciones tomar medidas de prevención y control en el uso de antibióticos para el tratamiento de procesos infecciosos.

CORRESPONDENCIA

BIOQ. ESP. CECILIA CASABONNE
Suipacha 531- ROSARIO, Santa Fe, Argentina
Tel.: 0341-4804620 interno 206
E-mail: ceciliacasabonne@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Sanders CC, Sanders W E. β -Lactam resistance in gram negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 824-39.
2. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; 2(8554): 302-6.
3. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum β -lactamasas in South America. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 14 (Supl) 1: 154-8.
4. Galas M, Pasterán F, Corso A, Leardini NA. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología. Actualización de la resistencia a antimicrobianos. 2001 A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán. Boletín N° 13.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; eighth edition, M100-S19, Nineteenth Informational Supplement. Wayne, Pa., 2009.
6. Legrand P, Fournier G, Bure A, Jarlier V, Nicolás MH, Decre D, *et al.* Detection of extended broad-spectrum β -lactamasas in *Enterobacteriaceae* in four french hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 527-9.
7. Watt C, Loule M, Simor A. Evaluation of stability of ceftazidime (30 μ g) and cefotaxime (30 μ g) disks impregnated with clavulanic acid (10 μ g) for detection of extended spectrum β -lactamase. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2996-7.
8. Ridley AN. Genomic fingerprinting by application of rep-PCR. En: Woodford N, Johnson AP. Eds. *Methods in Molecular Medicine, Vol 15: Molecular bacteriology: protocols and clinical applications*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1998; 103-15.
9. Saiki RK, Gelfand. DH, Stoffel S, Scharp J, Higuchi RGT, Horn GT, *et al.* Primer-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 1988; 239: 487-91.
10. Rashedd JK, Metchock JC, Berkowitz B, Weigel F, Crellin L, Steward J, *et al.* Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SVH-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 41: 647-53.
11. Bauernfeind A, Stempling I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, *et al.* Characterization of β -lactamase gene *bla*PER-2, which encodes an extended spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 616-20.
12. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, *et al.* Plasmid extended-spectrum β -lactamase in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1462-8.
13. Fankhauser C, Zingg W, Francois P, Dharan S, Schrenzel J, Pittet D, Harbarth S. Surveillance of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Swiss Tertiary Care Hospital. *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 747-51.
14. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, *et al.* Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1205-14.
15. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended spectrum β -lactamasas conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-78.
16. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 602-4.
17. Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassettari VC, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamasas among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009; 51: 203-9.
18. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-

- lactamase producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 2006; 42 : 37-45.
19. Bradford PA, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago Hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 761-6.
 20. Essack SY, Hall LMC, Pillay DG, McFadyen ML, Livermore MD. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 88-95.
 21. Bermudes H, Arpin C, Jude F, El-Harrif Z, Bebear C, Quentin C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in a French hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 523-9.

Aceptado para su publicación el 11 de abril de 2012