



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE CTX-M EN CEPAS DE  
ENTEROBACTERIAS  
RECOLECTADAS ENTRE LOS AÑOS  
1995 Y 2007**

*Natalia María Aratti Suárez*

ORIENTADOR: Rafael Vignoli

TRIBUNAL: Eloisa Poey, Gustavo Varela, Rafael Vignoli

*2011*

## RESUMEN

*En las últimas dos décadas se ha suscitado un gran interés a nivel mundial, en el conocimiento de las  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE), debido a que las enzimas confieren resistencia a diferentes antibióticos, generando un problema de salud pública.*

*Las cefotaximasas (CTX-M) son una familia de BLEE que se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel al antibiótico  $\beta$ -lactámico cefotaxima. El objetivo de este trabajo fue comprobar si la diseminación y diferenciación de las cefotaximasas ocurrió recientemente o no. Para ello, se analizaron fenotípica y genotípicamente 50 cepas de Enterobacterias recolectadas entre los años 1995 y 2007. De estas cepas, 34 presentaron algún tipo de BLEE: 27 cepas portaron el gen  $bla_{CTX-M-2}$ ; 2 el gen  $bla_{PER-2}$  y 5 el gen  $bla_{SHV-5}$ . Cabe señalar que estos dos últimos genes codifican para otras familias de BLEE (PER y SHV respectivamente). En su mayoría fueron detectados por amplificación del ADN con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además, se analizó la localización plasmídica o cromosómica del gen  $bla_{SHV-5}$  a través de ensayos de conjugación, determinándose la presencia del gen en sus plásmidos.*

*En conclusión los resultados obtenidos mostraron que las cefotaximasas se diversificaron recientemente.*

**Palabras clave:**  $\beta$ -lactamasas(BLEE), cefotaximasas(CTX-M)

# INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO.....	7
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADO.....	12
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	20
REFERENCIAS.....	21

## INTRODUCCIÓN

La resistencia de las bacterias a los antibióticos se ha convertido en un problema global debido a la amplia diseminación de diversos genes de resistencia entre especies bacterianas causantes de infección. Con el incremento del uso de cefalosporinas de tercera generación surgieron, por selección, cepas bacterianas con capacidad de expresar diferentes clases de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), detectándose las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*<sup>1</sup>.

Las BLEE, son enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida cíclico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, desactivando las propiedades antimicrobianas y confiriéndole a la bacteria que la porta, resistencia a los antibióticos cefalosporinas de tercera generación, penicilinas, y monobactames; y quedando sensible frente a las cefamicinas (Cefoxitin, Cefotetam) y los carbapenémicos (Imipenem, Meropenem, Ertapenem).<sup>2</sup>

La localización periplásmica de estas enzimas en los microorganismos gram negativos resulta ventajosa para éstos debido a que pequeñas cantidades de enzimas producidas pueden ser suficientes para hidrolizar el antibiótico que logra atravesar la membrana externa, confiriéndole a la bacteria resistencia al mismo<sup>2,3</sup>.

Los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Independientemente de la afinidad en particular por los sustratos a hidrolizar o de la clase molecular a la que pertenezcan, la mayoría de las BLEEs de importancia clínica están codificadas en plásmidos; solo unas pocas están localizadas en el cromosoma.<sup>3</sup>

La presencia de genes de resistencia en plásmidos u otros elementos genéticos móviles permite que los mismos sean transferidos a otras bacterias, relacionadas (o no) filogenéticamente, por los mecanismos de transferencia horizontal de genes (i.e. conjugación, transformación o transducción)<sup>3</sup>. Además, las BLEE frecuentemente se incluyen en transposones o integrones, lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que conllevan resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol.<sup>4</sup>

Es frecuente la producción simultánea de múltiples  $\beta$ -lactamasas, ya que si bien muchos géneros o especies de la familia *Enterobacteriaceae* codifican una  $\beta$ -lactamasa cromosómica característica, la adquisición de una BLEE adicional, codificada a nivel plasmídico, es un mecanismo habitual que incrementa los niveles de resistencia y el

espectro de antibióticos sobre los que actúa<sup>3</sup>. Por ejemplo, se pueden aislar microorganismos con BLEE de tipo CTX-M y SHV o BLEE de tipo CTX-M y con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas AmpC, por lo que los fenotipos pueden variar respecto a los esperados.<sup>4</sup>

Es importante notar que diferentes especies bacterianas no solo poseen BLEE sino también otros mecanismos de resistencia como pueden ser la sobreproducción de bombas de efujo, y alteraciones en las porinas (proteínas de membrana externa) que complican aún más el panorama y sobre todo se dificulta la detección a nivel de laboratorio.

Existen diferencias funcionales y genotípicas que han permitido clasificar a las BLEE en distintas clases. Es así que se encuentra la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros y su correlación con la clasificación molecular de Ambler. Las distintas BLEE confieren un grado de resistencia muy variable, que puede variar aún más dependiendo de la cepa en la que se encuentra<sup>4</sup>.

Dentro de los factores predisponentes involucrados en la aparición de éste tipo de cepas productoras de BLEE se encuentra, el uso indiscriminado de las cefalosporinas de tercera generación, seguido de las largas estadías hospitalarias, ventilación mecánica, catéteres endovenosos y urinarios, hemodiálisis y nutrición parenteral<sup>5</sup>.

A continuación se procederá a realizar una breve descripción de las BLEE más importantes que han surgido en los últimos años.

Con respecto al origen de las BLEE, una mutación en las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA)<sup>1</sup> tipo SHV-1 provocó la aparición en 1983 de la SHV-2, primera  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE), esta fue aislada en Alemania, de una cepa de *Klebsiella pneumoniae*<sup>5,6</sup>. Años después, en Francia, fueron aisladas cepas del mismo germen produciendo otra tipo de  $\beta$ -lactamasas, las TEM-3, producto de mutaciones de la TEM-1, también pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush y col. A partir de aquí este fenómeno se fue extendiendo y hoy se han descrito más de 150 BLEE derivadas de la TEM-1 y TEM-2 y otro tanto derivadas de SHV-1, pertenecientes al grupo 2be de Bush y col<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> Son enzimas que hidrolizan hasta cefalosporinas de primera generación

## CEFOTAXIMASAS

Las cefotaximasas (CTX-M) son un tipo de BLEE recientemente encontradas. Este tipo de enzimas, codificadas generalmente en plásmidos, se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel al antibiótico  $\beta$ -lactámico cefotaxima. Las cefotaximasas se han encontrado fundamentalmente en la familia enterobacterias, frecuentemente reportadas en *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, sin embargo se han diseminado a otros géneros, como *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter* etc.<sup>4</sup>

Esta creciente familia de enzimas actualmente comprende más de 110 miembros y todas ellas muestran una identidad entre el 77 al 99% en secuencia de aminoácidos<sup>3,7</sup>. Éstas enzimas además, muestran un 40% o menos de identidad con las familias de  $\beta$ -lactamasas TEM y SHV lo cual sugiere que las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M, no estarían relacionadas con ninguna de estas dos familias. Recientemente se encontró que hay un alto grado de homología entre las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera* con las BLEE tipo CTX-M. Así, la relación entre la  $\beta$ -lactamasa cromosómica KLUA-1 de *Kluyvera ascorbata* y CTX-M-2 es del 99% de identidad en su secuencia de aminoácidos<sup>3</sup>. Por tanto, las CTX-M derivan originalmente de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de distintas especies del género *Kluyvera*, pertenecientes a la clase molecular A<sup>4,9</sup>.

La producción de BLEE del grupo de CTX-M ha sido considerada una pandemia a nivel mundial<sup>10</sup>. Estas enzimas fueron clasificadas en 5 grandes grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 Y CTX-M-25, siendo la CTX-M-2 la más frecuente en nuestro país y Argentina. Cada uno de estos grupos incluye a otras CTX-M, dependiendo de su similitud en su secuencia de aminoácidos. La CTX-M-1 incluye CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23 y -28; CTX-M-2 incluye CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, y Toho-1; CTX-M-8 tiene un solo miembro. El grupo CTX-M-9 contiene CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -24, -27 y Toho-2. El grupo CTX-M-25 incluye CTX-M-25 y CTX-M-26<sup>3,4,11</sup>.

El reservorio principal de los microorganismos portadores de las CTX-M es el tracto digestivo, pudiéndose encontrar también en otras zonas como son la orofaringe y

las heridas quirúrgicas. Su principal vía de transmisión son las manos del personal sanitario y en ocasiones; termómetros, sondas de oxígeno, y gel de ecografía<sup>5</sup>.

En cuanto a sus orígenes, las cefotaximasas fueron descritas por primera vez, casi en forma simultánea, en Alemania y en Argentina en 1989. En La Plata (Argentina) en ese año, se produjo un brote causado por *S. typhimurium* donde murieron 80 niños por infecciones graves como bacteriemias y meningitis. Este microorganismo era productor de una nueva BLEE, la CTX-M-2<sup>12</sup>. En 1992 se determinó la secuencia del gen que codifica la CTX-M-2. En 1993 en Argentina, se reportaron 4 aislamientos de *Vibrio cholerae* resistente a cefalosporinas de tercera generación, las cuales presentaban un patrón de resistencia no reportado previamente en esta especie. La enzima responsable de dicho patrón de resistencia correspondió a CTX-M-2. En 1994 CTX-M-2 fue descrita en *E. coli* y desde entonces su presencia ha sido demostrada en diferentes enterobacterias<sup>3</sup>.

En 1997 fue encontrada una nueva BLEE, CTX-M-8, en Brasil, en cepas de *Enterobacter* sp y *Citrobacter amalonaticus* aisladas de pacientes hospitalizados en cuidados intensivos de Río de Janeiro. En 1998 en Rusia se halló CTX-M-4 en cepas de *S. typhimurium*<sup>12</sup>.

En el lejano oriente, la primera cepa productora de CTX-M fue observada en Japón en 1993 en una cepa de *E. coli*, fue caracterizada como Toho-1. Entre los años 1995 y 2000 se encontraron otras 5 CTX-M en este continente: CTXM-2, CTX-M-3 CTX-M-15 Toho-2 (55), y CTX-M-14<sup>6</sup>.

En el Hospital Ramón y Cajal en Madrid, España, la investigación de las cepas de *Enterobacter* spp. productoras de BLEE entre 1989 y 2000 mostró la persistencia de una variante de CTX-M-3, designada CTX-M-10<sup>6,13</sup>.

En Colombia, en 2003 fue descrita CTX-M-12 producida por cepas de *K. pneumoniae*. Dicha CTX-M-12 fue encontrada en Kenia tres años antes en cepas de *K. pneumoniae*.<sup>12,14</sup> En julio del 2003 se reportó una CTX-M-14 en Portugal, en una cepa de *E. coli*.<sup>15</sup>

En el 2005 en Venezuela, se detectó una CTX-M-1 en una cepa de *Shigella sonnei* aislada de un coprocultivo de un niño de 18 meses de edad, proveniente del Zulia, en el laboratorio de Microbiología de la Policlínica Santiago León.<sup>16</sup>

Entre los años 2002 y 2004 se reportó la aparición de CTX-M en toda América del Sur, Lejano Oriente, Gran Bretaña, Turquía, Bulgaria y Rumania.<sup>17</sup>

En el año 2002 existía algunos países donde la CTX-M era endémicas y determinados territorios donde los reportes de cefotaximasas eran ocasionales (Fig 1). En el año 2007 Asia, parte de África y la mayoría de Europa pasaron a ser endémicas y los reportes esporádicos en todas partes del mundo se incrementaron ampliamente (Fig 1). En América del Norte en el 2002 no existían cepas con CTX-M, cinco años más tarde el 80% del continente poseía cepas con esta enzima.<sup>18</sup>

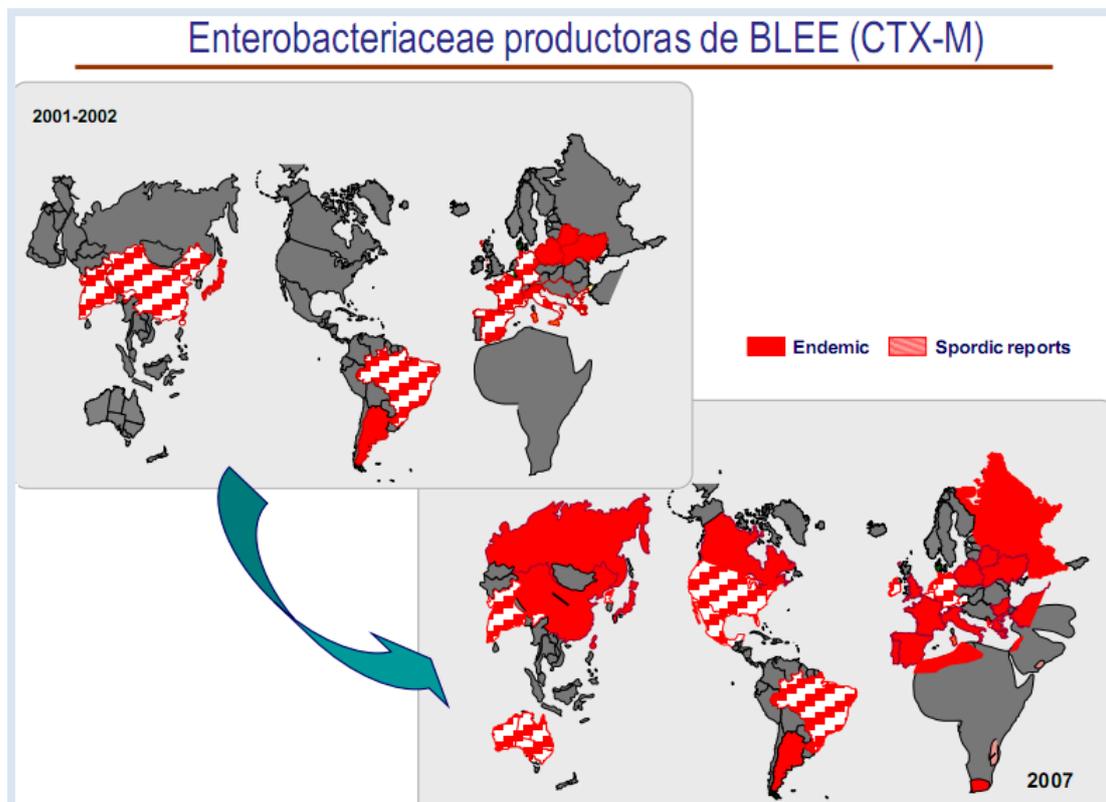


Figura 1. Diseminación de CTX-M en el mundo entre los años 2001-2002 al 2007. Extraído de: Morenos Congreso Chileno de Infectología. 5 de noviembre de 2008 según Rafael Cantón

En Uruguay, en el año 2006, se reportó por primera vez la presencia de CTX-M-2 en 2 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, aislados en el año 1996 y 2003.<sup>19</sup> Sin embargo a partir del 2006 se reportó la presencia de cepas con CTX-M-1 y CTX-M-9.<sup>20,21</sup> En el 2011 se reportó la presencia de CTX-M-8 asociada a otro gen de resistencia.<sup>27</sup> Esto parece ser diferente a lo que sucede en Argentina, donde CTX-M-2 es prácticamente la única enzima de la familia de las CTX-M detectada.<sup>22,23</sup> El surgimiento de nuevas CTX-M es un hecho reciente en América del Sur.<sup>16,18</sup>

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE. Mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M.<sup>24, 25</sup>

La propagación de las cefotaximasas es un hecho preocupante, se ha producido tanto en los hospitales como en la comunidad. Hoy en día encontramos cefotaximasas, pertenecientes a diferentes grupos, en todo el mundo, lo que muestra la alta velocidad con que se ha diseminado desde su aparición. En pocos años han aumentado en forma significativa y se han diferenciado en distintos grupos. El número de variantes descritas de CTX-M, se ha incrementado rápidamente desde el año 1995.<sup>25</sup> Las cepas que tienen CTX-M son responsables de epidemias nosocomiales y comunitarias. Su rápida aparición y diseminación en el mundo entero, constituye un grave problema de salud pública lo que ha llevado a una serie de expertos a dar la voz de alarma.<sup>5,12, 23</sup>

## **HIPÓTESIS**

La hipótesis de este trabajo fue que las cefotaximasas se extendieron y diferenciaron en nuestro país recientemente.

## **OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo es determinar si las cefotaximasas pertenecientes a los grupos 1 (CTX-M-1), grupo 8 (CTX-M-8) y grupo 9 (CTX-M-9), se han diferenciado recientemente en nuestro país o si la diferenciación en los distintos grupos fue en paralelo al surgimiento de CTX-M-2.

## **ESTRATEGIA DE INVESTIGACION**

Para cumplir con el objetivo se estudiaron 50 cepas de Enterobacterias de una colección del laboratorio, procedentes de pacientes atendidos en dos centros hospitalarios uno en Montevideo y otro en Canelones entre los años 1995 y 2007. A las muestras se les realizó la detección fenotípica y genotípica de cefotaximasas, caracterizando las CTX-M encontradas según los diferentes grupos. Complementariamente, se efectuó la transferencia de plásmidos, mediante conjugación, en 4 cepas donde se conoce la presencia de genes *bla<sub>SHV</sub>*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Aislamiento de cepas**

Se realizaron 50 aislamientos de cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriae*, recolectadas entre los años 1995 al 2007 en hospitales de Canelones y Montevideo. Para esto se sembraron en un medio selectivo y diferencial con el fin de obtener el crecimiento de bacterias gram negativas pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae*. Al medio se le adicionó 2 µg/ml de ceftriaxona(CRO), una cefalosporina de tercera generación.

### **Detección fenotípica de cepas productoras de cefotaximasas**

#### ***Estudio de la susceptibilidad a antibióticos***

Se evaluó la susceptibilidad a antibióticos mediante la técnica de difusión en agar, de acuerdo con los parámetros establecidos por el “Clinical Laboratory Standard Institute “(CLSI).<sup>25</sup>

#### **Técnica de difusión en agar**

Se realizaron antibiogramas en placas de petri con Agar Mueller Hinton (4 mm de espesor). Éste se sembró en forma convergente y posteriormente se agregaron los discos de antibióticos.

En los antibiogramas se incluyeron los siguientes antibióticos: cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona o cefotaxime y ceftazidime), mezcla de amoxicilina con inhibidor (ácido clavulánico) y carbapenémicos (imipenem). Experimentalmente se colocaron los antibióticos de la siguiente manera: ceftazidime (CAZ) y cefotaxime (CTX) a cada lado de amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) y a 1.5 cm de éste y de la periferia. El imipenem (IMP) se colocó en otra zona del antibiograma, alejado de éstos. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 24 horas.

El ácido clavulánico inhibe la acción de las β-lactamasa de espectro extendido, permitiendo que actúen las cefalosporinas de tercera generación. Empíricamente esto se observa como una alteración en los halos de inhibición, una cola de pez o “efecto

huevo". Este fenómeno es conocido como sinergia positiva y evidencia la presencia de BLEE (Fig 2).

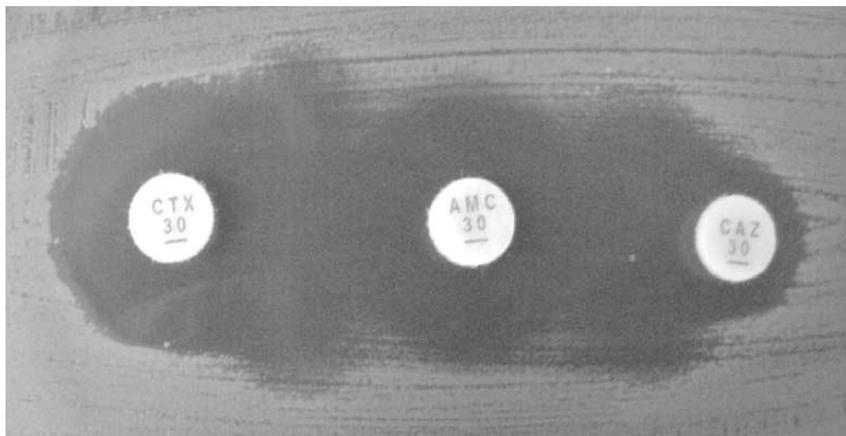


Figura 2. Técnica de difusión en agar con los antibióticos cefotaxime(CTX), amoxicilin con ácido clavulánico (AMC) y ceftazidime (CAZ) <sup>12</sup>

A aquellos antibiogramas que no presentaron sinergia positiva se les realizó la técnica de reemplazo de disco. Esta técnica consiste en colocar un disco de AMC en una placa de Muller Hinton sembrada en forma convergente. A los 45 minutos se reemplaza el AMC con un disco de CTX y además se coloca otro disco de CTX en una zona alejada de la placa. Una vez realizado el reemplazo es colocada en la estufa. Si el halo de inhibición del disco reemplazado es igual o mayor a 5 milímetros que el halo de CTX colocado en otra zona de la placa, es probable que contenga una beta-lactamasa de espectro extendido.

Se analizó, mediante PCR, la presencia de genes  $bla_{CTX-M}$  en las cepas que presentaron sinergia positiva y son sensible a imipenem (IMP), así como en aquellas cepas en el que el reemplazo de disco fue mayor o igual a 5 mm, es decir, aquellas que muestran fenotípicamente la presencia de cefotaximasas.

### **Detección de genes codificantes de cefotaximasas**

En aquellas cepas que muestran perfil de cefotaximasa, se realizó la detección de genes  $bla_{CTX-M}$  mediante amplificación por PCR. Previamente se realizó la extracción del ADN de las cepas en estudio. Primero se le realizó PCR a todas las muestras utilizando el par oligonucleótido genérico (Tabla 1) para cefotaximasas (PAN CTX-M-F y PAN CTX-M-R). A aquellas muestras que resultaron positivas se les realizó nuevamente

PCR utilizando los oligonucleótidos para los diferentes grupos conocidos de CTX-M, permitiendo así detectar a qué grupo de CTX-M correspondía. El amplicon para CTX-M genérico presenta un tamaño de aproximadamente 500pb mientras que el fragmento para CTX-M-2 es de 650pb.

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en los estudios de PCR**

<b>OLIGONUCLEÓTIDOS</b>	<b>SECUENCIA 5' - 3'</b>
PAN-CTX-M-F	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA
PAN-CTX-M-R	CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A
CTX-M-2-F	TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT
CTX-M-2-R	GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG
PER-2-F	TGT GTT TTC ACC GCT TCT GCT CTG
PER-2-R	CAG CTC AAA CTG ATA AGC CGC TTG
SHV Tot-F	GGGTTATTCTTATTTGTCGC
SHVTot-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC

A aquellas muestras que no se les detectó la presencia de genes que codifican para alguna cefotaximasa, se le realizó estudios de PCR utilizando oligonucleótidos para detectar BLEE pertenecientes a otra familias como ser PER y SHV. Cabe destacar que los ensayos para detectar SHV fueron realizados en aquellas muestras cuyo PCR fueron negativas para CTX-M y PER ( Tabla 1).

### **Lisado celular**

1) Se colocó en un tubo 150  $\mu$ L de TE-tritón y un inóculo de la cepa. 2) El preparado se homogenizado en “vortex”. 3) Se introdujo 10min en agua en ebullición. Previamente se debió realizar un orificio en el tubo para evitar que se destape. 4) Se llevó 5 min al congelador. 6) Se centrifugó 10 min a 13000rpm. 7) Se descartó el pelet y el sobrenadante se guardó en el freezer.

### **PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**

Para cada muestra se realizó la siguiente mezcla en un tubo de 200  $\mu$ L: 2,5  $\mu$ L de Buffer, 2  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 0,5  $\mu$ L de dNTP, 0,125  $\mu$ L de *Taq*-ADN polimerasa, 14,9  $\mu$ L de

agua miliQ, 1,25 µL de cebador F y R. Luego de realizada la mezcla, se agregó en la cámara de flujo laminar, 2,5 µL de ADN en estudio. Se realizó también un control positivo y un control negativo. Como control de mezcla se utilizó la mezcla realizada para todas las muestras y en lugar de agregarle ADN se le añadió 2,5 µL agua miliQ.

La reacción se realizó en un termociclador, mediante desnaturalización inicial, a 94 °C durante 5 min, seguido de 32 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a la temperatura a la cual se unen los cebadores al ADN molde (61,7 °C para PAN CTX-M, 60°C para PER-2, 52° para CTX-M-2 y 56°C para SHVtot) y 1 min a 72 °C, seguidos de 10 min de extensión final a 72 °C. La temperatura Se evaluó los resultados mediante una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%. Se observó con luz UV.

### **Conjugación de cepas portadoras del gen SHV**

Con el objetivo de determinar la localización plasmídica o cromosómica del gen SHV, se realizaron experimentos de conjugación utilizando como cepas donantes cuatro cepas de *Klebsiella pneumoniae* (HM-3, HC-1, 7035 y 41030) que fueron positivos para dicho gen. Se utilizó como cepa receptora una *Escherichia coli* resistente a rifampicina y sensible a ceftriaxona. Las cuatro cepas donantes fueron resistente a ceftriaxona y sensible a rifampicina.

Vale aclarar que las conjugaciones fueron realizadas solo en las cuatro cepas pertenecientes a la especie *Klebsiella pneumoniae* y que no contiene CTX-M. Esta especie se caracteriza por presentar el gen SHV en su cromosoma, por tanto nuestro objetivo con esta técnica fue detectar si el gen también se encontraba en plásmido.

#### **Conjugación**

1) Se prepararon dos tubos con 2,2 ml de caldo LB y se sembró cada uno con la cepa receptora. 2) En otro tubo con 2 ml de caldo LB se sembró la cepa donante. 3) Se llevaron tres horas a agitación. 4) Después se mezclaron 200 µL de la cepa donante en uno de los tubos que contenía la cepa receptora. 5) Se llevó a la estufa a 35° donde se incubaron durante toda la noche. 6) Se plaqueó con un rastrillo, de la siguiente manera: se sembraron 100 µL del tubo que contenía caldo LB con la cepa receptora y 100 µL del tubo que contenía caldo LB con la cepa donante en: a) una placa de Mc Conkey, b) una placa de Mc Conkey con ceftriaxona, c) una placa de Mc Conkey con rifampicina d) y

en una placa de Mc Conkey que tenía ambos antibióticos. Estas siembras fueron los controles de mi ensayo. La mezcla en caldo LB de la cepa receptora con la cepa donante se sembró (10 µL, 100 µL y resultado de centrifugado) con rastrillo en tres placas que contenían los antibióticos rifampicina y ceftriaxona.

Se evaluó la transferencia de plásmidos mediante antibiogramas, utilizando los siguientes antibióticos: cefalosporinas de tercera generación (ceftazidime y cefotaxime), mezcla de amoxicilina con inhibidor (ácido clavulánico) y carbapenémicos (imipenem). Se comparó estos resultados con los antibiogramas realizados anteriormente para la cepa donante y para la cepa receptora, sugiriendo de esta manera, la presencia o ausencia del plásmido a transferir, en la cepa receptora. Posteriormente se realizó ensayos de PCR para confirmar la presencia del gen SHV. En los casos que se confirmó la presencia de dicho gen el mismo fue secuenciado para determinar el grupo de SHV al que pertenece.

## **RESULTADOS**

### ***Estudio de la susceptibilidad a antibióticos***

El perfil de susceptibilidad de los 50 aislamientos de enterobacterias, mostró que 34 de éstos presentaban sinergia positiva, lo cual evidencia la presunta presencia de una BLEE. En la Tabla 2 se muestran los datos aportados por los antibiogramas para cada muestra. Las 16 muestras que presentaron sinergia negativa, se les realizó el estudio de reemplazo de disco. La muestra 2031 perteneciente a una *Klebsiella sp* generó, un halo de inhibición del disco reemplazado, mayor a 5 milímetros que el halo de CTX colocado en otra zona de la placa (Tabla 2). Estos resultados inducen que es probable que contenga una β-lactamasa de espectro extendido (BLEE).

**Tabla 2. Antibiogramas utilizando la técnica de difusión en agar de los 50 aislamientos**

	ESPECIE	CEPA	IMP.	I	CAZ	I	AMC	I	CTX	I	SINERGIA	REEMPLAZO DE DISCO		FOX	I	FEP	I	
												CTX	AMC/CTX					
1	<i>Citrobacter freundii</i>	41020	27	S	9	R	15	I	14	R	+							
2	<i>Citrobacter freundii</i>	97009	26	S	15	I	12	R	16	I	-	18	18					
3	<i>Citrobacter freundii</i>	97014	21	S	13.5	R	0	R	17	I	-	15	10					
4	<i>E.coli</i>	2003	24	S	23.5	S	14	I	0	R	+							
5	<i>E.coli</i>	2004	22	S	22	S	19	S	0	R	+							
6	<i>E.coli</i>	HM13	25	S	21	S	17	I	12	R	+							
7	<i>E. Coli</i>	97027	24	S	15	I	9	R	19	S	-	17.5	17					
8	<i>E. coli</i>	C5	24	S	16	I	8	R	18	S	-	6	9					
9	<i>Enterobacter sp</i>	2014	24	S	9	R	0	R	0	R	-							
10	<i>Enterobacter sp</i>	2008	23	S	6	R	8	R	6	R	-	6	8					
11	<i>Enterobacter sp</i>	41024	21	S	12	R	0	R	0	R	-	8	9					
12	<i>Enterobacter sp</i>	97016	26	S	17	I	9	R	13	R	-	0	0					
13	<i>Enterobacter sp</i>	97019	26	S	9	R	9	R	0	R	-	7	9					
14	<i>Enterobacter sp</i>	97020	21	S	0	R	0	R	0	R	-	6	6					
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2013	26	S	17	I	14	I	0	R	+							
16	<i>Klebsiella sp</i>	41015	24	S	20	S	14	I	0	R	+							
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2016	24	S	20	S	13	R	0	R	+							
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2018	22	S	18	S	9	R	0	R	+							
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2019	21	S	16	I	11	R	0	R	+							
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2022	27	S	20	S	15	I	0	R	+							
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2023	28	S	14	R	9	R	0	R	+							
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2026	24	S	18	S	13	R	0	R	+							
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2027	24	S	16	I	15	I	0	R	+							
24	<i>Klebsiella sp</i>	2030	21	S	16	I	10	R	0	R	+							
25	<i>Klebsiella sp</i>	2031	29	S	17	I	12	R	0	R	+	6	19					
26	<i>Klebsiella sp</i>	2042	24	S	12	R	0	R	8	R	+							
27	<i>Klebsiella sp</i>	41002	24	S	12	R	0	R	0	R	-	8	8					
28	<i>Klebsiella sp</i>	2005	25	S	0	R	0	R	0	R	-	6	6					
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	41019	24	S	8	R	0	R	0	R	-	0	0					
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C6	24	S	16	I	14	I	0	R	+							
31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HC1	27	S	25	S	16	I	12	R	+							
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HM2	28	S	19	S	13	R	0	R	+							
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HM2372	27	S	24	S	15	I	13	R	+							
34	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HM3	28	S	8	R	19	S	14	R	+							
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HM4047	24	S	17	I	12	R	8	R	+							
36	<i>Klebsiella sp</i>	HM6101	26	S	20	R	16	I	0	R	+							
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96006	21	S	8	R	10	R	0	R	+							
38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	41030	29	S	21	S	16	I	18	I	+							
39	<i>Klebsiella sp</i>	96003	28	S	9	R	14	I	20	S	+							
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7035	27	S	8	R	18	S	10	R	+							
41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34817	21	S	0	R	0	R	0	R	+							
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2020	23	S	16	I	12	R	0	R	+							
43	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	283	24	S	0	R	10	R	14	R	+							
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2012	22	S	16	I	11	R	0	R	+							
45	<i>Klebsiella sp</i>	2040					15	I	9	R	+				17	S	14	S
46	<i>Klebsiella sp</i>	2021					11	R	0	R	+				15	S	10	S
47	*	.15/9/05	22	S	12	R	0	R	15	R	-							
48	*	95006	21	S	8	R	0	R	0	R	-							
49	*	14552	27	S	0	R	0	R	0	R	-							
50	*	96004	25	S	19	S	12	R	9	R	+							

\*género no identificado

### *Detección de genes para BLEE*

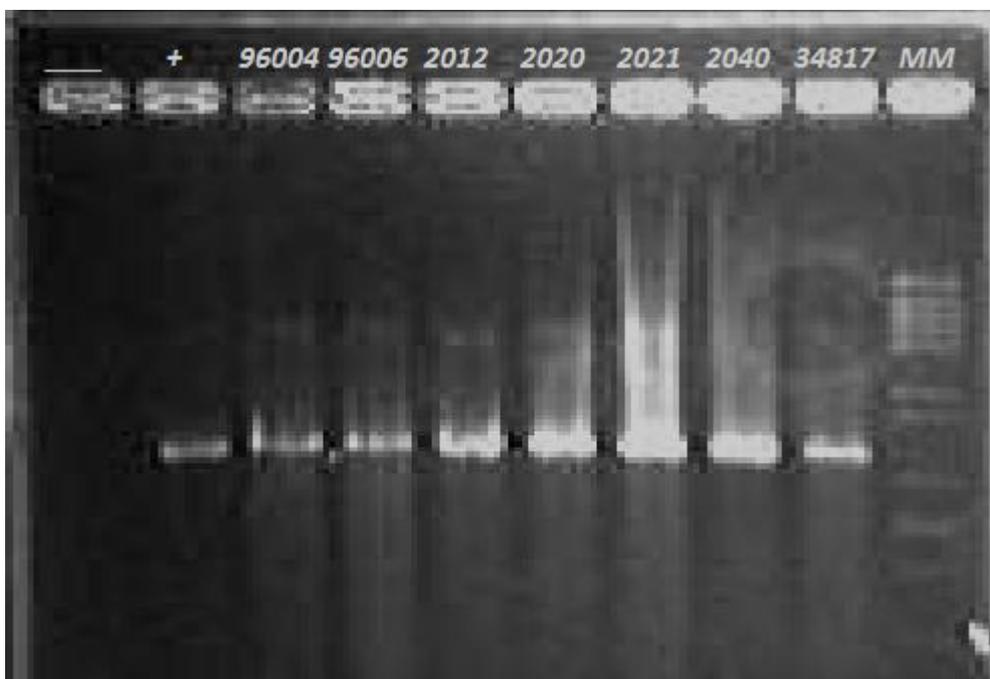
Se analizó la presencia de genes para BLEE (CTX-M, PER y SHV) en las 34 cepas que presentaron sinergia positiva. De éstas, 27 cepas presentaron genes que codifican para cefotaximasas del grupo 2, 2 cepas presentaron genes del grupo bla<sub>PER</sub> y 5 cepas con bla<sub>SHV</sub> (Tabla 3) La muestra 41020, positiva para SHV fue secuenciada, siendo una SHV-5 (Fig.7). En las Figura 3 y 4 se muestra la electroforesis de la PCR para algunas muestras.

**Tabla 3. Presencia de genes para la familia BLEE (PER-2, SHV,CTX-M) en los 34 aislamientos con sinergia positiva**

	<b>ESPECIE</b>	<b>CEPA</b>	<b>PCR-CTX-M-2</b>	<b>PCR-PER-2</b>	<b>PCR-SHV-tot</b>
1	<i>Citrobacter freundii</i>	41020	-	-	+
2	<i>E.coli</i>	283	-	+	
3	<i>E.coli</i>	2003	+		
4	<i>E.coli</i>	2004	+		
5	<i>E.coli</i>	HM13	+		
6	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2012	+		
7	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2013	+		
8	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2016	+		
9	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2018	+		
10	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2019	+		
11	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2020	+		
12	<i>Klebsiella sp</i>	2021	+		
13	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2022	+		
14	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2023	+		
15	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2026	+		
16	<i>Klebsiella pneumonia</i>	2027	+		
17	<i>Klebsiella sp</i>	2030	+		
18	<i>Klebsiella sp</i>	2031	+		
19	<i>Klebsiella sp</i>	2040	+		
20	<i>Klebsiella sp</i>	2042	+		
21	<i>Klebsiella pneumonia</i>	7035	-	-	+
22	<i>Klebsiella pneumonia</i>	34817	+		
23	<i>Klebsiella sp</i>	41015	+		
24	<i>Klebsiella pneumonia</i>	41030	-	-	+
25	<i>Klebsiella sp</i>	96003	-	+	
26	<i>Klebsiella pneumonia</i>	96004	+		
27	<i>Klebsiella pneumonia</i>	96006	+		
28	<i>Klebsiella pneumonia</i>	C6	+		
29	<i>Klebsiella pneumonia</i>	HC1	-	-	+
30	<i>Klebsiella pneumonia</i>	HM2	+		
31	<i>Klebsiella pneumonia</i>	HM3	-	-	+
32	<i>Klebsiella pneumonia</i>	HM2372	+		
33	<i>Klebsiella pneumonia</i>	HM4047	+		
34	<i>Klebsiella sp</i>	HM6101	+		
			<b>27</b>	<b>2</b>	<b>5</b>



**Figura 3** Electroforesis de muestras estudiadas mediante PCR utilizando como oligonucleótidos CTX-M genérico. De izquierda a derecha: carriles 1) mezcla control 2) control positivo 3) control positivo 4) 41020 5) 41030 6) 96003 7) 2042 8) C6 9) HC1 10) HM2 11) HM2372 12) HM3 13) HM13 14) HM4047 15) HM6101 16) Marcador molecular



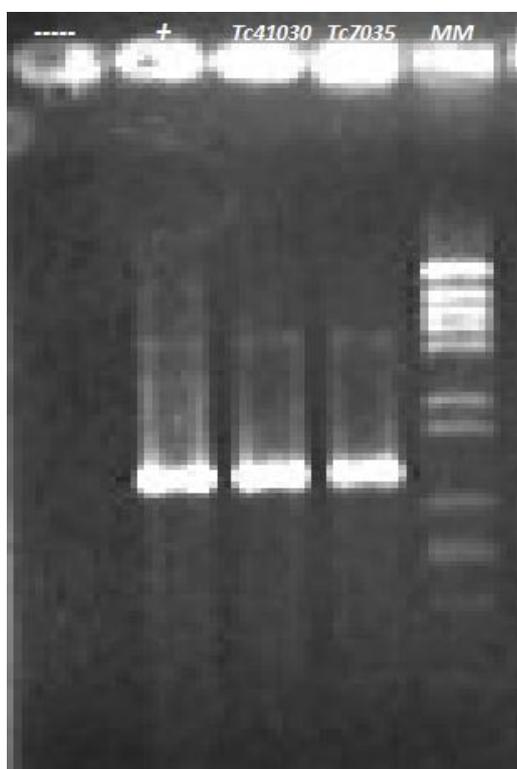
**Figura 4** Electroforesis de muestras estudiadas mediante PCR utilizando como oligonucleótidos CTX-M-2. De izquierda a derecha: carriles 1) mezcla control 2) control positivo 3) 96004 4) 96006 5) 2012 6) 2020 7) 2021 8) 2040 9) 34817 10) marcador molecular

### *Estudio de la localización del gen SHV*

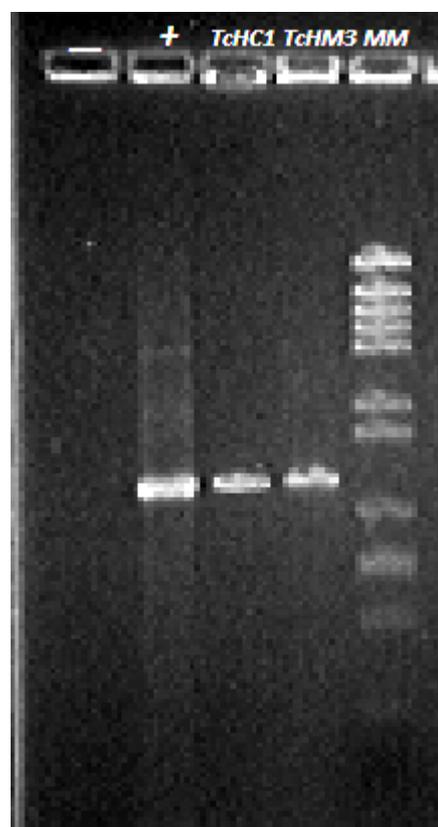
La localización del gen SHV fue estudiada mediante experimentos de conjugación. Según los resultados empíricos obtenidos en la conjugación, la transferencia de plásmidos se realizó eficientemente en los 4 casos.

Luego de confirmar la presencia de genes  $bla_{SHV}$  mediante PCR en los 4 transconjugantes (Fig 5 y 6), las muestras fueron secuenciadas y como resultaron se obtuvo para las 4 ejemplares, genes que codifican para la BLEE SHV-5 (Fig. 7).

### RESULTADOS DE LAS CONJUGACIONES



**Figura 5:** Electroforesis de transconjugantes estudiadas mediante PCR utilizando como oligonucleótidos SHVtot. De izquierda a derecha: carril 1) mezcla control 2) control positivo 3) Tc41030 4) Tc7035 5) Marcador molecular



**Figura 6:** Electroforesis de transconjugantes estudiadas mediante PCR utilizando como oligonucleótidos SHVtot. De izquierda a derecha: carril 1) mezcla control 2) control positivo 3) TcHC1 4) TcHM3 5) Marcador molecular

**A) Aislamiento 41020**

aaacccaactcaaggagtattgtggttatgcgttatattcgcctgtgtattatctccctgttagccaccctgccgctggcgatacacgccagccngcagcc  
gcttgagcaaatfaaactaagcgaangccagctgtcgggccgcgnaggctgatagaaatggatctggccagcncgcncgctgaccngngngcg  
cgatnaacgttttccatgatagcactttaaagaagtcctgcggcgnaatnntngcgcgggggttgcngntnccaacngtfgaggaaagaacccc  
tatccnccggngnccgggggactaccccgccggncagncaaaaaaaccttggcggangggntggngggggggnaaattctgncccc  
cccccttttccctgngncaaaannngccccnccaatnttgnnnngggccccngtngggggggccccngnaggattgactngcnttttttggc  
caaaaacgggnaaaaaacnccccccngcctnccccnggaaaaanggaaantaangagggnnttccgggngaaacccccggnaann  
nccenttccccgggncnngnangggggccggnccccnttccaaannntnntnaccngcccggntnnntaaccccccnnttcnnaaann  
cnnnnnnnntnnnnnnnnnnnggggggnanaaangngnccccggaccntnnccccgcctccngngttnnnnggggggngn  
ggn  
aaaaaaaaaaaaaaaaaacagaaatgtaacgggggtcccgcagataaacaccacatgcgctctgttnttggcccagcnggggggcn  
atccccgcgncaccgctgttagctccggcttatcggcgataaacagcccggcgccgacgagcgatcaacggctccggcgaccgatcgc  
cacntccatcagcagctgctgnaaggcgctcanagctgctgctcagcagctgcgnaaggcnnngccatgctggcnggannngng  
nnngnncnccggagncncanttagtctngtncacggnnaagnggggaaanngtcncnactgggncnaaagngcncatcctgc  
nggggcnccnacnggggncgnaaaatggcgngctgttatcnncnnggtaatgngngggcccnaggtggacacctatnccgcc  
ncaagntttttttgacnggggagagncnccanaccctgncngnnnnaagaggaaannttccccnngcncntntntcancngnnna  
ccacccccggccncngcgccgnagnnnnnntaacttttaaaannngcctntnangnaaancggtttatngtagcncnaggcgg  
ggcnnngagnggggnggctgggncnaaancnaatnttntttattgncntattccn

**B) Aislamiento TcHC1**

gccctcctcaggagtattgtggttatgcgttatattcgcctgtgtattatctccctgttagccaccctgccgctggcggtacacgccagcccgcagccgcttg  
agcaaatfaaactaagcgaagccagctgtcgggccgcgtaggcatgatagaaatggatctggccagcggccgacgctgaccgctggcgccg  
atgaacgctttccatgatgacacctttaaagtagtctctcggcgacgtgctggcgccgggtgatgccggtgacgaacagctggagcgaagatcc  
actatcgccagcagctgctgactactgcccgtcagcgaaaaacaccttggcgacggcatgacggctggcgaacttgcgccgcccaftacca  
tgagcgataacagcggccaatctgactgcccaccgtcggcgccccgcaggattgactgccttttgcgccagatggcgacaacgtcaccgc  
ctgaccgctgggaaacggaactgaatgancgcttcccggcgaccccgcacaccactacccggccagatggccgcgaccctgcgcaagctg  
ctgaccagccagcgtctgagcggcgttcgcaacggcagctgctgcatggtgatggangatcgggctcgggaccgttancgctctgctgagg  
cggtggttatcnaaaaacganctancagcggggggccccggaatgctccngctggcccaaaaaaaaaaacaanaagccatttggggggg  
gn  
gccctcctcaggagtattgtggttatgcgttatattcgcctgtgtattatctccctgttagccaccctgccgctggcggtacacgccagcccgcagccgcttg  
agcaaatfaaactaagcgaagccagctgtcgggccgcgtaggcatgatagaaatggatctggccagcggccgacgctgaccgctggcgccg  
atgaacgctttccatgatgacacctttaaagtagtctctcggcgacgtgctggcgccgggtgatgccggtgacgaacagctggagcgaagatcc  
actatcgccagcagctgctgactactgcccgtcagcgaaaaacaccttggcgacggcatgacggctggcgaacttgcgccgcccaftacca  
atgagcgataacagcggccaatctgactgcccaccgtcggcgccccgcaggattgactgccttttgcgccagatggcgacaacgtcaccgc  
ccttgaccgtgggaaacggaactgaatgagcgttcccggcgacggccgacaccactacccggccagatggccgacccctgcgcaagct  
gctgaccagccagctctgagcggcgttcgcaacggcagctgctgcatggtgatgggacgatcgggctcgggaccgttgcctgctgctgctg  
gggctggttatcnaaaaacganctagcagcgggggnccccggantgctggcggntggcccaaaaaaaaaaacaanaannccatttnggggg  
ggn

**C) Aislamiento Tc 7035**

nccccctcangaantattgtggttatgcgttatattcgcctgtgtattatctccctgttagccaccctgccgctggcggtacacgccagcccgcagccgcttg  
gagcaaatfaaactaagcgaagccagctgtcgggccgcgtaggcatgatagaaatggatctggccagcggccgacgctgaccgctggcgccg  
gatgaacgctttccatgatgacacctttaaagtagtctctcggcgacgtgctggcgccgggtgatgccggtgacgaacagctggagcgaagat  
ccactatcgccagcagctgctgactactcggcgtaagcgaaaaacaccttggcgacggcatgacggctggcgaacttgcgccgcccaftacca  
ccatgagcgataacagcggccaatctgactgcccaccgtcggcgccccgcaggattgactgccttttgcgccagatggcgacaacgtcacc  
cgcttgaccgctgggaaacggaactgaatgagcgttcccggcgacggccgacaccactacccggccagatggccgacccctgcgcaa  
gctgctgaccagccagctctgagcggcgttcgcaacggcagctgctgcatggtgatgggacgatcgggctcgggaccgttgcctgctcctgctg  
tggcgccggggtgtttatcgcgaaaaacganctagcagcggggngcgcgccggattgtccccngcttggcccaaaaa  
aaaaaaaaaacaacgcntcggccatgcatcgggggtatcccgcagataaatcaccacaatgcgctctgcttgttattcgggcaagcagggcg  
acaatcccgcgcgaccccgttgcctcctgctcggcgataaacagcccgcggcagcagggagcggatcaacggctccggcgaccgat  
cgtccaccatccactgcagcagctgctgctgcaacggcgctcagacgctgctgctcagcagcttgcgagggctcgggcatgctggccggggt  
agtgtgctcggggcgtcgggggaagcgcctcattcagttccgttcccagcgggtcaaggcgggtgacgttgcgccgatctggcgaaaaaggcag  
tcaatctcggggcccgacgggtggcagtanagattggcgcgctgttatcgtctatgtaaatggcggcgcganagttcggcaccgctatg  
cgtcggcaaggtgttttgcctgaccggcgagtagtccaccagatctgctgagatggtatcttctcagctgtcgtcncggcaccaccg  
cgccagcactgcggcganagcactactttaagngctcatatgggaaagcgtatcggcgccnngngtancgtcnnnnngctggnn  
natccatnnnatcatnctacccgccgacagctgnttccctaattattgctcaagcggcgggcgggggggggtnccccc

.....

**D) Aislamiento Tc 41030**

aanccgancaactaaatagtggnatgctgtatattcgcctgtgtattatctccctgttagccaccctgccgctggcgttacacgccagcccgcagc  
cgcttgagcaataaactaagcgaaagccagctgtcgggccgctagggcatgataaagatgctgcccagcggccgcacgctgaccgctggcg  
cgccgatgaacgctttccatgatgagcacctftaaagtagtgctctcggcgcagtgctggcgcgggtggatgccggtgacgaacagctggagcgaa  
agatccactatcgccagcagatctggtggactactcggcggcagcgaacacaccttgccgacggcatgacggctggcgaactctgcgccggcgc  
cattaccatgagcgataaacagcggcccaatctgctactggccaccgtcggcggccccgcaggattgactgccttttggccagatcgccgacaactg  
caccgcttgaccgctgggaaacggaactgaatgagcgttcccggcgcacggccgcacacnctaccccggccagatggccgcagacctgc  
gcaantgctgaccagcagcgtctgagcggccgttcccaacggcagctgctgcatggatggtgggacgatcgggntcggccggaaccgttgan  
nccgctcgtngcttggccggcggctgggtttatcnccnannaanaccgggaacntngcgaaccgggggngnncncnccggggaantttgtncc  
cccccccg

aaaaaaaaaaaaacaaaaaancggccatgcatcgccgggtatcccgcagataaatcaccacaatgcgctctgctttgtattcggccaagcaggg  
cgacaatcccgcngcaccgccctcgtctagctccggtcttatcggcgataaacagcccggccgagcagcggatcaaacggtccggcgacc  
gatcgtccaccatccactgcagcagctgccgttgcgaacggcgcctcanacgctggctgctcagcagcttgcgagggctcggccatgctggccgg  
ggtagtggctcggcggcgtcggcgnancgctcctnttccanttccgttcccagcggcaagcgggtgacgttgcgncgatcggcnaaaaaagg  
cagtcaatcctcngggccggcagcgtggccannancanattggcggcgtgtatcgtctatggtaatggcngcggcgnnanntcggcagccg  
tcatccgctggcaaggtgttttncctgaccngcgagtagtcaccnncatcctgctggcnatantggatcttctcctcagntgttcgncggcatcc  
acnccgcnagnactgcggcgcagnnactactttaaaggtgctcatcatgnngaagcgttcatcggcgcncacggcggcagcngcggccgctg  
ggccanacntttctatcatgcctacnccggccgacagctgntttcctanttttaatttggcnnncannnnnnnnnnngggngcnggggn

.....

**E) Aislamiento TcHM3**

aatattgtggttatgctgttatattcgcctgtgtattatctccctgttagccaccctgccgctggcgggtacacgccagcccgcagccgcttgagcaataaact  
aagcgaagccagctgtcgggccgctagggcatgataaagatgctgcccagcggccgcacgctgaccgcctggcgcggccgatgaacgctttcc  
catgatgagcacctttaaagtantgctctcggcgcagtgctggcgcgggtggatgccggtgacgaacagctggagcgaagatccactatcgccagc  
aggatctggtggactactcggcgtcagcgaacacaccttgcggcagcggatgacggctggcgaactctgcgccggccattaccatgagcgataac  
agcggcccaatctgctactggccaccgtcggcggccccgcangattgactgccttttggccagatcggcgaacgacccccttgaccgctg  
ggaacgggaactgaatgagcggcttcccggcgcacggccgcnacnncnntaccccggccancatggccgcgacccctgcgcaagctgctgaccancc  
agcgtctgancggcgttcgaacggcagcngnngcagtgnaagggngnacgancgggtcncgggaaccgntnaaccngctcnnngctngn  
cngnnggntgggtttanann

aaaaaaaaaacnaagnnaaatgnaacggcgggttcccgcagaaaaatcaccacaatgcgctctgctttgtattcggccaagcagggcgacaatc  
ccgcgcaccccgttgcctagctccggtcttatcggcgataaacagcccggcggcagcagcggatcaacggtccggcgaccgcatgtcca  
ccatccactgcagcagctgcccgttgcgaacggcgcctcagacgctggctgctcagcagcttgcgcagggctcggccatgctggccggggtagtgt  
gtcggggcgtcggcgaagcggcctcattcagttccgttcccagcgggtcaagcgggtgacgttgcggcgtatctggcgaacaaagcagtcatac  
ctcggggcggcggcaggtggccagtagcagattggcggcgtgttctcgtcgtatgtaatggcggcggcgcagagttcggcaccgcatgccgtc  
ggcaaggtgttttcgctgaccggcagtagtcaccagatcctgctggcagatggatcttctcctcagctgttcgacccgcatccaccgcgcca  
gcactgcggcgaacgactactttaaaggtgctcatcatgggaaagcgttcatcggcgcgccagggcgtcagcggcggcggcgtggcnaatccttt  
ctatcatgcctaccggcccaaaaactgctttnttaattttatttggnnccancggnttg

**Figura 7.** Secuencias nucleotídicas (F y R) de los genes bla<sub>SHV-5</sub> de los aislamientos A) 41020; B) TcHC1; C) Tc7035; D) Tc41030; E) TcHM3

## DISCUSIÓN

Las BLEE, como se mencionó, confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación pero no a carbapenémicos. Los resultados obtenidos mostraron que todos los aislamientos fueron sensibles a imipenem (tabla 1). Sin embargo los resultados para las cefalosporinas fueron diversos. Como se indicó previamente, para evidenciar fenotípicamente la presencia de una BLEE se colocó un disco de amoxicilina con ácido clavulánico, éste inhibe la acción de las  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido, permitiendo que actúen las cefalosporinas de tercera generación, por tanto, si nos encontramos en presencia de una BLEE, cerca del halo del amoxicilina con ácido clavulánico se va a producir una apertura del halo de las cefalosporinas de tercera generación. Esta alteración en los halos (sinergia positiva) se vio experimentalmente como una cola de pez. De las 50 muestras 16 no fueron inhibidas con ácido clavulánico, la sinergia fue negativa, por lo cual no fueron tomadas en cuenta para realizar los siguientes estudios, ya que al presentar este perfil podemos considerar que esas cepas no contienen las enzimas que estamos buscando.

En aquellas cepas que presentaron sinergia positiva y fueron sensibles a imipenem, si observamos los perfiles para las cefalosporinas de tercera generación, en este caso cefotaxime (CTX) y ceftazidime (CAZ), los resultados fueron diversos. En aquellas muestras donde los halos son resistentes a CTX, y su diámetro es menor que el halo de CAZ, es sospechoso que esa cepa contenga una cefotaximasa (CTX-M) y en aquellos casos que sucede al revés, es posible suponer la presencia de una cepa con enzimas SHV, PER u otra BLEE diferente de CTX-M. Si analizamos los resultados de la mayoría de las muestras, observamos que presentan un halo más pequeño para CTX que para CAZ, lo cual infiere la presencia de una cefotaximasa. Las cepas 41020, 96003, HM3, 7035 y 283 exhiben halos mayores para CTX que para CAZ por lo cual es posible la presencia de una BLEE diferente a una CTX-M. La muestra 96003 por ejemplo tiene un halo para CTX de 20 mm y un halo para CAZ de 9 mm, según CLSI es resistente a CAZ y sensible a CTX. En este caso podría sospechar que ésta cepa no tiene una cefotaximasa, si podría tener otro tipo de BLEE.

Las 34 cepas que fenotípicamente manifestaron presencia de BLEE, se les realizó ensayos de PCR utilizando como el oligonucleótido CTX-M genérico con el cometido de encontrar genes que codifiquen para cualquier grupo de las cefotaximasas.

De las 34 cepas estudiadas 27 fueron positivas para CTX-M genérico (Fig 3). Más aún, las 27 cepas presentaron el gen para CTX-M-2 (Fig 4).

Con estos resultados podemos responder el objetivo de este trabajo, según los datos obtenidos no existió diferenciación de las cefotaximasas en sus diversos grupos entre los años que fueron recolectadas las muestras, ya que en las cepas estudiadas no se encontró ningún gen diferente de bla<sub>CTX-M-2</sub>. Si bien el trabajo tiene la debilidad de analizar un bajo número de cepas, artículos publicados en nuestro país con menor número de cepas ya muestran una proporción importante de CTX-M diferentes de CTX-M-2<sup>21, 26</sup>

De este modo, es posible especular con el hecho de que a mediados de los 90 se habrían comenzado a diseminar CTX-M-2, no apareciendo o al menos no haciéndose prevalentes hasta mediados los 2000 las BLEE tipo CTX-M-8, CTX-M-15 y CTX-M-9.

El arribo de estas nuevas BLEE se ven acompañadas de nuevos mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos como ser los mecanismos de resistencia a quinolonas transferibles. Si la tendencia se mantiene, sería de esperar que nuevas variantes de CTX-M continúen emergiendo. De hecho al momento de terminar este informe se detectaba en el Departamento de Bacteriología y Virología un aislamiento de *Salmonella* Enteritidis portando CTX-M-14.

## CONCLUSIONES

Los estudios realizados muestran que la diferenciación de las cefotaximasas en sus diversos grupos no ocurrió entre los años 1995 al 2007, sino que fue recientemente, confirmando de esta manera la hipótesis de trabajo.

El alto porcentaje de cepas que contenían una BLEE, estriba en la teoría de la rápida diseminación de estas enzimas.

## REFERENCIAS

- 1- Celis Y, Pulido I, Valenzuela de Silva E, Reguero M, Mantilla J, 2009. *Ambiente genético del Gen blaCTX-M-12 en aislamientos hospitalarios de Klebsiella pneumoniae*, Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI No.1 p 48-58.
- 2- Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV, 2004. **Estudio prospectivo internacional de la bacteremia por K pneumoniae: Implicaciones de la producción de betalactamasas de espectro ampliado en las infecciones nosocomiales**, Ann Int Med 140, p 26-32.
- 3- Di Conza, J, Radice M, Gutkind G, 2004. *Betalactamasa adquiridas en Enterobacterias aisladas en Argentina*, Revista FABICIB, Vol 8, p 261-268.
- 4- Sanchez B, 2008. *Betalactamasa de espectro extendido (BLEE)*, Revista Electrónica de Medicina Intensiva. Vol 4, No. C6.
- 5- Morejón M, 2005. *Betalactamasa de espectro extendido. Un problema actual*. Asociación Panamericana de Infectología Cubana, p 12-25.
- 6- Bonnet R, 2004. **Growing Group of Extended-Spectrum Lactamases: the CTX-M Enzymes**, Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 48, p 1-14.
- 7- <http://www.lahey.org/studies>
- 8- Jacoby G, Medeiros A, 1991. **More Extended-Spectrum B-Lactamases**, Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 35, No. 9, p 1697-1704.
- 9- Rodríguez M, Power P, Radice Ma, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, Ayala J, Gutkind G, 2004. **Chromosome-Encoded CTX-M-3 from Kluyvera ascorbata: a Possible Origin of Plasmid-Borne CTX-M-1-Derived Cefotaximases**, Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol 48, 4895-7.
- 10- Canton, R., and T. M. Coque. 2006. **The CTX-M beta-lactamase pandemic**. Curr Opin Microbiol Vol 9, 466-75.

11- Lartigue M, Poirel L, Nordmann P, 2004. **Diversity of genetic environment of blaCTX-M genes**, Service de Bacteriologie-Virologie, Hospital de Bicetre – CHU Paris-Sud, Assistance Publique/Hopitaux de Paris, Facult\_e de M\_edecine Paris-Sud, 78, rue du General Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicetre Cedex, France FEMS Microbiology Letters 201–207.

12- Martinez P, Mattar S, 2007. **Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología**, Asociación Colombiana de Infectología Vol 11 p 23-35.

13- Cantón R, Oliver A, Coque T, Varela M, Pérez-Díaz J, Baquero F, 2001. **Epidemiology of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacter* Isolates in a Spanish Hospital during a 12-Year Period**, Journal of Medical Microbiol Vol40 N°4 p 1237-1243.

14- Villegas M, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, Casellas J, Ayala J, Lolans K, Quinn J, and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group, 2001. **CTX-M-12  $\beta$ -Lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia**, Journal of Medical Microbiol Vol 60 p 135-137.

15- Machado E, Coque T, Canton R, Sousa J, Peixe J, 2004. **Emergence of CTX-M  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in Portugal: report of an *Escherichia coli* isolate harbouring blaCTX-M-14**, Clin Microbiol Infect. Vol 10 p755–757.

16- Torres L, Rodríguez D, Machado Y, Cova L, Cova L, Comegna M, Calvo A, Pedroza R, 2005. **Detección de B-lactamasas de espectro expandido CTX-M grupo-1 en *Shigella sonnei* aislada de un coprocultivo en el Laboratorio de Microbiología de la Policlínica Santiago de León**, XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología VI Congreso Venezolano de Infectología II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual 15 al 18 Mayo – 2005. Caracas, Venezuela.

17-Craig J, David A., Nigel B, Mark M, Andrews J, Wise R, Mulvey M, and Hawkey P, 2004. *Molecular and Kinetic Comparison of the Novel Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26*, Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 48, No. 12 p. 4829–4834.

18- Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Göran Kronvall, Paradisi F, and Rossolini G, 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*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy p 2720–2725.

19- Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Schelotto F, Radice M, Ayala J, Power P, Gutkind G, 2006. *Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de Klebsiella pneumoniae provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay*, Revista Argentina de Microbiología, p 84-88.

20- Cordeiro NF, Robino L, Medina J, Seija V, Bado I, García V, Berro M, Pontet J, López L, Bazet C, Rieppi G, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R., 2008. **Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the aac(6')-Ib-cr variant isolated from feces of inpatients in an ICU, Uruguay**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 52 p 806-807.

21-Bado, I., Cordeiro, N., Robino, L., García-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., Gutkind, G., 2010. **Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients**. International Journal of Antimicrobial Agents, Vol 36(5), p 453-458.

22- Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez M, Costa N, Korbenfeld D, 2003. **Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals**. Antimicrob. Agents Chemother. Vol 47 p 2864-2867.

- 23- Richard Bonnet, Danielle Sirot, Jacques Sirot, 2002. **Early Dissemination of CTX-M-Derived Enzymes in South America**, Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. 46, No. 2 p. 602–604.
- 24- Oliver A, Cantón R, 2004. **Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro extendido**, SEMIC, p 1-10.
- 25- Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Hernández J, L. Martínez, Pascual A, 2005. **Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum b-lactamases**, Clinical Microbiology and Infection, Vol 11 N° 8, p 625–631.
- 26- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 7<sup>th</sup> ed. Approved standard M2-A7 NCCLS. Wayne, PA. EEUU.
- 27- García-Fulgueiras V, Bado I, Mota I, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, Algorta G, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R. 2011. **Extended Spectrum b-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in Enterobacterial Clinical Isolates in the Paediatric Hospital of Uruguay**. J. Antimicrob. Chemother. Vol 66 p 1725-1729.