
Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre-Venezuela.

Militza Guzmán^{1,2} y Guillermina Alonso².

¹Laboratorio de Bacteriología Molecular, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre y ²Laboratorio de Biología de Plásmidos, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Plásmidos, β -lactamasas de espectro extendido, resistencia.

Resumen: En este estudio, 25 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con infección nosocomial durante el periodo agosto 2002 a diciembre de 2003 fueron examinadas para determinar su susceptibilidad antimicrobiana, perfil plasmídico, transferencia de determinantes de resistencia y los tipos de genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} . Diecinueve cepas presentaron susceptibilidad disminuida a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam y fueron productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Todas las cepas presentaron plásmidos transferibles con una frecuencia de conjugación de 10^{-3} a 10^{-4} transconjugantes/célula donante. El análisis de los patrones de restricción reveló la presencia de tres tipos de plásmidos. Las cepas *E. coli* transconjugantes, además de ser productoras de BLEE, expresaron resistencia a aminoglucósidos y cloranfenicol. Se encontró la presencia del gen bla_{TEM} en todos los plásmidos transferibles y los genes bla_{SHV} y bla_{CTX} en plásmidos transferibles y no transferibles. Las enzimas identificadas fueron TEM-1, SHV-5-2a y CTX-M-2. Los plásmidos presentes en las cepas de *K. pneumoniae*, juegan un papel importante en la diseminación de los genes que codifican resistencia a los β -lactámicos y otros antimicrobianos.

Characterization of extended-spectrum β -lactamases in nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae*.

Invest Clin 2009; 50(4): 419 - 431

Key words: Plasmids, extended-spectrum β -lactamases, antibiotic resistance.

Abstract. In this study, 25 strains of *K. pneumoniae*, isolated from patients with nosocomial infections from August 2002 to December 2003, were examined to determine their antimicrobial susceptibility, plasmid profile, transfer capacity of resistance determinants and bla_{TEM} , bla_{SHV} , and bla_{CTX-M} genes. Nineteen nosocomial strains revealed a weakened susceptibility to third-generation cephalosporins and aztreonam, and were extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producers. All strains presented conjugable plasmids with a conjugation frequency of 10^{-3} to 10^{-4} tranconjugants/donor cell. The analysis of restriction patterns revealed the presence of three different plasmids. The *Escherichia coli* tranconjugants were ESBLs producers and expressed resistance for aminoglycosides and chloramphenicol. The bla_{TEM} gen was found in all transferables plasmids and the bla_{SHV} and bla_{CTX} genes were found in transferables and no transferables plasmids. The enzymes identified in the isolates were TEM-1 SHV-5-2a and CTX-M-2. The plasmids present in the *K. pneumoniae* strains play an important role in the dissemination of the genes encoding resistance to β -lactams and other antimicrobial agents.

Recibido: 04-11-2008. Aceptado: 26-03-2009.

INTRODUCCIÓN

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son consideradas uno de los principales mecanismo de resistencia contra los β -lactámicos, especialmente en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (1, 2). Estas enzimas fenotípicamente se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico u otro inhibidor de β -lactamasas y por conferir resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de tercera, a los monobactámicos y en menor grado a algunas cefalosporinas de cuarta generación (3, 4).

K. pneumoniae posee genes cromosomales que codifican para β -lactamasas de tipo penicilinas (LEN-1) y espectro ampliado (TLE-2 y SHV-1), que la hace naturalmente resistente a las amino y carboxipeni-

cilinas. Para el género *Klebsiella* las enzimas de la clase 2be originadas por mutaciones en la secuencia de los genes codificadores de las β -lactamasas clásicas TEM-1, SHV-1 y TEM-2 juegan un papel importante en la resistencia adquirida a los β -lactámicos (5). Actualmente existen diversos tipos de BLEE tipo TEM y SHV. Otras BLEE (CTX-M, PER, OXA, entre otras) no derivadas de TEM y SHV, se han identificado en aislados clínicos de *K. pneumoniae*, siendo las de la serie CTX-M las más caracterizadas en la resistencia adquirida a las cefalosporinas de tercera generación y cefepima (6).

La resistencia a los antimicrobianos se convierte cada día en una amenaza mayor y grave para la salud pública, que se complica cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la capacidad de transmitirlo a su des-

endencia y a otras bacterias de su misma o diferente especie. La emergencia de bacilos Gram negativos portadores de genes que codifican BLEE, enzimas modificadoras de aminoglucósidos y otros mecanismos de resistencia, han complicado el tratamiento de las infecciones a nivel hospitalario, convirtiéndose en factores que ayudan a elevar las tasas de morbilidad y mortalidad, así como los costos hospitalarios (7). Inicialmente la detección de BLEE estaba limitada a cepas aisladas de pacientes hospitalarios, sin embargo, la situación se ha complicado, debido a que el mecanismo se está detectando en bacterias causantes de infecciones a nivel comunitario, lo que trae como consecuencia una complicación terapéutica desde el punto de vista clínico y agrava el problema desde el punto de vista de salud pública.

El propósito de esta investigación fue determinar la presencia fenotípica y molecular de BLEE en cepas aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales en diferentes áreas del servicio autónomo Antonio Patricio de Alcalá, Cumaná estado Sucre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Durante el período 07/08/2002 al 16/12/2003 se recolectaron 25 cepas de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de infección nosocomial atendidos en las diferentes áreas de hospitalización del Servicio Autónomo Antonio Patricio de Alcalá, en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. En la selección de las cepas se mantuvo el criterio de seleccionar una cepa por paciente y que cumplieran con los criterios para considerarlas como una infección nosocomial (8). El trabajo se realizó respetando las normas de bioética para trabajos de investigación en seres humanos (9). Las muestras tomadas de los diferentes cuadros clínicos fueron procesadas median-

te los protocolos de identificación para bacterias Gram negativas fermentadoras y no fermentadoras de glucosa (10).

Susceptibilidad antimicrobiana. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizaron mediante el método de difusión en disco siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (11). Los antimicrobianos ensayados fueron: piperacilina tazobactam (100/10 μg), cefotaxima (30 μg), ceftazidima (30 μg), ceftriaxona (30 μg), aztreonam (30 μg), imipenem (10 μg), amikacina (30 μg), kanamicina (30 μg), tobramicina (30 μg), ceftoxitin (30 μg), cefepima (30 μg), gentamicina (10 μg), tetraciclina (30 μg), cloranfenicol (30 μg), ciprofloxacina (5 μg) y amoxicilina/ácido clavulánico (2:1) (30 μg). Todos marca Oxoid Ltd, Reino Unido.

La concentración mínima inhibitoria para las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam se determinó por el método de dilución en agar (11). Para considerar una cepa como posible productora de BLEE se tomó como punto de corte una concentración igual o mayor a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La detección fenotípica de las BLEE se realizó mediante la técnica de sinergismo del doble disco (12).

Las cepas *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 fueron usadas como controles en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

Transferencia de la resistencia

Los experimentos de conjugación se realizaron en medio sólido bajo las condiciones establecidas por Narváez *et al.* (13). Como cepa receptora se empleó *E. coli* J62-2 (F-, *his*, *pro*, *trp*, *lac*, *rif*) CVC131 (<http://cvcm.ciens.ucv.ve>). Las transconjugantes fueron seleccionadas en agar MacConkey suplementado con rifampicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) más ceftazidima (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para las cepas resistentes a ceftazidima; y rifampicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) más ampicilina

(120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para las cepas sensibles a cef-tazidima.

Análisis del ADN plasmídico

Para aislar los plásmidos de las cepas donantes y transconjugantes se empleó la técnica modificada de lisis alcalina (14). Los aislamientos plasmídicos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa/TBE, y coloreados con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se empleó 1 kb ADN Ladder (Promega). El patrón de restricción de los plásmidos se realizó con la enzima *EcoRI* (Promega). El producto de restricción se sometió a electroforesis en gel de agarosa-TBE. Los geles se visualizaron en un equipo Gel Doc (Bio-Rad).

Extracción de ADN

La extracción de ADN total se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Levesqué y col. (15). En un tubo Eppendorf se mezclaron 200 μL de un cultivo de la cepa crecido durante 18 horas con 800 μL de agua estéril, la mezcla se hirvió durante 10 minutos y se centrifugó a 12 000 g durante 3 minutos, este procedimiento se realizó para las cepas donantes. El sobrenadante con el contenido de ADN total se guardó a -20°C hasta su uso.

Detección por PCR de los genes *bla*_{SHV}

*bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}

La presencia de los genes *bla* se determinó en las cepas donantes (extracciones plasmídicas y ADN total) y transconjugantes (extracciones plasmídicas) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando juegos de iniciadores específicos para los genes *bla*_{TEM} (16) *bla*_{SHV} (17) y *bla*_{CTX-M} (18). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 μL . En cada reacción se empleó 12,5 μL de polimerasa LPU (2X, Fundaim), 2,5 μL de cada oligonucleótido específico, para una concentración final de 0,4 $\mu\text{mol}/\text{L}$,

2 μL de ADN y 5,5 μL de agua libre de ADNasas. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador marca Techne (TC-312). Los productos fueron corridos en geles de agarosa, coloreados con bromuro de etidio y visualizados en un equipo Gel Doc.

Secuenciación de los genes *bla*

La secuenciación de los genes *bla* se realizó en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN), ubicado en el Centro de Microbiología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), empleando un secuenciador Perkin-Elmer modelo ABI PRISM™ 377, previa purificación de los productos de PCR (Promega, kit de Rapid PCR Purification System). La búsqueda de similitudes en la base de datos GenBank, se hizo vía internet (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov>) empleando los servicios BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (19).

RESULTADOS

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana permitieron determinar que el 76,0% (19/25) de las cepas de *K. pneumoniae* presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al monobactámico aztreonam, las concentraciones mínimas inhibitorias detectadas fueron de 32 a $>256 \mu\text{g}/\text{mL}$ para ceftazidima y aztreonam y de 4 a $>256 \mu\text{g}/\text{mL}$ para cefotaxima y ceftriaxona (Tabla I). Todos los aislados resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam resultaron ser fenotípicamente productores de BLEE. Además de la resistencia presentada a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam, las cepas presentaron resistencia a otros antimicrobianos de interés clínico, no obstante permanecieron sensibles al cefoxitin e imipenem.

TABLA I
PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*

Cepa	Muestra	Servicio	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Otras resistencias			Prueba del doble disco
			CAZ	ATM	CTX	CRO			
Kp1	Secreción *	Cirugía	%5	%5	%5	%5	AMK K TOB GEN Nt TCY	-	
Kp2	Secreción *	Cirugía	%5	%5	%5	%5	AMK K TOB GEN Nt TCY	-	
Kp3	Secreción *	Cirugía	256	256	16	16	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp4	Secreción *	Cirugía	256	256	16	8	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp5	Secreción *	Cirugía	%5	%5	%5	%5	AMK K TOB GEN Nt TCY	-	
Kp6	Secreción *	Cirugía	%5	%5	%5	%5	AMK K TOB GEN Nt TCY	-	
Kp7	Secreción *	Cirugía	64	32	4	4	AMK K TOB GEN Nt CHL CIP	+	
Kp8	Secreción *	Cirugía	128	128	8	8	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp9	Secreción *	Cirugía	128	128	8	8	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp10	Secreción *	Cirugía	256	256	32	32	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp01	Sangre	UCI	128	128	16	8	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp02	Sangre	UCI	256	256	16	16	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp03	Sangre	UCI	128	128	4	4	AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP	+	
Kp04	Secreción *	Cirugía	%5	%5	%5	%5	AMK K TOB GEN Nt TCY	-	
Kp05	Secreción *	UCI	128	128	4	4	AMK K TOB GEN Nt TCY CHL TCY	+	
Kp06	Secreción *	Retén	32	32	1,5	1,5	AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP OFX	+	
Kp07	Orina	UCI	128	128	8	8	AMK K TOB GEN Nt TCY CHL TCY	+	
Kp08	Sangre	UCI	256	256	4	4	AMK K TOB GEN Nt C TCY CIP	+	
Kp09	Sangre	UCI	128	128	128	128	TZP FEP AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp10	Sangre	UCI	256	256	4	4	AMK K TOB GEN Nt CHL TCY CIP OFX	+	
Kp11	Sangre	UCI	256	256	128	128	TZP FEP AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
KP12	Secreción *	Cirugía	%5	%5	%5	%5	AMK K TOB GEN Nt	-	
Kp13	Secreción *	UCI	256	256	256	256	TZP FEP AMK K TOB GEN Nt CHL TCY OFX	+	
Kp14	Secreción *	Cirugía	256	256	4	4	AMK K TOB GEN Nt CHL	+	
Kp15	Sangre		256	256	256	256	TZP FEP AMK K TOB GEN Nt CHL TCY OFX	+	

Kp: *Klebsiella pneumoniae*. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos. *Se refiere a cualquier tipo de secreción. ATM: Aztreonam. CRO: Ceftriaxona. K: Kanamicina. CIP: Ciprofloxacina. TOB: Tobramicina. TCY: Tetraciclina. AK: Amikacina. CTX: Cefotaxima. GEN: Gentamicina. CAZ: Ceftazidima. Nt: Netilmicina. OFX: Ofloxacina. FEP: Cefepima. TZP: piperacilina/tazobactam.

La transferencia de determinantes de resistencia a los β -lactámicos, se produjo con una frecuencia de conjugación de 10^{-3} transconjugantes/célula donante en las cepas resistentes a ceftazidima. Las cepas transconjugantes presentaron un perfil de resistencia compatible con el de la cepa donante e incluso fueron productoras de BLEE (Tabla II). Adicionalmente, en todas las cepas transconjugantes se observó cotransferencia de determinantes de resistencia para otros antimicrobianos como aminoglucósidos y cloranfenicol. En las cepas sensibles a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam, se obtuvieron transconjugantes con una frecuencia de 10^{-3} a 10^{-4} transconjugantes/célula donante. También se observó cotransferencia de determinantes para aminoglucósidos y cloranfenicol.

El análisis plasmídico en las cepas donantes reveló que el 80,0% de las cepas donantes presentan una molécula y que en todos los casos, siempre se transfirió una molécula de elevado peso molecular. La Fig. 1 muestra los patrones de restricción obtenidos con la enzima de restricción *EcoR*I, se detectaron tres tipos de plásmidos de acuerdo a las similitudes de las bandas observadas. Los patrones se denominaron con las letras A, B y C. Seis cepas presentaron el patrón B, 17 el A y 2 el C. Las cepas con el patrón B no mostraron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación ni al aztreonam.

La detección de los genes *bla* se realizó en los aislamientos plasmídicos de las cepas donantes y de las transconjugantes. Los genes *bla*_{SHV} se encontraron en los aislamientos plasmídicos de las cepas transconjugantes que presentaban el patrón de restricción A. Dos casos fueron detectados en plásmidos no transferibles presentes en las cepas Kp13 y Kp15 (Tabla II). El gen *bla*_{TEM} se encontró en todos los plásmidos transferibles. El gen *bla*_{CTX-M} se encontró en dos

plásmidos transferibles y dos plásmidos no transferibles. En dos cepas (Kp13 y Kp15) se encontraron la presencia de los tres genes *bla*. No se encontró la presencia de los genes *bla* en ADN cromosomal, siempre la presencia de los genes estuvo asociada a moléculas plasmídicas, excepto en el caso del gen *bla*_{SHV} que naturalmente está codificado en el cromosoma bacteriano de *K. pneumoniae*.

La secuenciación de los productos de PCR para los genes *bla* reveló la presencia de dos enzimas responsables de conferir resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam. Según la homología con la base de datos del GenBank las enzimas resultaron ser SHV-5-2a y CTX-M-2. Los análisis de la secuencia del gen *bla*_{TEM} confirmó la presencia de la enzima TEM-1, tanto en los aislamientos plasmídicos de las donantes como de las transconjugantes.

DISCUSIÓN

La emergencia de cepas de enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam, se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial (20). En este estudio la búsqueda de BLEE reveló que 76,0% de las cepas de *K. pneumoniae* son productoras de esta enzima. Desde el punto de vista clínico, la detección de una BLEE es importante para el éxito del tratamiento, ya que a los pacientes infectados con cepas productoras de BLEE, no se les debe administrar cefalosporinas de tercera generación ni aztreonam porque conduce a un fracaso terapéutico (21).

En los aislados de *K. pneumoniae* se pudo comprobar que la presencia de determinantes que median la resistencia a β -lactámicos por producción de BLEE y a otros antimicrobianos como aminoglucósidos y cloranfenicol están codificados en plásmidos transferibles, este resultado es de inte-

TABLA II
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS CEPAS TRANSCONJUGANTES CARACTERIZADAS EN EL ESTUDIO

Cepa Donante	Cepa transconjugante	Prueba del doble disco	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				Perfil plasmídico	Marcadores asociados a β -lactámicos	bla_{TEM}	bla_{SHV}	bla_{CTX}	Genes bla identificados en plásmidos transferibles
			CAZ	ATM	CTX	CRO						
Kp1	T1	-	,5	,5	,5	,5	AMK, K, TOB, GEN, Nt	B	+	-	-	TEM-1
Kp2	T2	-	,5	,5	,5	,5	AMK, K, TOB, GEN, Nt	B	+	-	-	
Kp3	T3	+	256	256	8	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp4	T4	+	256	256	8	8	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	TEM-1 SHV-5-2a
Kp5	T5	-	,5	,5	,5	,5	AMK, K, TOB, GEN, Nt	B	+	-	-	
Kp6	T6	-	,5	,5	,5	,5	AMK, K, TOB, GEN, Nt	B	+	-	-	
Kp7	T7	+	64	32	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp8	T8	+	128	128	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp9	T9	+	128	128	8	8	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp10	T10	+	256	256	16	16	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp01	T01	+	128	128	8	8	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp02	T02	+	256	256	8	8	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp03	T03	+	128	128	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	TEM-1 SHV-5-2a
Kp04	T04	-	,5	,5	,5	,5	AMK, K, TOB, GEN, Nt	B	+	-	-	TEM-1
Kp05	T05	+	128	128	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp06	T06	+	32	32	,5	,5	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp07	T07	+	128	128	8	8	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	
Kp08	T08	+	256	256	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	

TABLA II (Continuación)

Cepa Donante	Cepa transconjugante	Prueba del doble disco	CMI ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			CRO	Marcadores transferidos no asociados a β -lactámicos	Perfil plasmídico	bla_{TEM}	bla_{SHV}	bla_{CTX}	Genes bla identificados en plásmidos transferibles
			CAZ	ATM	CTX							
Kp09b	T09	+	128	128	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	+	TEM-1
Kp10	T10	+	256	256	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	TEM-1 SHV-5-2a
Kp11b	T11	+	256	256	8	8	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	+	+
Kp12	T12	-	,5	,5	,5	,5	AMK, K, TOB, GEN, Nt	B	+	-	-	TEM-1
Kp13a	T13	+	256	256	256	256	FEP, AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	C	+	-	+	TEM-1, CTX-M-2
Kp14	T14	+	256	256	4	4	AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	A	+	+	-	-
Kp15a	T15	+	256	256	256	256	FEP, AMK, K, TOB, GEN, Nt, CHL	C	+	-	+	TEM-1, CTX-M-2

^aSe identificaron genes bla_{SHV} en plásmidos no transferibles. ^bSe identificaron $bla_{\text{CTX-M}}$ en plásmidos no transferibles. CAZ: Cefazidima. CRO: Ceftriaxona. FEP: Cefepima. ATM: Aztreonam. CTX: Cefotaxima. AMK: Amikacina, K: Kanamicina. TOB: Tobramicina. GEN: Gentamicina. Nt: Netilmicina. CHL: Cloranfenicol. Kp: *Klebsiella pneumoniae*. T: transconjugante. CMI: Concentración mínima inhibitoria.

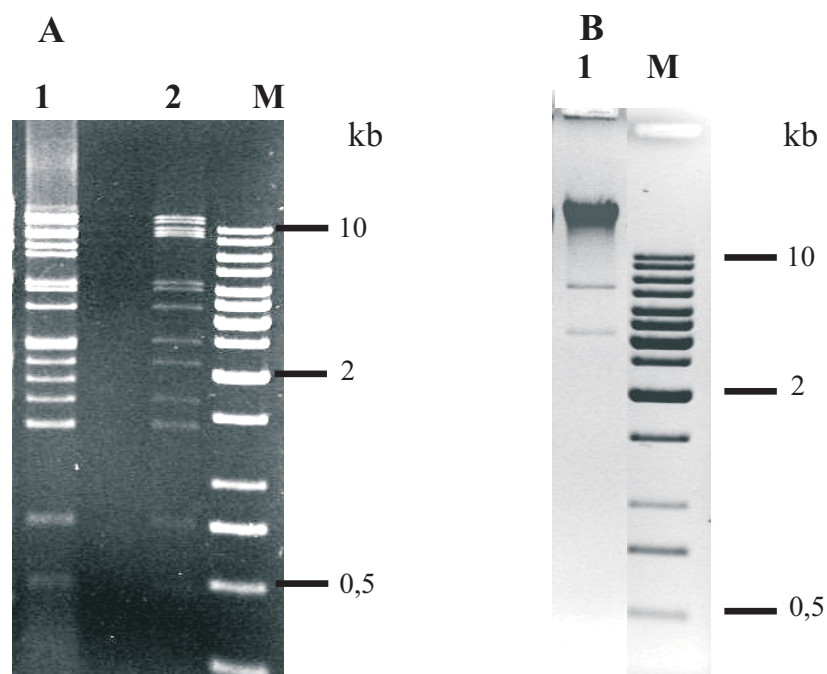


Fig. 1. Patrones de restricción de los plásmidos conjugativos aislados de las cepas transconjugantes. A: Carril 1: T11 (patrón de restricción A); carril 2: T1 (Patrón de restricción B); M: marcador de peso molecular. B: Carril 1: T15, (patrón de restricción C); M: Marcador de peso molecular. Kb: kilobases, T: transconjugante.

rés, ya que los plásmidos son elementos diseminadores de determinantes de resistencia entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (22). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por diversos autores quienes han demostrado que las BLEE están codificadas en plásmidos transferibles, de elevado peso molecular que portan simultáneamente otros determinantes de resistencia (23-27). Este hallazgo debe ser considerado como un factor de riesgo en el centro hospitalario, ya que la alta frecuencia de conjugación y la presión selectiva facilitan la diseminación de determinantes de resistencia, e incluso pueden provocar brotes nosocomiales en otras áreas. La elevada transmisibilidad de plásmidos que portan genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar ciertos antimicrobianos puede permitir la diseminación de la resistencia a otros patógenos, y así se ha demostrado debido a que

se han encontrado enzimas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes*.

El perfil de restricción plasmídico encontrado en el estudio, reveló que en el centro hospitalario existen dos tipos de plásmidos circulantes, los cuales difieren en tres bandas específicamente y que debe el punto de vista fenotípico las cepas que tienen el patrón B no son productoras de BLEE, esto hace suponer que el patrón A se originó a partir del patrón B con la ganancia de algunos genes o elementos genéticos.

Entre las β -lactamasas de localización plasmídicas que se identifican con mayor frecuencia en *K. pneumoniae*, se encuentran las enzimas TEM-1 y SHV-1 (BLEA), así como algunas BLEE, originadas por mutaciones en las BLEA (28). El análisis de la secuencia de los genes *bla*_{SHV} caracterizados en

este trabajo reveló la presencia de la enzima β -lactamasas tipo ceftazidimasa SHV-5-2a, la cual pudiera contribuir junto con otros mecanismos no determinados en este estudio en la resistencia a este grupo de antimicrobianos.

La enzima SHV-5-2a es una enzima que se caracteriza por presentar una mutación en los aminoácidos Gln35, Ser238 y Lys240, siendo necesarias las mutaciones en los aminoácidos 238 y 240 (las cuales permiten la rápida hidrólisis de ceftazidima) para que la enzima sea considerada una BLEE (29). Los resultados de este trabajo coinciden con los estudios realizados en Mérida-Venezuela por Araque y col. (24, 30) y en Caracas por Torres y col. (31) quienes reportan la presencia de la enzima SHV-5 en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*, difiriendo sólo en que en las cepas productoras de BLEE aisladas en el oriente del país se encuentra la mutación L35Q.

El gen bla_{TEM} analizado en este estudio presentó homología con el gen bla_{TEM-1} , el cual se ha caracterizado por conferir resistencia a las aminopenicilinas.

La presencia del gen bla_{CTX} se encontró en cuatro cepas de *K. pneumoniae*, las cuales fenotípicamente presentaron altos niveles de resistencia a cefotaxima. La enzima CTX-M caracterizada fue del tipo CTX-M-2, la cual se encontró en 2 plásmidos transferibles y en 2 plásmidos no transferibles. Nuestros resultados coinciden con los reportados por diversos autores (6, 18, 31).

De acuerdo al perfil de restricción de las transconjugantes y la caracterización molecular de las diferentes BLEE, se pudo observar que los tres tipos de plásmidos presentaban el mismo tipo de enzima, sin embargo, no significa que las cepas con un plásmido específico estén relacionadas clonalmente. La transferencia horizontal de plásmidos que llevan genes codificadores de BLEE ha sido reportada en cepas no relacionadas (32) La presencia del gen bla_{SHV} y

bla_{CTX-M} en plásmidos transferibles y no transferibles en las cepas de *K. pneumoniae*, sugiere fuertemente el papel activo de elementos genéticos móviles como integrones o transposones en la diseminación de genes codificadores de resistencia entre las cepas de *K. pneumoniae*, y probablemente a otras enterobacterias.

Diversos estudios han demostrado que existe una estrecha asociación entre los genes bla_{SHV} y los elementos genéticos móviles, como las secuencias de inserción (IS) específicamente IS26, la cual se encuentra localizada río arriba de los genes bla_{SHV-2a} y bla_{SHV-12} , de igual forma se ha demostrado que este carácter induce a fortalecer la evolución y diseminación de esos genes (33, 34), mientras que el gen bla_{CTX-M} ha sido asociado a integrones (35)

Los resultados de esta investigación señalan que la presencia de plásmidos transferibles, que portan genes de resistencia a los antimicrobianos β -lactámicos, así como a otros agentes terapéuticos en las cepas de *K. pneumoniae*, constituye un factor de riesgo en la diseminación de determinantes de resistencia a otras bacterias en el Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá".

Los resultados revelan la gran necesidad de impedir la diseminación mediante la detección precoz de la resistencia y aislamientos en pacientes infectados o colonizados y lo más importante, la prevención de aparición de resistencia con el uso racional de antimicrobianos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la desinteresada colaboración de los pacientes y del personal que labora en el Laboratorio de Bacteriología del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" y Ambulatorio "Dr. Arquímedes Fuentes Serrano" por apoyarnos en la realización del trabajo. El tra-

bajo fue financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. Núcleo Sucre (PCI: 20401021253105) y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (PI-03.335417 y PG-03335416).

REFERENCIAS

1. **Essack SY, Hall LM, Pillay D, Mefadyen M, Livermore D.** Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum betalactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:88-95.
2. **Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Chistianson S, Simor AE, Paton S and The Canadian Hospital Epidemiology Committee of The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada.** Ambler class A extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* spp. in Canadian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1204-1214.
3. **Sanders CC, Sanders WE.** Beta-lactamase in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15:824-839.
4. **Bradford PA.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-951.
5. **Bush K, Jacoby G, Medeiros A.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-1233.
6. **Aminoacids sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor Resistant β -lactamases.** (<http://www.lahey.org/studies>).
7. **Lartigue M, Poirel L, Nordmann P.** Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234: 201-207.
8. **Gobernado M.** Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev Esp Quimioterap* 2005; 18-115-117.
9. **Horan TC, Andrus M, Dudeck MA.** CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36:309-332.
10. **Rothaman KJ, Michels KB, Baum M.** For and against: Declaración of Helsinki should be strengthened. *BMJ* 2000; 321: 442-445.
11. **Koneman E, Allen S, Dowell V, Jonda W, Sommers H, Winn W.** Diagnóstico microbiológico. 3^{era} Ed. Editorial Médica Panamericana. Mexico. 1999, p 120-257.
12. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, M100-S18. CLSI 2008. Wayne, PA.
13. **Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A.** Extended-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infectol Dis* 1988; 10:867-878.
14. **Narváz P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V.** Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Venez Microbiol* 2005; 25:29-34.
15. **Birboim H, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-1523.
16. **Lesvesque C, Pichel L, Larose C, Roy P.** PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 185-191.
17. **Eckert C, Gautier V, Saladin-Allaard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, Barnaud G, Delisle F, Rossier A, Lambert T, Philippon A, Arlet G.** Dissemination of CTX-M- type β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris,

- France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1249-1255.
18. Haeggman S, Löfdal S, Poauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the Class A chromosomal Beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2400-2408.
 19. Eldestein M, Pimkin M, Palagin I, Eldestein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3724-3732.
 20. Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zheng J, Miller W, Lipman D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402.
 21. Winokur P, Canton R, Casellas M, Legakes N. Variations in the prevalence of strain expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolate from Europe, The Americas, and Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001; 32:94-103.
 22. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky L, Hammer-Munz O, Leavitt A, Gold H, Shwabler M, Carmeli Y. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacter* isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 49: 1150-1156.
 23. Moland E, Black J, Ourada M, Reisbig N, Hanson D, Thomson K. Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3842-3847
 24. Heritage J, Chambers P, Tyndall C, Buescher S. SHV-34: an extended-spectrum β -lactamase encoded by an epidemic plasmid. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:1015-1017.
 25. Araque M, Rivera I. Simultaneous presence of bla_{TEM} and bla_{SHV} genes on a large conjugative plasmid carried by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Med Sci* 2004; 327: 118-122.
 26. Essack S, Hall L, Livermore D. *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple TEM, SHV and AmpC β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23:398-400.
 27. Hernández J, Martínez L, Cantón R, Coque T, Pascual A, and The Spanish Group For Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide Study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2122-2125.
 28. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, Sundsfjord A and the Norwegian ESBL Study Group. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol* 2007; 45:199-205.
 29. Bush K. New Betalactamases in Gram negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1085-1089.
 30. Yuan M, Hall L, Savelkoul P, Vendenbrouke-Grauls C, Livermore D. SHV-13, a novel Extended-Spectrum β -lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Patients in a Intensive Care Unit in Amsterdam. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1081-1084.
 31. Araque M, Nieves B, Lauretti L, Rossolini G. Molecular basis of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 15:37-42.
 32. Torres L, Gagliotta V, Torres O, Benitez M, Domínguez M, Pedroza R. β -lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Rev Soc Venez Microbiol* 2006; 26:80-88.
 33. Garza-Ramos U, Martínez-Romero E, Silva-Sánchez J. SHV-type Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Salud Publica Mex* 2007; 49:415-421.
 34. Jones L, Melder C, Kim M, Rawlinson W, White P. The *aadB* gene cassette is associ-

- ated with *bla*_{SIV} genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:794-77.
35. **Kim Y, Pai H, Lee H, Park S, Choi E, Kim J, Kim J, Kim E.** Bloodstream infections by Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Children: Epidemiology and Clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1481-1491.
36. **Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Shelotto F, Radice M, Ayala J, Power P, Gutkind G.** Entorno Genético de CTX-M2 em aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 84-88.