



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*

Facultad de Ciencias- UdelaR.  
Facultad de Química- UdelaR.



## Tesina de Grado:

“Detección y caracterización genética de  
Betalactamasas y Betalactamasas de  
Espectro Extendido en aislamientos de  
Enterobacterias”

Lorena Bariani Zanoniani

Tutora: Dra. Carolina Márquez

## RESUMEN

Los principales problemas de resistencia a antimicrobianos en América Latina son causados por Enterobacterias productoras de BLEE. El aumento en el número de infecciones causadas por éstas, asociado a la rápida emergencia de fenotipos resistentes a múltiples drogas (especialmente cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes) representa un serio desafío médico global. En el presente trabajo se estudiaron 19 aislamientos clínicos (*K.pneumoniae*, *E.coli*, *C.freundii* y *E. clocae*) resistentes a cefotaxime y/o ceftriaxona con el fin de contribuir a examinar la epidemiología local de la resistencia a antibióticos betalactámicos en patógenos bacterianos de origen hospitalario. Aplicando un esquema modificado de Livermore se presumió la presencia de BLEE y otras betalactamasas y se realizó una confirmación fenotípica, identificación y caracterización molecular de las mismas. En la mayoría de los aislamientos hubo consistencia con el autor, detectándose tanto ceftazidimasas (SHV-5) y/o cefotaximasas (CTX-M 2 y CTX-M 15), por lo que las predicciones habrían sido mayormente confirmadas por PCR y secuenciación. 10 aislamientos, mayormente *K.pneumoniae*, presentaron fenotipos MDR y en varios se infirió presencia simultánea de BLEE y otros mecanismos de resistencia a betalactámicos como disminución de la permeabilidad de membrana. Se buscó identificar cepas productoras de betalactamasas de tipo AmpC y de carbapenemasas de tipo KPC, pero no se obtuvieron resultados positivos. Se considera de vital importancia continuar con estudios de vigilancia como los presentados en este trabajo, para conocer la realidad en nuestra región, teniendo en cuenta la combinación de la caracterización fenotípica y genotípica.

## INTRODUCCIÓN

- 1.1 *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiples drogas: un problema global (pág. 4)
- 1.2 Betalactamasas: importancia y clasificación (pág. 5)
- 1.3 Epidemiología de las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (pág. 8)
- 2. Carbapenemasa de tipo KPC (pág. 10)

## OBJETIVOS

- ♦ Objetivo general (pág. 12)
- ♦ Objetivos específicos (pág. 12)

## MATERIALES Y MÉTODOS

- ♦ Aislamientos clínicos (pág. 13)
- ♦ CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS BLEE BACTERIANAS:
  - Determinación de aislamientos productores de BLEE y otras betalactamasas (pág. 14)
  - Método de difusión en agar a partir de discos (pág. 14)
- ♦ CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BLEE BACTERIANAS:
  - Extracción de ADN cromosomal para PCR: Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivos (pág. 15)
  - Cuantificación por Absorbancia (pág. 16)
  - Análisis de la presencia de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> por PCR: Preparación de moldes, condiciones de reacción, visualización de los productos de PCR (pág. 17)
  - Control de inhibición: ARNr 16s (pág. 19)
  - Secuenciación de los productos de PCR (pág. 19)

- Análisis de las secuencias obtenidas (pág. 19)
- ♦ Identificación de cepas productoras de betalactamasas de tipo AmpC: Test de sinergia de doble disco (pág. 19)
- ♦ Detección de carbapenemasas de tipo KPC: método de difusión en agar a partir de discos, PCR del gen *bla*<sub>KPC</sub>. (pág. 20)

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

- ♦ Referidos a objetivo 1: presunción de la presencia de BLEE y de otras betalactamasas, basado en el perfil de sensibilidad a distintas cefalosporinas de tercera generación (C3G)(pág. 21)
- ♦ Referidos a objetivo 2: confirmación fenotípica de BLEE (pág. 22)
- ♦ Referidos a objetivo 3: identificación y caracterización molecular de BLEE(pág. 25)
- ♦ Referidos a objetivo 4: detección fenotípica de cepas productoras de betalactamasas de tipo AmpC (pág. 36)
- ♦ Referidos al objetivo 5: identificación molecular de aislamientos productores de carbapenemasas de tipo KPC (pág. 37)
- ♦ Conclusión general (pág.39)

## **BIBLIOGRAFIA (pág. 41)**

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiples drogas: un problema global

*Klebsiella pneumoniae* comprende una especie bacteriana que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es por lo tanto un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo. En humanos puede encontrarse en el tracto intestinal, en la nasofaringe y sobre la piel y da cuenta de una gran variedad de infecciones nosocomiales así como también adquiridas en la comunidad. Es asimismo responsable de numerosos brotes infecciosos causados mayormente por la diseminación de clones asociados con infecciones oportunistas en individuos con el sistema inmune alterado (diabéticos, pacientes hospitalizados, alcohólicos, entre otros). (Podschun y Ullmann, 1998). El aumento en el número de infecciones causadas por esta especie así como por otras enterobacterias se encuentra asociado a la rápida emergencia de fenotipos resistentes a múltiples drogas (RMD), especialmente a las cefalosporinas de tercera generación (C3G) y a los carbapenemes, lo cual representa un serio desafío médico global (Chanawong M. *et al.*, 2001; Livermore y Hawkey, 2005) pues aumentan la morbilidad, mortalidad y los costos de salud (Landman *et al.*, 2007). Los principales problemas de resistencia a antimicrobianos en América Latina, son los bacilos Gram-negativos no fermentadores (BGN-NF) multiresistentes y especies de la familia de las Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Gales *et al.*, 2012; Landman *et al.*, 2007; Sader *et al.*, 2004). Por lo cual, la resistencia a antimicrobianos es un tema en el cual existe una activa investigación desde el punto de vista de desarrollar estrategias de contención y de nuevas alternativas terapéuticas. La epidemiología de la resistencia es compleja debido a que existe más de un gen que confiere resistencia a un determinado antibiótico (ATB), de modo que su diseminación involucra una serie de evoluciones superpuestas, una para cada gen involucrado, a lo que se agrega la diseminación de las bacterias que han adquirido estos genes.

## 1.2 Betalactamasas: Importancia y clasificación

Las betalactamasas son enzimas producidas por diferentes especies bacterianas que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo de los antibióticos betalactámicos; éstas representan el mecanismo de resistencia más común para esta clase de antibióticos (Bush y Jacoby, 2010). Existen 2 criterios de clasificación para estas enzimas. Un criterio molecular (comúnmente conocido como clasificación de Ambler) y un criterio funcional (conocido como clasificación de Bush). Este último fue el primero en describirse y utilizarse, a pesar de no reflejar la historia evolutiva de las enzimas clasificadas. El criterio molecular se basa en la secuencia proteica y la identificación de motivos aminoacídicos conservados y distinguibles y clasifica a las enzimas en clases moleculares A, B, C o D (Ambler, 1980; Jaurin y Grundstrom, 1981; Ouellette, Bissonnette, y Roy, 1987). Las clases A, C y D comprenden serín-enzimas que hidrolizan sus sustratos a través de un sitio activo que presenta un residuo de serina; la clase B comprende metalo-enzimas que tienen al menos un átomo de Zinc en su sitio activo. Las betalactamasas de las familias TEM, SHV, CTX-M y KPC se clasifican dentro de la clase A de Ambler; las metalo-betalactamasas de las familias VIM, IMP, SPM, NDM son ejemplos pertenecientes a la clase B; las enzimas tipo AmpC se clasifican dentro de la clase C, mientras que las enzimas tipo OXA son clasificadas dentro de la clase D. A través de criterios funcionales tales como la capacidad hidrolítica, el punto isoeléctrico, propiedades de inactivación de diferentes inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) propuestos inicialmente (Bush, 1989), y posteriormente extendidos (Bush, Jacoby, y Medeiros, 1995), las betalactamasas pueden clasificarse en grupos denominados del 1 al 4 (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificaciones propuestas para las betalactamasas bacterianas

Bush-Jacoby-Medeiros	Ambler	Sustratos preferidos	Inhibidos por AC	Inhibidos por EDTA	Enzimas representativas
1	C	Cefalosporinas (CFL)	-	-	AmpC
2a	A	Penicilinas (P)	+	-	penicilinasas de grampositivos
2b	A	P,CFL	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	P,CFL,C3G, Monobactams	+	-	TEM-3 a -29, TEM-42, TEM-46 a -49, TEM-52 a -57 y TEM-59 a 61, SHV-2 a 9 y SHV-12, K1
2br	A	P	+/-	-	TEM-30 a -41, TEM-44 a -45, TEM-50, 51,58 y 59, SHV-10
2c	A	P,Carbenicilina	+	-	PSE-1 a -3
2d	D	P,Cloxacilina	+	-	OXA-1 a -21
2e	A	CFL	+	-	Cefalosporinasa de <i>P.vulgaris</i>
2f	A	P,CFL,Carbapenems	+	-	NMCA
3	B	betalactámicos en general, incluidos Carbapenems	-	+	VIM, IMP, SPM, NDM
4	ND	P	-	ND	Penicilinasas

Modificado de Bush-Jacoby-Medeiros, 1995. "AC": ácido clavulánico."ND": no determinado.

### Grupo 1: Cefalosporinasas

Corresponde a enzimas de la clase C de Ambler y están codificadas en los cromosomas de varias familias bacterianas, incluidas las Enterobacterias (Jacoby, 2009). También las hay de origen plasmídico. Su espectro de acción incluye las penicilinas, las cefalosporinas (siendo más activas contra éstas), cefamicinas (como cefoxitín, oxi-iminocefalosporinas como ceftazidima y cefotaxima y monobactams como aztreonam). Son además pobremente inhibidas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Bush y Jacoby, 2010).

### Grupo 2: Serín-betalactamasas

Corresponde a enzimas de las clases moleculares A y D de Ambler y representan el grupo más grande de betalactamasas debido a la creciente identificación de BLEE en los últimos años. En base a su espectro de hidrólisis se subdividen en subgrupos denominados 2a, 2b, 2c, 2d, 2e y 2f (Bush y Jacoby, 2010). Las enzimas más frecuentemente encontradas en

Enterobacterias pertenecen a los subgrupos 2b, 2d y 2f. Dentro de los subgrupos 2b y 2d encontramos tanto enzimas de espectro reducido (que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera generación, como TEM-1 y SHV-1) como BLEE (TEM-50, SHV-12, CTXM-15, OXA-11). Dentro del subgrupo 2f se clasifican las seríncarbapenemasas (algunas codificadas a nivel cromosomal como SME e IMI-1, y otras a nivel plasmídico como KPC-2 y algunas variantes de GES); todas ellas con capacidad de hidrólisis de los carbapenemes y en mayor o menor grado, monobactams. Las enzimas miembro de este grupo son inhibidas por ácido clavulánico y por tazobactam. Las carbapenemasa de tipo KPC no se inhiben por el ácido clavulánico, pero sí por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para su reconocimiento fenotípico.

#### Grupo 3: Metallo-betalactamasas (MBLs)

Corresponde a las enzimas de la clase B de Ambler y poseen al menos un átomo de Zinc en su sitio activo. No son inhibidas por ácido clavulánico ni por tazobactam, pero sí por quelantes de iones metálicos como el EDTA o el ácido dipicolínico. En cuanto a su perfil hidrolítico, son capaces de hidrolizar carbapenemes pero tienen una pobre actividad frente a los monobactams. Pertenecen a este grupo las enzimas de las familias VIM e IMP, codificadas a nivel plasmídico (González-Escalante, 2012).

#### Grupo 4: betalactamasas no inhibidas por ácido clavulánico

En la clasificación inicial (Bush et al., 1995) algunas pocas enzimas de espectro reducido producidas por *Pseudomonas cepacia* estaban incluidas dentro de esta última categoría, y se diferenciaban de otras enzimas por no ser inhibidas por ácido clavulánico. Sin embargo, poco se sabía sobre su estructura o su modo de acción. En el año 2010, Bush y Jacoby intencionalmente omitieron la consideración de este último grupo argumentando que seguramente, si más información estuviese disponible respecto de las enzimas previamente clasificadas dentro de este grupo, éstas pasarían a clasificarse dentro de alguno de los otros grupos bien caracterizados.

### 1.3 Epidemiología de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

A pesar de no existir un consenso respecto de lo que implica una BLEE, una definición de uso común describe a las mismas como aquellas enzimas capaces de conferir resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de primera generación (C1G), de segunda generación (C2G), de tercera generación (C3G) y monobactams (no a cefamicinas o carbapenemes) mediante la hidrólisis de estos antibióticos. Son inhibidas por ácido clavulánico, en mayor o menor grado (Paterson y Bonomo, 2005). Las BLEE fueron descritas por primera vez a mediados de la década de 1980. En el inicio, la mayoría de los casos descritos correspondieron a variantes alélicas de las penicilinasas TEM-1 (Sougakoff *et al.*, 1988) y SHV-1 (Knothe *et al.*, 1983) portadas en plásmidos, que presentaban una o más sustituciones de aminoácidos, ampliando su espectro de acción a C3G y cefalosporinas de cuarta generación (C4G). Sin embargo, al presente la epidemiología de las BLEE ha variado debido a la amplia diseminación de las BLEE correspondientes a la familia CTX-M con el consiguiente desplazamiento de las familias TEM y SHV. Esta diseminación explosiva de enzimas pertenecientes a esta familia ha sido denominada como “pandemia de CTX-Ms” (Cantón y Coque, 2006). La primera enzima descrita fue CTX-M-1 reportada en 1989 en Alemania a partir de un aislamiento de *Escherichia coli* resistente a cefotaxime (CTX) (Bauernfeind, Grimm, y Schweighart, 1990). Hasta la fecha se han reportado 139 variantes alélicas de la familia CTX-M (<http://www.lahey.org/Studies>). Estas enzimas hidrolizan CTX más rápidamente que ceftazidime (CAZ). A diferencia de otras BLEE, la familia de las CTX-M constituye un grupo de enzimas complejo y heterogéneo evidenciado por análisis filogenéticos que muestran la clasificación en al menos 5 clusters (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) (Cantón, González-Alba, y Galán, 2012). Estos análisis sugieren que los diferentes clusters han evolucionado a partir de diferentes genes de betalactamasas cromosómicos naturales con actividad cefotaximasa presentes en especies de *Kluyvera* (Rodríguez *et al.*, 2004), cuyo hábitat natural es el medio ambiente. Se sugiere que la movilización de estos genes ha sido facilitada por la secuencia de inserción (IS) ISEcp1 u otras secuencias de inserción relacionadas (Cantón *et al.*, 2012; Livermore *et al.*, 2007). Las diferentes variantes de cada

cluster fueron originándose a partir de mutaciones puntuales, probablemente por la presión selectiva del uso de antibióticos. En contraposición a lo observado para las BLEE de tipo TEM y SHV, la diseminación de las CTX-M ocurriría desde la comunidad y el medio ambiente hacia el ambiente hospitalario. Los genes que codifican las betalactamasas del tipo CTX-M se encuentran insertos en estructuras similares a transposones (Tn), muchas veces portados en plásmidos conjugativos, promoviendo la diseminación de esos genes entre diferentes bacterias (Canton *et al.*, 2012). El éxito en su diseminación, además de estar relacionado con estos elementos móviles en los cuales están insertos, probablemente se deba al hecho de que estas plataformas suelen encontrarse en clones exitosos. En las últimas dos décadas se han visto diferentes genes de betalactamasa fuertemente asociados para formar regiones resistentes a múltiples drogas. Fundamentalmente, muchos organismos productores de CTX-M han evidenciado el fenómeno de co-resistencia, particularmente a aminoglucósidos y fluoroquinolonas, lo cual además podría estar siendo facilitado por el proceso de co-selección (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2011). La variante alélica CTX-M 2 fue detectada en aislamientos clínicos de *Salmonella spp.* en Argentina en 1990 y rápidamente se dispersó en el resto de América del Sur, siendo al presente la variante más frecuente en Uruguay (Márquez *et al.*, 2008; Roy Chowdhury *et al.*, 2011; Vignoli *et al.*, 2006). La variante alélica CTX-M-15 está más ampliamente diseminada en Europa, si bien en nuestro continente está comenzando a aparecer con mayor frecuencia en aislamientos con fenotipo RMD (Bado *et al.*, 2010; Damjanova *et al.*, 2008; García-Fulgueiras *et al.*, 2011; Oteo *et al.*, 2009; Vranic-Ladavac *et al.*, 2010).). Para la mayoría de los patógenos la resistencia a drogas está causada fundamentalmente por la adquisición de nuevos genes y en menor medida por mutaciones. El surgimiento de bacterias patógenas resistentes no solo a una familia de drogas, sino a varios tipos de drogas no relacionadas químicamente, es un fenómeno progresivo observado en numerosas especies patógenas para el hombre. La evolución hacia la resistencia a múltiples drogas se puede deber a la acumulación de varios mecanismos específicos, a la aparición de mecanismos inespecíficos únicos o a una combinación de ambos. La evolución mediada por la acumulación de

mecanismos de resistencia específicos es relativamente rápida ya que la principal fuerza que la ocasiona es la transferencia horizontal de genes (THG), un proceso influenciado por una amplia gama de elementos genéticos móviles (Ochman, Lawrence, y Groisman, 2000). En las bacterias Gram negativas estos elementos incluyen plásmidos, transposones e integrones junto con sus elementos móviles asociados, los cassettes génicos. Estos elementos no actúan aisladamente, por el contrario es común que plásmidos conjugativos contengan varios elementos transponibles, los que a su vez contienen integrones con combinaciones diversas de cassettes génicos asociados (Walsh, 2006). Tales combinaciones que colectivamente pueden transferirse por conjugación, transposición o por sistemas de recombinación sitio-específicos, pueden diseminar la resistencia a una variedad de bacterias filogenéticamente muy distantes, muy rápidamente y reorganizar la información de varias maneras en el nuevo huésped antes de volver a transferirse.

## **2. Carbapenemasa de tipo KPC:**

La gran dispersión de las enterobacterias productoras de BLEE en el mundo, así como la presencia de complejas plataformas genéticas en las que los genes codificantes de las mismas se encuentran embebidos, ha comprometido el uso de cefalosporinas de espectro extendido. Por lo tanto, los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos son los carbapenems, ya que son estables frente a la mayoría de las betalactamasas, incluyendo las BLEE. Sin embargo, concomitante a su mayor empleo, se ha observado aumento de las tasas de resistencia a estos fármacos (Sader *et al.*, 2004). En las últimas dos décadas, la resistencia a los carbapenems se ha convertido en un problema importante entre los BGN-NF (Carvalho *et al.*, 2006; Sader, Reis, Silbert, y Gales, 2005), aunque ha sido poco común entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, en los últimos años se ha informado un aumento de las Enterobacterias, especialmente *K. pneumoniae*, resistentes a los carbapenems (Nordmann, Cuzon, y Naas, 2009). La resistencia a carbapenems en *K. pneumoniae* se asocia principalmente con la producción de carbapenemasas (betalactamasas

con actividad frente a carbapenemes) que confieren resistencia a carbapenemes y otros antibióticos betalactámicos (Bush y Jacoby, 2010). Asimismo, la pérdida o las alteraciones estructurales de porinas (un tipo de proteínas de membrana externa) por mutaciones en los genes que las codifican pueden contribuir a la resistencia a carbapenems (Landman, Bratu, y Quale, 2009). Como fue mencionado anteriormente, las carbapenemasas presentes en Enterobacterias pertenecen a la clase A de Ambler (KPC, Sme, NMC-A, IMI, variantes de GES/IBC), clase B de Ambler (metalo-betalactamasas) y clase D de Ambler (oxacilinasas) siendo las enzimas KPC las de clase A más frecuentes. Inicialmente los aislamientos productores de carbapenemasas del tipo KPC fueron detectadas en *K. pneumoniae* en 1996 en Estados Unidos y a partir del 2006 en Argentina, Brasil y Colombia y también en otras bacterias gram negativas (Nordmann *et al.*, 2009; Nordmann y Poirel, 2002; Poirel, Heritier, Tolun, y Nordmann, 2004; Queenan y Bush, 2007). En el 2011 se detectó por primera vez en nuestro país la aparición de una bacteria perteneciente a la especie *K. pneumoniae* productora de KPC proveniente de un paciente grave de un centro de tratamiento intensivo. El grupo de investigación al cual pertenezco participó en la caracterización fenotípica y genotípica de la cepa y en la caracterización genotípica y bioquímica de la carbapenemasa KPC (Roy Chowdhury P., *et al*, 2011). Esta situación epidemiológica evidencia la facilidad que presentan los genes  $bla_{KPC}$  para ser movilizadas por transferencia horizontal. Diversos análisis genéticos indican que la movilidad de este gen estaría asociada con la diseminación de diferentes clones, plásmidos y transposones y que a su vez es frecuente su co-transferencia con otros factores de resistencia a antibióticos (Nordmann *et al.*, 2009).

## OBJETIVOS

- ◆ Objetivo general: contribuir a la epidemiología local de la resistencia a antibióticos betalactámicos en patógenos bacterianos de origen hospitalario.
  
- ◆ Objetivos específicos:
  - 1- Presunción de la presencia de BLEE y de otras betalactamasas, según el perfil de sensibilidad a distintas cefalosporinas de tercera generación.
  
  - 2- Confirmación fenotípica de BLEE.
  
  - 3- Identificación y caracterización molecular de BLEE.
  
  - 4- Detección fenotípica de cepas productoras de betalactamasas de tipo AmpC.
  
  - 5- Identificación molecular de aislamientos productores de carbapenemasas de tipo KPC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos clínicos

Se estudiaron 19 aislamientos clínicos (tabla 2) resistentes a cefotaxime y/o ceftriaxona, provenientes de hemocultivos (H) y urocultivos (U) obtenidos de pacientes hospitalizados en un Centro de Salud de la ciudad de Montevideo en el período comprendido desde abril a julio de 2008. Los aislamientos remitidos contaban con ensayos de identificación y antibiograma de rutina realizados por el laboratorio de origen. Los mismos fueron subcultivados en medios TSA (Trypticasa Soya Agar) y Mc Conkey y se mantuvieron congelados en medio BHI-Glicerol a -20°C hasta el momento de su uso.

Tabla 2: Aislamientos clínicos utilizados en el presente trabajo

Referencia	Microorganismo	Fecha aislamiento	Dato clínico
U-54	<i>K. pneumoniae</i>	27/07/2008	Aislado junto con U-55 <i>E. faecalis</i>
H-06	<i>K. pneumoniae</i>	08/05/2008	Sepsis
H-07	<i>K. pneumoniae</i>	16/05/2008	Sin datos
H-30	<i>K. pneumoniae</i>	09/09/2008	Sin datos
U-02	<i>K. pneumoniae</i>	29/04/2008	Infección urinaria
U-18	<i>K. pneumoniae</i>	15/05/2008	Sin dato
U-19	<i>K. pneumoniae</i>	Sin dato	Sin dato
U-35	<i>K. pneumoniae</i>	Sin dato	Sin dato
U-20	<i>K. pneumoniae</i>	16/05/2008	S. febril
U-56	<i>K. pneumoniae</i>	28/07/2008	Aislado junto con U-57 <i>P. aeruginosa</i>
H-016	<i>K. pneumoniae</i>	09/07/2008	Sin datos
U-03	<i>K. pneumoniae</i>	29/04/2008	Aislado junto con U-04 <i>P. aeruginosa</i>
U-21	<i>K. pneumoniae</i>	21/05/2008	Sonda vesical
H-02	<i>K. pneumoniae</i>	25/04/2008	Peritonitis biliar, bilicultivo
U-14	<i>K. pneumoniae</i>	15/05/2008	Sin dato
U-01	<i>E. coli</i>	29/04/2008	Sin dato
U-07	<i>E. coli</i>	03/05/2008	Sin dato
U-13	<i>E. cloacae</i>	08/05/2008	Sin dato
U-63	<i>C. freundii</i>	08/09/2008	Aislado junto con U-64 <i>E. coli</i>

## CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS BLEE BACTERIANAS.

Para presumir la presencia de BLEE se realizaron antibiogramas siguiendo el método de difusión en agar a partir de discos, según el protocolo descrito por el NCCLS ("National Committee for Clinical Laboratory Standards") 2010 / CLSI ("Clinical Laboratory Standards Institute").

Los agentes antimicrobianos ensayados se seleccionaron siguiendo un esquema modificado de Livermore (Tabla 3) y fueron los siguientes: ampicilina/ácido clavulánico (AMC) 30 ug, ceftazidima (CAZ) 30 ug, cefotaxima (CTX) 30 ug, cefpodoxime (CPD) 10 ug y cefoxitín (FOX) 30 ug. Para el control de calidad de la técnica se realizó un ensayo simultáneo con un organismo no productor de BLEE (*E.coli* ATCC 25922) y otro productor de BLEE (*K.pneumoniae* ATCC 700603).

Dependiendo del perfil de sensibilidad presentado se podría presumir la presencia de BLEE (esta sigla se refiere a las ceftazidimasas, representadas por las enzimas TEM y SHV principalmente), y/o CTX-M (cefotaximasas), y/o AmpC y K1.

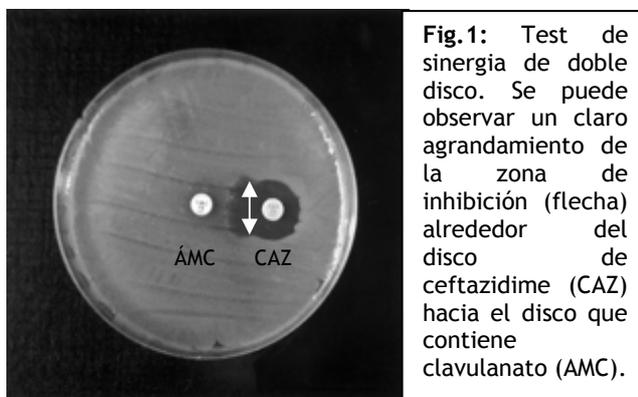
Frente a la sospecha de producción de una de estas enzimas, se realizó un ensayo fenotípico confirmatorio basado en la observación de una sinergia frente a un disco de AMC. (Manual de apoyo al curso práctico de Bacteriología y Micología del año 2009, Facultad de Química. Universidad de la República.)

Tabla 3: Esquema adaptado de Livermore

Enzima	Susceptibilidad a antimicrobianos				Sinergia con clavulanato		
	CAZ	CTX	CPD	FOX	CAZ	CTX	CPD
BLEE	R	v	R	S	+	+	+
AmpC	R	R	R	R	-	-	-
K1, sólo <i>K. oxytoca</i>	S	v	R	S	-	+/-	-
CTX-M	v	R	R	S	+/-	+	+

S: sensible y R: resistente al antibiótico correspondiente. v indica que el resultado puede ser variable. +, Sinergia entre el clavulanato y una cefalosporina, -, no ocurre sinergia. +/-, variable

La confirmación fenotípica de presencia de BLEE se realizó mediante un ensayo de sinergismo de doble disco entre AMC (20/10 ug) y varias cefalosporinas de tercera generación, colocadas a 15 mm: CAZ (30 ug), CTX (30 ug) y CPD (10 ug) con el propósito de aumentar la sensibilidad en la detección de dichas enzimas (Truppia, Mollerach, 2004). Una clara extensión del borde en la zona de inhibición del crecimiento de las C3G hacia el disco conteniendo el ácido clavulánico (fenómeno denominado “cola de pescado”, flecha en Figura 1), fue interpretada como un efecto sinérgico, indicando la existencia de una BLEE. Como control de la técnica se utilizó la cepa *K.pneumoniae* ATCC 700603.



Sobre aquellos aislamientos considerados como productores de BLEE se investigó la presencia de las familias CTX-M, TEM y SHV mediante amplificación por PCR con el uso de cebadores consenso para cada familia.

#### Extracción de ADN total

Se realizó la extracción de ADN total de todos los aislamientos según la técnica detallada a continuación (método adaptado de Ausubel F.M. *et al*, 1991; Sambrook, Russell, 2001; Dillon, Nasim, Nestmann, 1985).

- Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivos:

Se obtuvo un pellet de células por suspensión de colonias aisladas en buffer TE (pH 8.0, 10 mM en Tris 1 mM en EDTA) hasta alcanzar una turbidez equivalente al n° 3 de Mac Farland. Se lavó el pellet con 600 uL de suero fisiológico y se centrifugó descartándose el sobrenadante (1000 r.p.m. durante 10 minutos).

Se resuspendió el pellet obtenido en 200 uL de buffer TE y se agregaron 20 uL de lisozima 50 mg/mL. Se incubó a 37°C durante 15 minutos.

Se agregaron 250 uL de buffer TE, 25 uL de SDS 10% y 3 uL de Proteínasa K 20 mg/mL. Se mezcló e incubó durante 1 hora a 37°C.

Inmediatamente se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos.

Se agregaron 281 uL de NaCl 5M frío y se agitó por inversión. Se incubó en hielo durante 10 minutos, agitando por inversión 5 veces durante la misma.

Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL con la precaución de no aspirar el precipitado (en el caso de que el sobrenadante apareciera “sucio”, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se transfirió el nuevo sobrenadante a un tubo de 1,5 mL).

Se agregó igual volumen de isopropanol frío y se agitó por inversión. Se agitó al menos 20 veces antes de centrifugar.

Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante por inversión y se lavó el precipitado con 900 uL de etanol 70% frío. Se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C.

Se retiró el sobrenadante y se aspiraron los restos de etanol cuidadosamente. Se dejó secar el precipitado hasta comprobar la completa desaparición del mismo. Se resuspendió el precipitado en 100-200 uL de agua miliQ y se incubó a 65°C durante aproximadamente 20 minutos. Se mantuvo en condiciones adecuadas hasta su utilización.

#### Cuantificación por Absorbancia

Para determinar la eficiencia del método de extracción mediante cuantificación del ADN extraído y conocer la pureza del mismo, se realizaron medidas de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5.

La concentración de ADN se calculó mediante la siguiente ecuación:

$\text{Conc. ADN (ug/mL): Abs.}_{260 \text{ nm}} \times 50^* \times \text{factor de dilución de la muestra}$
--

(\*: a una longitud de onda de 260 nm, el coeficiente de extinción para el ADN doble hebra es  $0.020 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , por lo que 1 densidad óptica (OD) corresponde a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  para el ADN doble hebra.)

Para visualizar la calidad del ADN, 5 uL de cada ADN extraído fueron sembrados en un gel de agarosa 0.8% (Figura 2) donde se realizó una corrida electroforética a 100 volts.

Como estimación de la pureza del ADN, se evaluó la relación entre la medida de absorbancia a 260 y 280 nm (Tabla 6), teniendo en cuenta que los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas tienen su máxima absorptividad a 280 nm. Aquellas muestras cuya relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$  estuvo entre 1,8-2,0 fueron considerados adecuados para la realización de los ensayos.

#### Análisis de la presencia de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> por PCR.

La búsqueda de los diferentes genes se realizó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) mediante el uso de cebadores específicos para cada familia de betalactamasa, utilizados de rutina por el equipo de investigación que integro.

Se empleó el ADN genómico extraído mediante la técnica descrita anteriormente. Se trabajó con 10 a 40 ng de ADN por reacción.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un equipo termociclador automático (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 2400). Se utilizó una única mezcla de reacción de volumen final 25 uL con la siguiente composición:

Buffer 10x	2.50 uL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 uL
Cebador a 50 uM	0.50 uL
Cebador b 50 uM	0.50 uL
dNTPs 40 mM	0.50 uL
Taq Polimerasa 5 UE/mL (Bioline)	0.25 uL
Agua miliQ	19.0 uL
ADN	1.00 uL

Tabla 3: Cebadores utilizados para la amplificación de los genes codificantes de las enzimas CTX-M, TEM y SHV.

Enzima	Cebador	Secuencia del cebador (5´-3´)	Temperatura melting (°C)	Producto esperado (pb)	Referencia
CTX-M	CTX-M A1	d SCSATGTGCAGYACCAAGTAA	61	543	Hans-Jürg Monstein et al., 2009.
	CTX-M A2	d CCGCRATATGRTTGGTGGTG	62		
TEM	TEM F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	52	1079	Ling MA et al., 2005
	TEM R	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	60		
SHV	SHV F	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	56	885	Ling MA et al., 2005
	SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	56		

Los cebadores fueron brindados por la Cátedra de Microbiología.

- ◆ Ciclo de PCR para *bla*<sub>CTX-M</sub>: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillado a 55°C durante 30 segundos, elongación a 72°C durante 1 minuto. Extensión final a 72°C durante 5 minutos. El control positivo utilizado fue la cepa 12836.
- ◆ Ciclo de PCR para *bla*<sub>TEM</sub>: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, anillado a 46°C durante 45 segundos, elongación a 72°C durante 1 minuto y extensión final a 72°C durante 10 minutos. El control positivo usado fue la cepa 100103.
- ◆ Ciclo de PCR para *bla*<sub>SHV</sub>: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, anillado a 45°C durante 1 minuto, elongación a 72°C durante 1 minuto y extensión final a 72°C durante 5 minutos. El control positivo usado fue una cepa Argentina con SHV-2 detectada.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis convencional en geles de agarosa 0.8%, teñidos con Bromuro de Etidio (0,6 mg/mL) a 100 volts. En cada caso se sembraron 5 µL del producto obtenido mezclado con 1 µL de buffer de carga 6x, conteniendo azul de bromofenol y glicerol. Se utilizó un

marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) con un rango de 250 a 10000 pb. Se documentaron los resultados obtenidos mediante fotografía a través de luz UV.

#### Control de inhibición: ARNr 16s

Todas las muestras de ADN fueron evaluadas por una reacción de control de inhibición, por amplificación del gen codificante del ARNr 16s, con el uso de los cebadores 27f (5´AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´) y 1492r (5´ACGGYTACCTTGTTACGACTT 3´). El ciclo de reacción de la PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, anillado a 55°C durante 1 minuto, elongación a 72°C durante 3 minutos y extensión final a 72°C durante 7 minutos. El control positivo empleado fue *E.coli* R388. La visualización de los productos se realizó como se comentó anteriormente.

#### Secuenciación de los productos de PCR

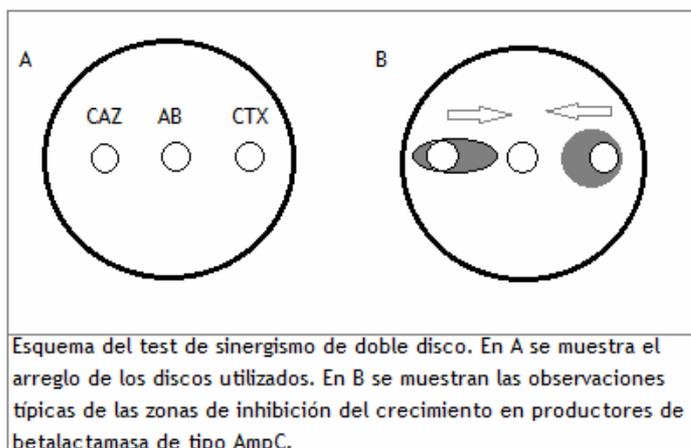
Se seleccionaron aquellas muestras de amplificación que mostraron un único producto de amplificación del tamaño esperado, para su posterior purificación y secuenciación por la empresa Macrogen Inc. (Korea)

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") del "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### Detección fenotípica de cepas productoras de betalactamasas de tipo AmpC.

A las cepas que presentaron resistencia frente a cefoxitín se les realizó un test de sinergia de doble disco entre CAZ y CTX con AB (ácido borónico) (Yagi *et al*, 2004). En una placa de MHA inoculada con la suspensión bacteriana, se colocó un disco de AB (300 ug). Otros dos discos conteniendo 30 ug de CAZ y 30 ug CTX fueron colocados a una distancia de 18 mm centro a centro del disco de AB. La placa fue incubada a 37°C durante 18 hs.

Un agrandamiento del halo de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de CAZ y CTX hacia el disco de AB (como se muestra en el esquema a continuación) se interpreta como posible presencia de AmpC.



### Identificación molecular de aislamientos productores de carbapenemasas de tipo KPC.

Se analizó la presencia de carbapenemasas en los aislamientos que presentaron un halo de inhibición a ertapenem menor o igual a 21 mm, siguiendo la Norma de la NCCLS 2010. Como control del ensayo de antibiograma se utilizó la cepa *E.coli* ATCC 25922.

Para dichos aislamientos se realizó una reacción de PCR (Endimiani *et al.*, 2008) con el fin de detectar la presencia del gen *bla*<sub>KPC</sub>. Los cebadores y las condiciones de la reacción se detallan en la tabla 4. La mezcla de reacción utilizada fue la misma comentada en la sección anterior.

Tabla 4: Ciclo de PCR para *bla*<sub>KPC</sub>

Gen codificante de la carbapenemasa KPC	Cebador	Secuencia del cebador (5´-3´)	Producto esperado (pb)	Referencia
<i>bla</i>	KPC F KPC R	ATGTCACTGTATCGCCGTC TTACTGCCCGTTGACGCC	882	Endimiani, Carias <i>et al.</i> , 2008.

- ◆ Ciclo de PCR para *bla*<sub>KPC</sub>: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillado a 58°C durante 30 segundos, elongación a 72°C durante 30 segundos. Un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Referidos a objetivos 1 (presunción de la presencia de BLEE y de otras betalactamasas basado en el perfil de sensibilidad a distintas C3G), 2 (confirmación fenotípica de cepas productoras de BLEE) y 4 (detección fenotípica de cepas productoras de betalactamasas de tipo AmpC)

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la interpretación de las mediciones de los halos de inhibición para la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), C3G como ceftazidima (CAZ), cefotaxime (CXT) y cefoxitín (FOX). En la figura 3 se muestra el resultado de un antibiograma sembrado por el método de difusión en agar. Como control de calidad de la técnica se utilizó la cepa *E.coli* ATCC 25922, que presentó halos dentro de límites aceptables para los antimicrobianos ensayados (AMP, AMC, CAZ, CTX, FOX y CPD).

Con el fin de inferir el perfil de enzimas presente en cada cepa se siguió el esquema propuesto por Livermore *et al.*, 2006. El autor de este artículo expresa que si bien para lograr una identificación precisa de las betalactamasas presentes en Enterobacterias es necesario recurrir a la secuenciación de genes o proteínas, es posible inferir el tipo de enzima producida por cierto aislamiento mediante el análisis de datos de susceptibilidad a diferentes antibióticos.

Dado que los aislamientos seleccionados para este estudio eran todos resistentes a CAZ y/o CTX, correspondía entonces confirmar fenotípicamente la presencia de una BLEE mediante el ensayo de sinergia de doble disco (figura 4).

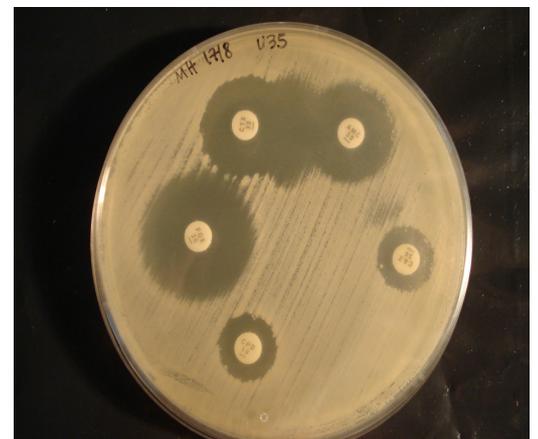


Fig.3: Antibiograma por método de difusión a partir de discos. Los antibióticos ensayados fueron: Ampicilina/Ác.clavulánico 20/10 ug (AMC), Ceftazidime 30 ug (CAZ), Cefotaxime 30 ug (CTX), Cefoxitin 30 ug (FOX) y Cefpodoxime 10 ug (CPD). Los discos fueron colocados a una distancia de 25 mm de centro a centro. La figura corresponde al aislamiento U35 (*K.pneumoniae*).

Tabla 5: Patrones de resistencia a betalactámicos en Enterobacterias seleccionadas para este estudio.

Aislamiento	Microorganismo	AMC	CAZ	CTX	FOX	CPD	Ensayo de sinergia	Interpretación según esquema de Livermore
U 01	<i>E.coli</i>	R	S	R	S	R	+	Presunta CTX-M
U 07	<i>E.coli</i>	I	S	R	S	R	+	Presunta CTX-M
H 06	<i>K.pneumoniae</i>	R	I	R	R	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M más disminución de permeabilidad
H 07	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M más disminución de permeabilidad
H 30	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 02	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 20	<i>K.pneumoniae</i>	I	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 56	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 18	<i>K.pneumoniae</i>	I	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 21	<i>K.pneumoniae</i>	I	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 03	<i>K.pneumoniae</i>	I	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 54	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
H 02	<i>K.pneumoniae</i>	I	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 14	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 35	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 19	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
H 16	<i>K.pneumoniae</i>	I	R	R	S	R	+	Presunta BLEE y/o CTX-M
U 63	<i>C.freundii</i>	R	R	R	R	R	+	Presunta AmpC cromosomal desreprimida más BLEE y/o CTX-M
U 13	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	R	R	-	Presunta AmpC cromosomal desreprimida

Aclaraciones: S sensible, R resistente, I intermedio., +: cuando se observó la sinergia.

Todos los aislamientos (a excepción de *E. cloacae*) presentaron un ensayo de sinergia positivo, pudiendo inferir la presencia de una BLEE y/o CTX-M.

Para el aislamiento U13 *E. cloacae*, se podría presumir la presencia de una enzima de tipo AmpC según el perfil de resistencia frente a los ATB ensayados. 2 de las 12 cepas de *K. pneumoniae* fueron resistentes a FOX y a AMC, demostrando un patrón de resistencia diferente al de su respectivo fenotipo salvaje o de resistencia natural, por lo que se sospecha la presencia de una BLEE junto con algún mecanismo de disminución de la permeabilidad de membrana.

Las dos cepas de *E. coli* estudiadas fueron sensibles a FOX, por lo que se descarta en ellas la presencia de una AmpC. La colocación de los discos de AMC y FOX es de gran utilidad para presumir la presencia de una betalactamasa de tipo AmpC y se correlaciona con un fenotipo intermedio o resistente a AMC (y a algunas C3G) y resistencia a FOX. (Livermore *et al.* 2008). Sobre estas dos cepas se aplicó el método de confirmación fenotípica de AmpC mediante ensayos de inhibición con ácido borónico junto con C3G y ambas cepas dieron resultados negativos en dicho ensayo (figura 5 y figura 6). El método utilizado para la confirmación fenotípica de AmpC tiene valor principalmente en aislamientos que carecen de una AmpC cromosómica natural (*klebsiella spp.*, *S. enterica*, *P. mirabilis*) o en aislados que tienen una AmpC cromosómica intrínseca no inducible (como es el caso de *E. coli*).

Es importante considerar la presencia simultánea de otros mecanismos de resistencia a betalactámicos que cooperan para alcanzar un fenotipo de resistencia a las cefamicinas (FOX). La resistencia a FOX y AMC podría deberse al efecto sinérgico entre la producción de BLEE y un mecanismo de disminución de la permeabilidad de membrana, mediado por disminución o pérdida en la expresión de porinas.

Los aislamientos de *E. cloacae* y *C. freundii* de este estudio mostraron un patrón de resistencia diferente al salvaje, ya que fueron resistentes a CTX. Por este motivo se sospechó la presencia de AmpC cromosomal desreprimida, que deberá confirmarse por métodos moleculares.

Debido a la presencia natural de AmpC cromosómica inducible en aislamientos de *E. cloacae* y *C. freundii*, el fenotipo salvaje se corresponde con un patrón

de resistencia como sigue: resistencia a FOX, AMC, Cefalzolina y sensibilidad a Ticarcilina y CTX. Por lo tanto la presencia de un AmpC cromosomal desreprimida quedaría enmascarada, ya que también se corresponde con un fenotipo de resistencia a FOX. Sin embargo un perfil de resistencia a ticarcilina y CTX sugiere una AmpC cromosomal desreprimida.



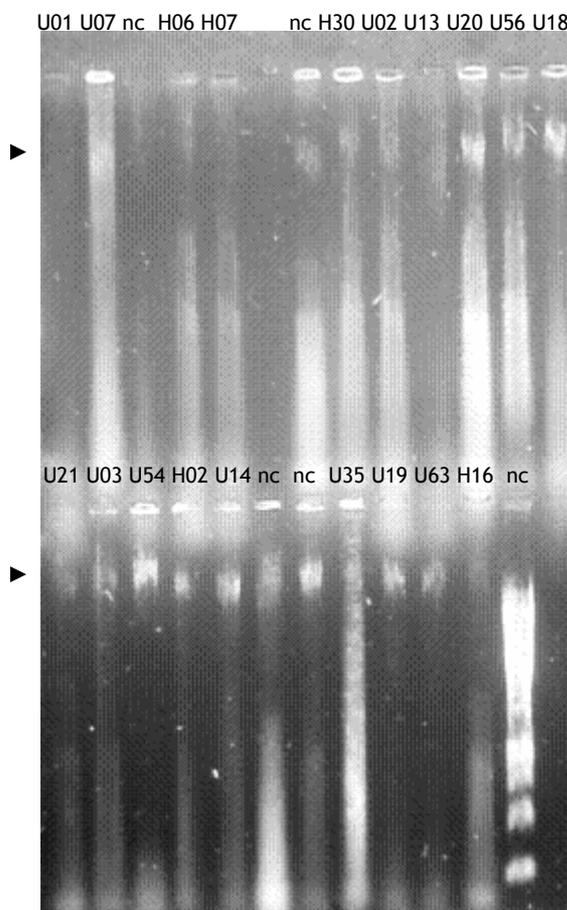
**Fig.5:** Resultado del test para la cepa U13 (*E. cloacae*). El disco en el centro es el que contiene el AB, a la izquierda se encuentra el disco de CAZ y a la derecha el de CTX. Se observa expansión de la zona de inhibición del crecimiento desde el



**Fig.6:** Resultado del test para la cepa U63 (*C. freundii*). El disco en el centro es el que contiene el AB, a la izquierda se encuentra el disco de CTX y a la derecha el de CAZ. Se observa una clara expansión de la zona de inhibición del crecimiento desde el disco de CAZ hacia el de AB (flecha) y una expansión dudosa en la sinergia entre CTX y AB (punta de flecha).

Para la identificación y caracterización molecular de BLEE, sobre los 18 aislamientos productores de BLEE (2 *E.coli*, 15 *K.pneumoniae*, 1 *C.freundii*) se estudió la presencia de las familias de BLEE más frecuentemente detectadas en nuestra región como son las del tipo TEM, SHV y CTX-M. Esto se realizó mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación, para la identificación de las variantes genéticas para cada familia de BLEE.

En la Figura 7 se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la extracción de ADN genómico total de las cepas en estudio. A partir del mismo se puede inferir acerca de la integridad de los productos de extracción.



**Fig.7:** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% donde se sembraron 5 uL de todos los aislamientos en estudio. Las puntas de flecha indican la posición en el gel donde se observan bandas correspondientes al ADN extraído. En ciertos carriles se sembraron aislamientos que no corresponden al presente estudio (“nc”).

Se determinó la concentración de ADN extraído por medidas de Absorbancia a 260 y 280 nm, y se calculó el cociente entre ambas medidas para definir la calidad de las muestras de ADN (tabla 6). Se seleccionaron las muestras de ADN que mostraron un cociente mayor a 1.5 para ser utilizadas como molde de ADN para las futuras amplificaciones. Basado en la concentración de ADN obtenida se procedió a diluir la muestra hasta lograr una concentración entre 10-40 ug de ADN.

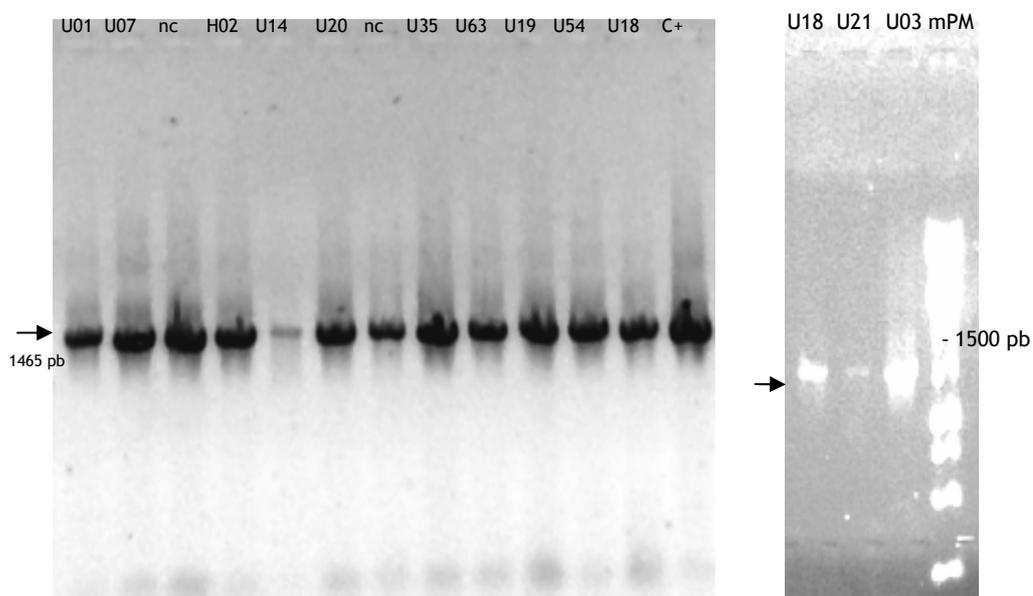
Tabla 6: Medidas de absorbancia y cálculo de concentración de ADN.

Cepa BLEE +	Microorganismo	Abs.260	Abs.280	260/280	Conc. ADN ug/mL	Factor de dilución
U 01	<i>E.coli</i>	0.635	0.328	1.94	318	1/10
U 07	<i>E.coli</i>	0.776	0.401	1.93	388	1/10
H 06	<i>K.pneumoniae</i>	0.395	0.217	1.82	197.5	1/10
H 07	<i>K.pneumoniae</i>	0.527	0.281	1.87	263.5	1/10
H 30	<i>K.pneumoniae</i>	0.571	0.378	1.51	285.5	1/10
U 02	<i>K.pneumoniae</i>	0.253	0.123	2.00	126.5	1/5
U 20	<i>K.pneumoniae</i>	0.738	0.407	1.81	369	1/10
U 56	<i>K.pneumoniae</i>	0.985	0.524	1.88	492.5	1/10
U 18	<i>K.pneumoniae</i>	0.419	0.220	1.90	209.5	1/10
U 21	<i>K.pneumoniae</i>	0.303	0.149	2.03	151.5	1/5
U 03	<i>K.pneumoniae</i>	0.350	0.173	2.02	175	1/5
U 54	<i>K.pneumoniae</i>	0.327	0.174	1.88	163.5	1/5
H 02	<i>K.pneumoniae</i>	0.565	0.289	1.96	282.5	1/10
U 14	<i>K.pneumoniae</i>	0.281	0.155	1.81	140.5	1/5
U 35	<i>K.pneumoniae</i>	0.259	0.134	1.93	129.5	1/5
U 19	<i>K.pneumoniae</i>	0.516	0.279	1.85	258	1/10
H 16	<i>K.pneumoniae</i>	0.681	0.362	1.88	340.5	1/10
U 63	<i>C.freundii</i>	0.403	0.228	1.77	201.5	1/10
U 13	<i>E.cloacae</i>	0.738	0.420	1.81	369	1/10

Analizando en conjunto la figura 7 y la tabla 6 puede inferirse que se logró aislar una cantidad considerable de ADN con una calidad aceptable. Parecería que la extracción fue más efectiva para las cepas U20, U56, U18, U54, H02, U14, U19, U63 y U20; ya que en todos estos casos se visualiza una banda

bastante definida de alto peso molecular (señalada con flecha) que correspondería a ADN extraído. Existen muestras para las cuales no se observaron dichas bandas (U01, H06, H07, U13, U21 y H16) pero que al observar los valores de concentración de ADN y pureza del mismo en la tabla 6, se puede inferir que hubo extracción de ADN efectiva y que el problema radicó en el sembrado o corrida electroforética, más que en la extracción en sí. Los valores del cociente de absorbancia 260/280 nm mostraron en su mayoría que no existe en las muestras una cantidad excesiva de proteínas, ya que están en el rango comprendido entre 1.7 a 2.0. Esto sugiere que estamos en presencia de ADN de buena calidad.

Un problema común con la técnica de PCR es la falta de amplificación debido a la presencia de inhibidores de la Taq Polimerasa. Por ello, todas las muestras de ADN fueron evaluadas por una reacción de control de inhibición de amplificación del gen codificante del ARNr 16s. (Figura 8).

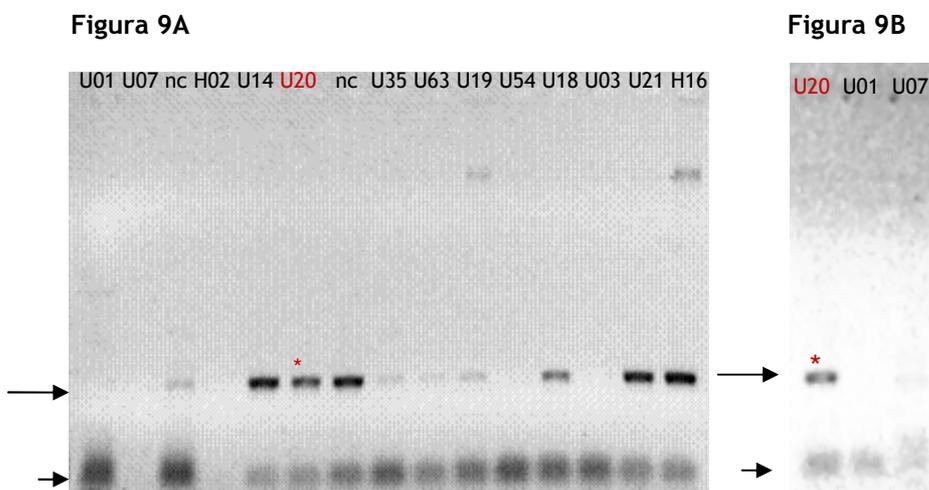


**Fig.8:** Electroforesis en geles de agarosa 0,8% de los productos de PCR para ARNr 16s. En la figura de la izquierda se señala con una flecha las bandas que corresponden al producto que tendría un tamaño de 1465 pb. Como control positivo (C+) se utilizó la cepa *K.pneumoniae* 12836. En la figura de la derecha se marca con flecha negra las bandas que aparecen donde se esperaría encontrar el producto de esta reacción de PCR y también se señala en el marcador de peso molecular, la banda que corresponde a 1500 pb, a modo de referencia visual. Los resultados para los aislamientos H06, H07, H16, U02, U56 y U13 fueron positivos (no se muestra la información). “nc” indica aislamientos que no corresponden al presente estudio.

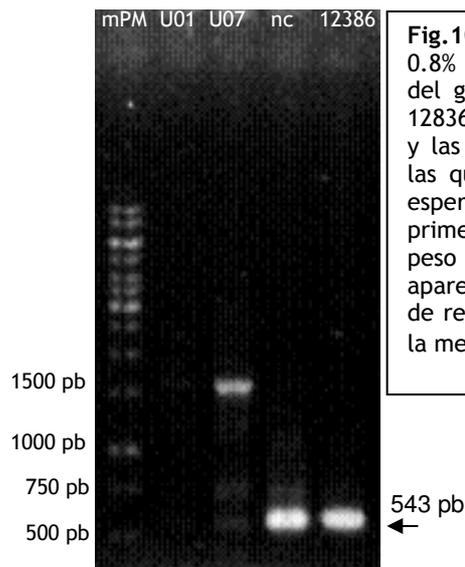
La amplificación del gen codificante del ARN16s fue positiva para todas las muestras, indicando que no presentan inhibición de la amplificación y que están aptas para ser utilizadas como molde de ADN para las reacciones por PCR.

### Análisis de la presencia de los genes $bla_{CTX-M}$ , $bla_{SHV}$ y $bla_{TEM}$ por PCR.

Familia de las CTX-M: estas enzimas son las prevalentes en América del Sur, pero se han expandido a todos los continentes. La enzima CTX-M 2 es una de las BLEE más frecuentemente hallada en Uruguay y Argentina. Por otra parte, las variantes CTX-M 8, 9, 12, 14, 15, 16, 24, 31 y 56 son las betalactamasas de tipo CTX-M más frecuentemente aisladas tanto en hospitales como en la comunidad, con gran heterogeneidad geográfica. (Cantón *et al.*, 2006; Vignoli *et al.* 2005).



**Fig.9:** Electroforesis en geles de agarosa 0.8% de los productos de amplificación del gen  $bla_{CTX-M}$ . La cepa U20 (rojo) fue utilizada como control positivo y la banda marcada con \* es la que se presume de 543 pb, tamaño esperado del producto de reacción. La flecha de mayor longitud señala la posición de las bandas que aparecen a la misma altura que la de la cepa control, la flecha corta señala las bandas correspondientes a los cebadores remanentes. En la figura A se utilizó 1 uL de ADN como molde de reacción. En la figura B se repitió la PCR para los aislamientos donde no se observó banda en la anterior agregando esta vez 2uL de ADN a la mezcla de reacción. (nc, aislamientos que no corresponden al presente estudio).



**Fig.10:** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de reacción de PCR del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>. La cepa *K.pneumoniae* 12836 fue utilizada como control positivo y las bandas señaladas con la flecha son las que se presumen de 543 pb, tamaño esperado del producto de reacción. En el primer carril se sembró un marcador de peso molecular y algunas de sus bandas aparecen con el tamaño señalado a modo de referencia. Se agregaron 2uL de ADN a la mezcla de reacción.

Se detectó un producto de amplificación cercano a 543 pb consistente y del tamaño esperado para la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en 12/15 aislamientos de *K.pneumoniae* (U14, U20, U35, U19, U18, U21, H16, H06, H07, H30, U02 y U56), 1/2 aislamiento de *E.coli* (U07), 1/1 *C.freundii* (U63).

Se obtuvieron amplicones de 750, 1500 y de más de 2000 pb que corresponderían a productos de amplificaciones inespecíficas.

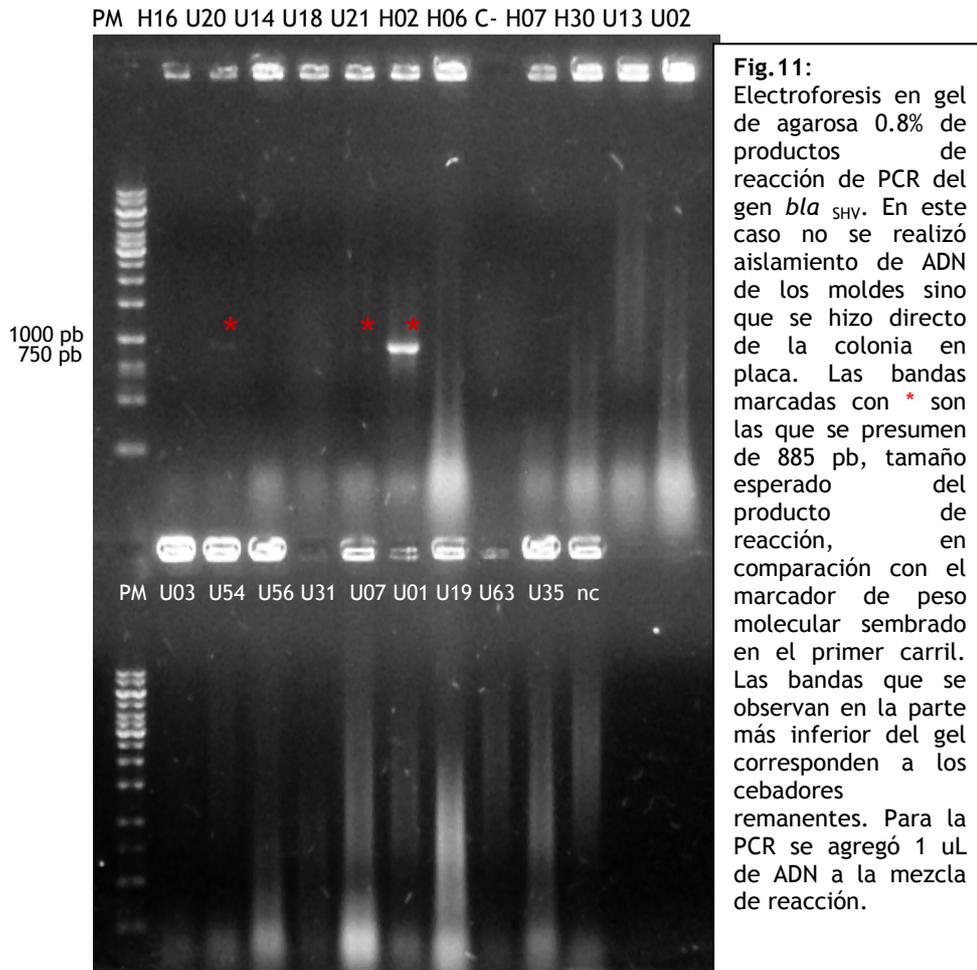
Los amplicones obtenidos fueron enviados a Macrogen para su purificación y posterior secuenciación.

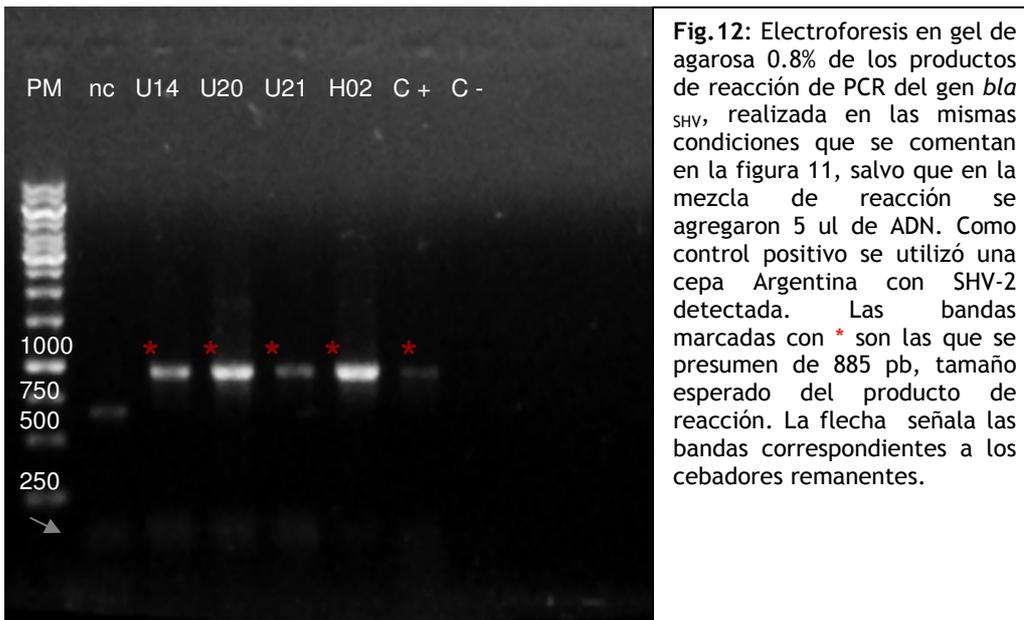
**Tabla 7:** Betalactamasas de tipo CTX-M más frecuentes en la región

Betalactamasa	Nº Acceso Gene Bank	Referencia
CTX-M-1	X92506	AAC40:509, 1996
<b>CTX-M-2</b>	<b>X92507</b>	<b>AAC40:509, 1996</b>
CTX-M-5	U95364	AAC42:1980, 1998
CTX-M-12	AF305837	AAC45:2141, 2001
<b>CTX-M-15</b>	<b>AY044436</b>	<b>FEEMS Microbiol. Letter 201:237, 2001.</b>

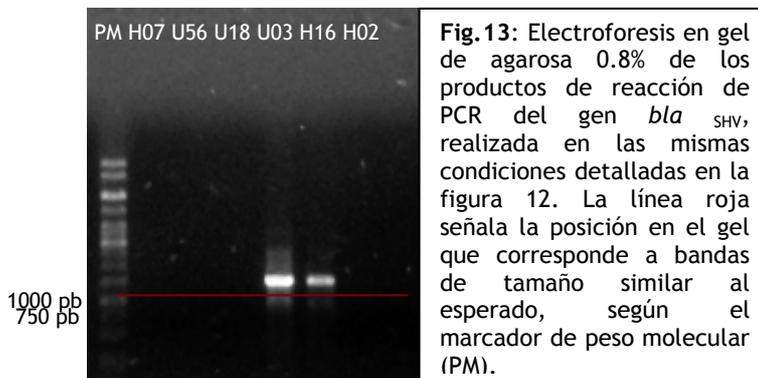
Las que aparecen resaltadas en negrita son las enzimas detectadas en el presente estudio.

Familia de las SHV: si bien la enzima SHV-1 es cromosomal e intrínseca en *K. pneumoniae*, se realizó la detección molecular de SHV en todas las cepas en estudio al considerar que enriquece el mismo y aporta a la práctica de las técnicas. Las variantes SHV-12 y 5 son las de mayor predominancia en América del Sur. (Cantón *et al.*, 2006)





**Fig. 12:** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de reacción de PCR del gen *bla<sub>SHV</sub>*, realizada en las mismas condiciones que se comentan en la figura 11, salvo que en la mezcla de reacción se agregaron 5 ul de ADN. Como control positivo se utilizó una cepa Argentina con SHV-2 detectada. Las bandas marcadas con \* son las que se presumen de 885 pb, tamaño esperado del producto de reacción. La flecha señala las bandas correspondientes a los cebadores remanentes.



**Fig. 13:** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de reacción de PCR del gen *bla<sub>SHV</sub>*, realizada en las mismas condiciones detalladas en la figura 12. La línea roja señala la posición en el gel que corresponde a bandas de tamaño similar al esperado, según el marcador de peso molecular (PM).

En este estudio se detectó amplificación del gen *bla<sub>SHV</sub>* en 6/15 aislamientos de *K.pneumoniae* (H02, U14, U20, U03, U21 y H16) y no se detectó en cepas de *E.coli*, *C.freundii* ni *E.cloacae*.

Según los datos obtenidos por secuenciación, 11 aislamientos de *K.pneumoniae* tendrían la enzima SHV, 6 serían SHV-1 y 5 serían enzimas de tipo SHV-2. Estas últimas son variantes genéticas consistentes con fenotipo de BLEE. Los cambios mutacionales específicos se muestran en la tabla 8.

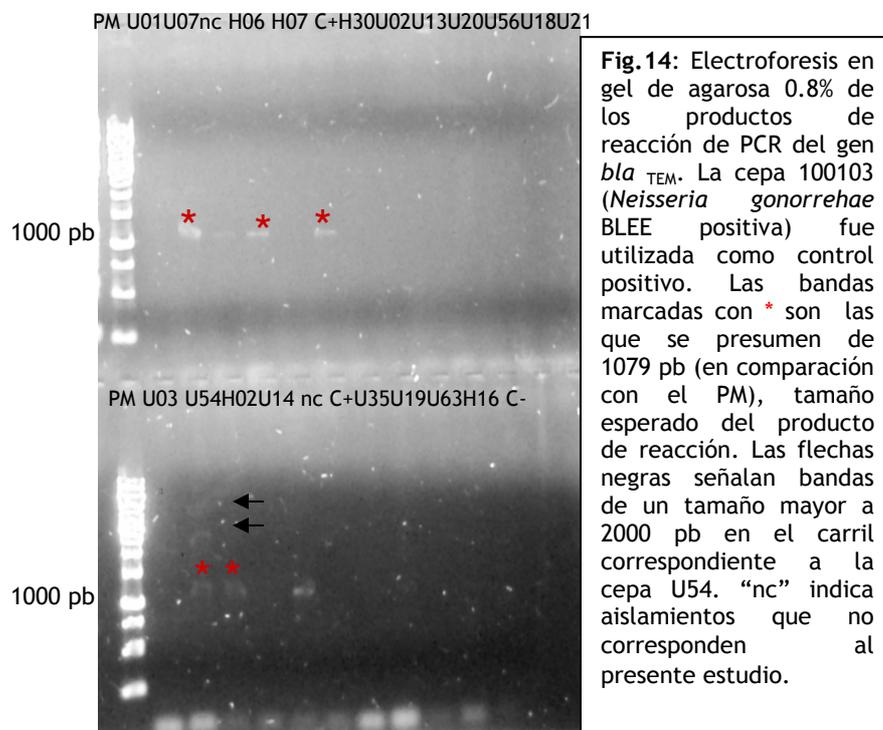
El resultado obtenido no estaría de acuerdo con lo esperado para esta especie, ya que la enzima SHV-1 es cromosomal e intrínseca en ella. Al ser cromosomal, existe una única copia del gen, por lo que podría inferirse que la falla podría estar en la concentración del molde utilizado en la reacción de PCR.

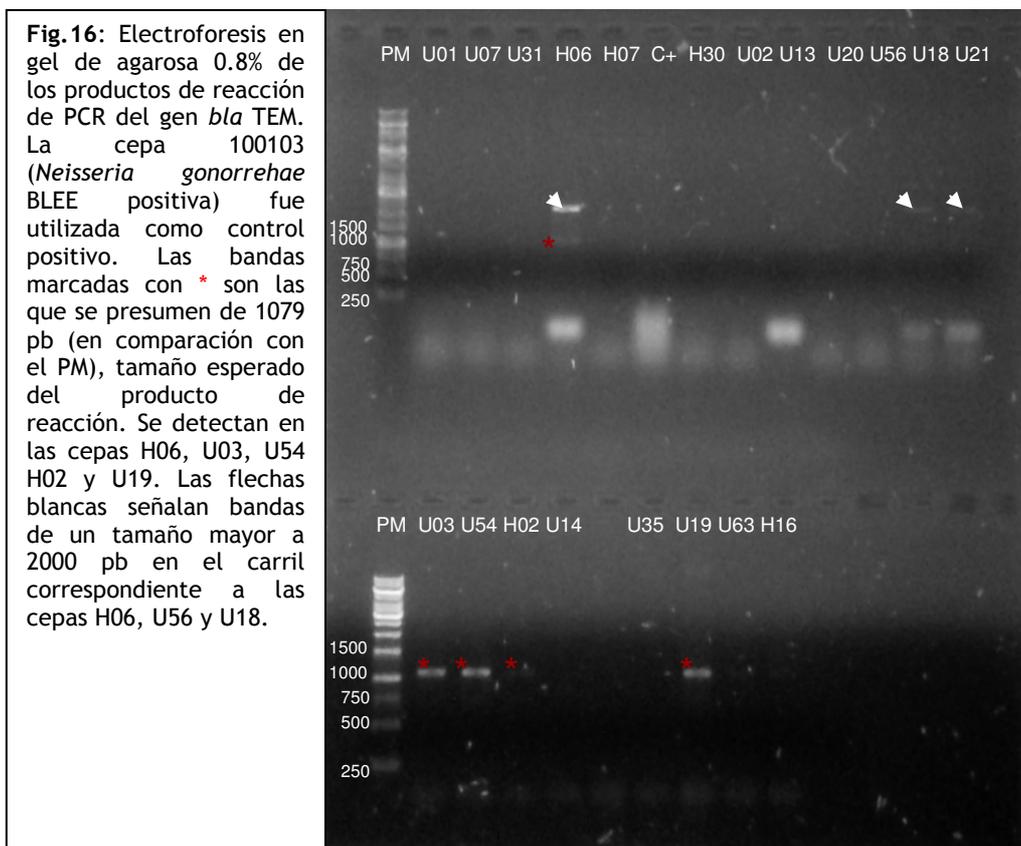
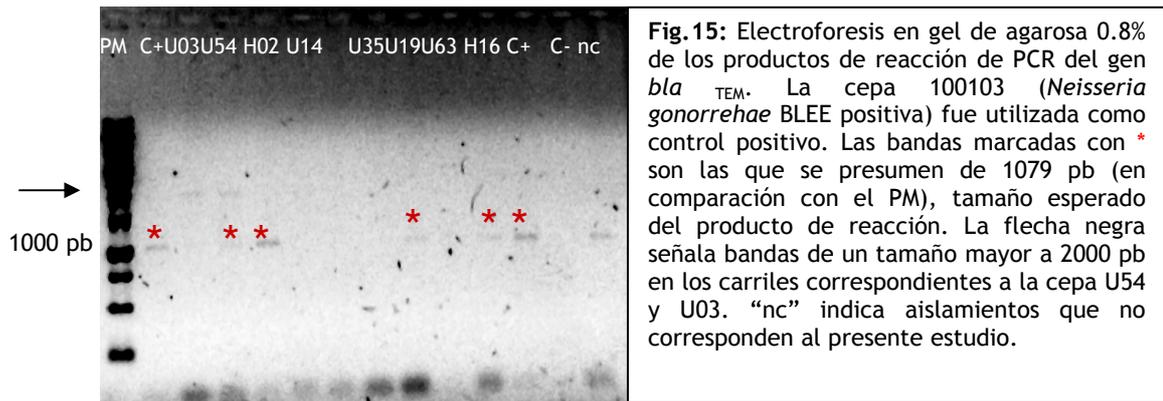
Tabla 8: Enzimas de tipo SHV más frecuentes en la región.

Beta-lactamasa	Número Acceso en Gene Bank	Nombre alternativo	Fenotipo	Referencia:	Cambio de aa en posición 35	Cambio de aa en posición 238	Cambio de aa en posición 240
SHV-1	AF148850		2b	<b>Bradford PA <i>et al.</i>, 1999.</b>	L	G	E
SHV-2	AF148851		2be	Bradford PA <i>et al.</i> , 1999.		S	
SHV-5	X55640		2be	<b>Billot-Klein, D. <i>et al.</i>, 1990.</b>		S	K
SHV-12		SHV-5-2a	2be	Nuesch-Inderbilen MT <i>et al.</i> , 1997.	Q	S	K

Se presentan los cambios aminoacídicos más relevantes en cada una de las enzimas. Las que aparecen resaltadas en negrita son las enzimas detectadas en el presente estudio.

Familia de las TEM: el primer reporte de una enzima de tipo TEM en América del Sur fue realizado por Paterson *et al.* en el año 2003. Las variantes genéticas TEM 10 y 26 son las más frecuentemente detectadas en nuestra región, aunque no son de las más prevalentes. (Paterson *et al.* 2003)





Se detectó amplificación del gen *bla*<sub>TEM</sub> en 6/15 aislamientos de *K.pneumoniae* (H02, U54, H06, U03, U19 y H16), 1/2 aislamientos de *E.coli* (U07). No fue detectada en aislamientos de *C.freundii* ni *E.cloacae*.

Por secuenciación sólo se obtuvieron datos de 4/8 de los aislamientos con genes *bla*<sub>TEM</sub> detectados, todos en *K.pneumoniae*. Todos son codificantes de la betalactamasa plasmídica TEM-1.

**Tabla 9:** Enzimas de tipo TEM más frecuentes en la región.

Beta-lactamasa	Número Acceso en Gene Bank	Nombre alternativo	Fenotipo	Referencia:	Cambio de aa en posición 39	Cambio de aa en posición 104	Cambio de aa en posición 164	Cambio de aa en posición 240
<b>TEM-1</b>	<b>J01749</b>	<b>RTEM-1</b>	<b>2b</b>	<b>Dalta N. <i>et al.</i>, 1965.</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>E</b>
TEM-2	X54606		2b	Matthew M. <i>et al.</i> , 1976.	K			
TEM-10	AF093512	TEM-23	2be	Quinn JP. <i>et al.</i> , 1989.			S	K
TEM-26		YOU-1	2be	Naumovski L. <i>et al.</i> , 1992.	K	K	S	

Las que aparecen resaltadas en negrita son las enzimas detectadas en el presente estudio.

## SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS.

Algunos de los cromatogramas obtenidos y los análisis de las secuencias mediante la herramienta BLAST para las enzimas TEM y SHV se muestran en el Anexo. A continuación se presentan dos tablas (10 y 11) con los resultados de la secuenciación de los productos de PCR obtenidos.

**Tabla 10: Correlación de resultados obtenidos por PCR y posterior secuenciación, en comparación con lo que se presumió según esquema de Livermore.**

Microorganismo	Aisl.	Livermore	bla CTX-M	Seq.	bla SHV	Seq.	bla TEM	Seq.
<i>E. coli</i>	U01	CTX-M	No	no	no	No	no	No
<i>E. coli</i>	U07	CTX-M	Si	ss	no	No	si	Ss
<i>K.pneumoniae</i>	H06		Si	ss	no	SHV-1	si	TEM-1
<i>K.pneumoniae</i>	H07		Si	ss	no	No	si	Ss
<i>K.pneumoniae</i>	H30	BLEE/CTX-M	Si	ss	no	SHV-1	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U02	BLEE/CTX-M	Si	ss	no	SHV-1	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U20	BLEE/CTX-M	Si	ss	si	SHV-5	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U56	BLEE/CTX-M	Si	ss	no	No	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U18	BLEE/CTX-M	Si	CTX-M 2	no	Ni	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U21	BLEE/CTX-M	Si	CTX-M 15	si	SHV-1	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U03	BLEE/CTX-M	No	no	si	SHV-5	si	TEM-1
<i>K.pneumoniae</i>	U54	BLEE/CTX-M	No	no	no	SHV-5	si	TEM-1
<i>K.pneumoniae</i>	H02	BLEE/CTX-M	No	no	si	SHV-5	si	Ss
<i>K.pneumoniae</i>	U14	BLEE/CTX-M	Si	CTX-M 15	si	SHV-1	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U35	BLEE/CTX-M	Si	ss	no	No	no	No
<i>K.pneumoniae</i>	U19	BLEE/CTX-M	Si	ss	no	SHV-5	si	TEM-1
<i>K.pneumoniae</i>	H16	BLEE/CTX-M	Si	CTX-M 15	si	SHV-1	si	Ss

Si/no: según se haya observado banda en la electroforesis del producto de reacción de PCR, ss: productos de PCR que fueron enviados para su secuenciación pero no se obtuvo secuencia.

El perfil de enzimas BLEE detectado en *E.coli* U01 fue diferente al inferido siguiendo el esquema de Livermore, ya que no se detectó la familia CTX-M, así como tampoco BLEE de las familias TEM o SHV. Para este aislamiento sería necesario investigar la presencia de otras BLEE menos frecuentes en la región, como podría ser el caso de la enzima PER-2. (Vignoli *et al.* 2005)). Para el resto de los aislamientos hubo consistencia con el autor, detectándose tanto ceftazidimasas (SHV-5) y/o cefotaximasas (CTX-M 2 y CTX-M 15). Cabe destacar que 15/18 aislamientos presentaron la enzima CTX-M, lo que estaría en concordancia con los datos publicados en la región (Cantón *et al.*, 2006). No se detectaron BLEE de la familia TEM. Si bien este estudio comprendió un bajo número de aislamientos, este hallazgo sería consistente con la baja prevalencia de esta enzima en nuestro medio.

Tabla 11: Esquema de resultados obtenidos por secuenciación, agrupados por familia de BLEE

CTX-M		SHV		TEM	
Aislamiento	BLAST	Aislamiento	BLAST	Aislamiento	BLAST
U14	CTX-M15	U03	SHV-5	H06	TEM-1
H16	CTX-M15	H16	SHV-1	U03	TEM-1
U21	CTX-M15	H06	SHV-1	U54	TEM-1
U18	CTX-M2	H30	SHV-1	U19	TEM-1
		U02	SHV-1	U63	Ss
		U18	Ss	H16	Ss
		U21	SHV-1	H02	Ss
		U54	SHV-5	U07	Ss
		U19	SHV-5		
		U63	Ss		
		U14	SHV-1		
		U20	SHV-5		
		H02	SHV-5		

Se utilizó un código de colores para visualizar más fácilmente aquellos aislamientos que presentan más de un tipo de enzima. "ss" (sin secuencia) corresponde a casos en los que no se pudieron obtener resultados de la secuenciación.

Debe ser tenido en cuenta el hecho de que un mismo microorganismo pueda albergar combinaciones de betalactamasas y BLEE descritas en este estudio, que pueden alterar el fenotipo de resistencia a antibióticos. En este estudio,

10 aislamientos (en su mayoría *K.pneumoniae*) serían portadores de varios genes codificantes de betalactamasas. Este resultado está de acuerdo con el conocimiento que se tiene de que dicho microorganismo posee gran capacidad de acumular y transferir determinantes de resistencia. (Malouin *et al*, 1995).

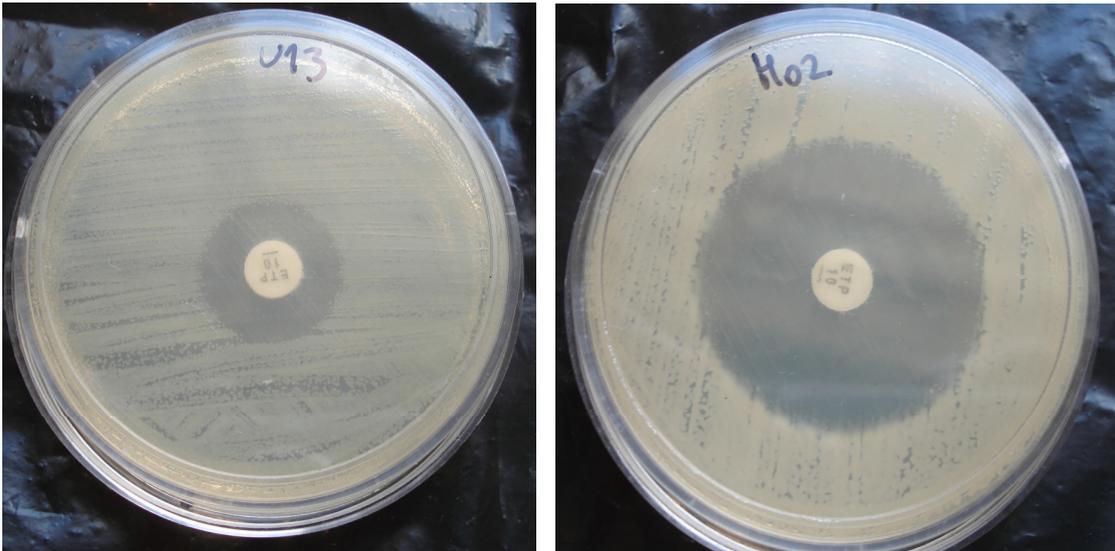
## DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS DE TIPO KPC.

Las betalactamasas que hidrolizan carbapenemes han sido raramente documentadas en aislamientos de la familia *Enterobacteriaceae*, pero el grupo particular de las KPC ha sido cada vez más reportadas en varios patógenos, incluidos *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter spp.* y *Salmonella entérica* (Endimiani *et al.*2006). Ya que estos aislamientos son resistentes a virtualmente todos los antibióticos comúnmente utilizados, el control de esta propagación es crucial. Por estos motivos se consideró de gran importancia realizar su búsqueda en este trabajo.

Tabla 12: Ensayo de sensibilidad frente a Ertapenem

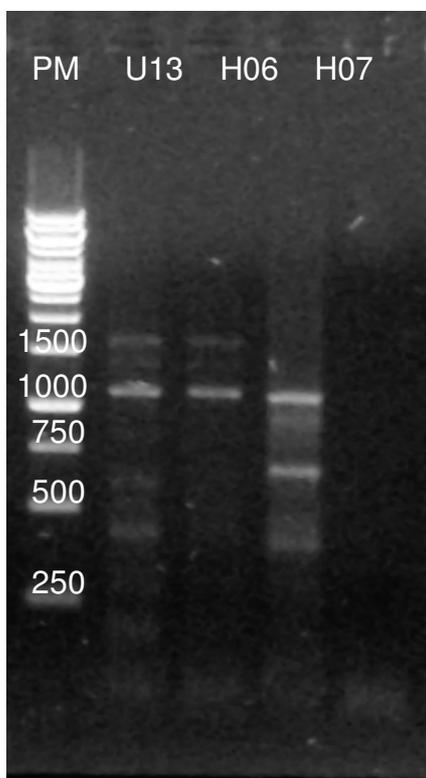
Aislamiento	Halo ETP (mm)
U01	32
U07	32
U31	28
H06	14
H07	14
H30	28
U02	26
U13	14
U20	26
U56	24
U18	28
U21	28
U03	28
U54	28
H02	28
U14	28
U35	32
U19	36
U63	32
H16	28

Disco de Ertapenem (10 ug). Como control se utilizó la cepa *E.coli* ATCC 25922 (halo 34 mm). Los aislamientos señalados en rojo presentaron reducida susceptibilidad frente al antimicrobiano (halo de inhibición menor o igual a 21 mm), para ellos se realizó una reacción de PCR con el fin de detectar la presencia del gen *bla*<sub>KPC</sub>. Según norma NCCLS. 2010 (M100. S22. tabla 2A



**Fig.19:** Test de difusión en agar a partir de disco para la detección de cepas productoras de carbapenemasas. En ambos casos se inoculó la placa con la cepa en estudio y luego se colocó un disco de ertapenem 10 ug en el centro. En la figura de la izquierda (cepa U13 *E.colocae*) el halo de inhibición medido fue de 14 mm. Al ser menor que 22 mm, se considera a esta cepa posible productor de carbapenemasa. En la figura de la derecha (H02 *K.pneumoniae*) el halo fue de 28 mm, por lo que no se considera posible productor de carbapenemasa

### PCR del gen *bla*<sub>KPC</sub>.



**Fig.20:** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de reacción de PCR del gen *bla* KPC. El tamaño esperado del producto de reacción era de 882 pb.

No se detectó amplificación del gen *bla* KPC en ninguno de los aislamientos en estudio por PCR.

Cabe destacar que los aislamientos H06 y H07 (*K.pneumoniae*) presentaron un fenotipo de resistencia que estaría explicado por la combinación de enzima BLEE más impermeabilidad de membrana. Este último mecanismo podría ser el responsable de la resistencia observada a ertapenem.

## CONCLUSIÓN GENERAL

La primer parte del presente trabajo se basó en la lectura interpretativa de antibiogramas para predecir la presencia de enzimas que confieren resistencia a los antimicrobianos betalactámicos ensayados. El conocimiento y puesta a punto de los diferentes métodos existentes es indispensable en el ámbito de Laboratorios Clínicos de nuestro país, ya que en su gran mayoría utilizan ensayos fenotípicos y no moleculares para la detección de dichos mecanismos de resistencia. A través del esquema modificado de Livermore se hicieron predicciones que habrían sido mayormente confirmadas por PCR y por secuenciación. Sin embargo en varios casos no se detectaron enzimas que pudieran responder por los perfiles de resistencias hallados fenotípicamente y es en este punto donde se debe tener en cuenta que una de las limitaciones más importantes de la lectura interpretativa de antibiogramas deriva de la propia complejidad de los mecanismos de resistencia, sobre todo en bacterias que presentan varios mecanismos de resistencia. Este fenómeno de multirresistencia incide en el hecho de que una bacteria resistente tiene mayor probabilidad de acumular mayor número de mecanismos de resistencia. Por ejemplo, se ha constatado con frecuencia que las cepas de *K. pneumoniae* con BLEE suelen tener deficiencias en sus porinas, que otras Enterobacterias con BLEE también producen resistencia a los aminoglucósidos (por producción de metilasas o enzimas modificantes de aminoglucosidos) y a quinolonas (asociadas a genes transferibles en plásmidos), la presencia simultánea de varias BLEE en el mismo aislamiento, la producción de BLEE en Enterobacterias con metalobetalactamasas, entre otras. Por otra parte, la presencia de mecanismos de resistencia intrínsecos puede enmascarar la

detección de otros mecanismos, tal y como sucede en los bacilos gramnegativos no fermentadores.

El conocimiento genético de los mecanismos asociados a la multirresistencia no da respuestas interpretativas en el antibiograma. La aplicación de las técnicas moleculares puede parcialmente resolver este problema, aunque la presencia de un determinante de resistencia no implica por sí mismo su expresión y, por tanto, la resistencia fenotípica.

Las limitaciones de la lectura interpretativa pueden también agravarse por la necesidad de que varios mecanismos estén presentes en una misma bacteria para que se manifieste fenotípicamente la resistencia.

Igualmente, la expresión de los mecanismos de resistencia puede variar drásticamente conforme la bacteria en la que se presente.

Estos hechos pueden impedir el reconocimiento de determinados mecanismos y redundar en su mayor diseminación.

Por último, se debe destacar que la simplificación en el análisis interpretativo puede limitar la identificación de nuevos mecanismos, ya que puede darse por supuesta la presencia de un determinado mecanismo de resistencia ante un fenotipo concreto y no explorarse otras posibilidades.

La más importante tendencia que afecta actualmente el uso de los antibióticos betalactámicos es la diseminación de las BLEE de tipo CTX-M en Enterobacterias. Este cambio junto con el rápido crecimiento de la resistencia a carbapenemes por enzimas KPC y enzimas VIM en *Pseudomonas spp.* llevará al uso más temprano y más amplio de los antibióticos considerados la última reserva de los betalactámicos. Por estas razones es de vital importancia continuar con estudios de vigilancia como los presentados en este trabajo, para conocer la realidad en nuestra región, teniendo en cuenta la combinación de la caracterización fenotípica y genotípica.

## BIBLIOGRAFIA

- Podschun R., y Ullmann U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.*, 11(4), 589-603.
- Chanawong A., M'Zali F. H., Heritage J., Lulitanond, A. y Hawkey P. M. (2001). SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother*, 48(6), 839-852.
- Livermore D. M., y Hawkey P. M. (2005). CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 56(3), 451-454. doi: 10.1093/jac/dki239.
- Landman D., Bratu S., Kochar S., Panwar M., Trehan M., Doymaz M., y Quale, J. (2007). Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother*, 60(1), 78-82. doi: 10.1093/jac/dkm129.
- Gales A. C., Castanheira M., Jones R. N., y Sader, H. S. (2012). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73(4), 354-360. doi: 10.1016/j.diagmicrobio. 2012.04.007.
- Sader H. S., Jones R. N., Gales A. C., Silva J. B., y Pignatari A. C. (2004). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis*, 8(1), 25-79. doi: /S1413- 86702004000100004.
- Bush K., Jacoby G. A. y Medeiros A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(6), 1211-1233.
- Ambler R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036), 321-331.
- Jaurin B. y Grundstrom T. (1981). AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(8), 4897-4901.
- Ouellette M., Bissonnette L., y Roy P. H. (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21), 7378-7382.
- Bush K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(3), 259-263.
- Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 161-182, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00036-08.
- Bush K. y Jacoby G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- González-Escalante, E. (2012). Metalo-β-lactamasas: ¿el fin de los β-lactámicos? *Revista Peruana de Epidemiología*, 16(3), 1-8.

- Paterson D. L. y Bonomo R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 657-686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- Sougakoff W., Goussard S., Gerbaud G., y Courvalin P. (1988). Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis*, 10(4), 879-884.
- Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., y Mitsuhashi S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315-317.
- Canton R., y Coque T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 466-475. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Bauernfeind A., Grimm H., y Schweighart S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18(5), 294-298.
- LAHEY. (October 29th, 2014).  $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes Retrieved September 16th, 2014, from <http://www.lahey.org/Studies>
- Canton R., González-Alba J. M. y Galán J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*, 3, 110. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110
- Rodriguez M. M., Power P., Radice M., Vay C., Famiglietti A., Galleni M., Gutkind G. (2004). Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4895-4897. doi: 10.1128/AAC.48.12.4895-4897.2004
- Livermore D. M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G. M., Arlet G., Woodford N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 59(2), 165-174. doi: 10.1093/jac/dkl483
- Canton R., y Ruiz-Garbajosa P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*, 11(5), 477-485. doi: 10.1016/j.coph.2011.07.007
- Marquez C., Labbate M., Raymondo C., Fernandez J., Gestal A. M., Holley M., Stokes, H. W. (2008). Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3417-3425. doi: 10.1128/JCM.00835-08
- Roy Chowdhury P., Ingold A., Vanegas N., Martinez E., Merlino J., Merkier A. K., Stokes H. W. (2011). Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(7), 3140-3149. doi: 10.1128/AAC.01529-10
- Vignoli R., Cordeiro N., Seija V., Schelotto F., Radice M., Ayala J., Gutkind G. (2006). Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay. *Rev Argent Microbiol*, 38(2), 84-88.

- Bado I., Cordeiro N. F., Robino L., Garcia-Fulgueiras V., Seija V., Bazet C., Vignoli R. (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. *Int J Antimicrob Agents*, 36(5), 453-458. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042
- Damjanova I., Toth A., Paszti J., Hajbel-Vekony G., Jakab M., Berta, J., Fuzi M. (2008). Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSAs'? *J Antimicrob Chemother*, 62(5), 978-985. doi: 10.1093/jac/dkn287
- Garcia-Fulgueiras V., Bado I., Mota M. I., Robino L., Cordeiro N. F., Varela A., Vignoli R. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*, 66(8), 1725-1729. doi: 10.1093/jac/dkr222
- Oteo J., Delgado-Iribarren A., Vega D., Bautista V., Rodriguez M. C., Velasco M., Campos J. (2008). Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int J Antimicrob Agents*, 32(6), 534-537. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.012
- Vranic-Ladavac M., Bosnjak Z., Beader N., Barisic N., Kalenic S., y Bedenic B. (2010). Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *J Med Microbiol*, 59(Pt 9), 1069-1078. doi: 10.1099/jmm.0.019778-0
- Ochman H., Lawrence J. G., y Groisman E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304. doi: 10.1038/35012500
- Walsh T. R. (2006). Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 476-482. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.009
- Carvalho A. P., Albano R. M., de Oliveira D. N., Cidade D. A., Teixeira L. M., y Marques Ede, A. (2006). Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase *Página | 122* in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist*, 12(2), 103-108. doi: 10.1089/mdr.2006.12.103
- Sader H. S., Reis A. O., Silbert S., y Gales A. C. (2005). IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*, 11(1), 73-76. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01031.x
- Nordmann P., Cuzon G., y Naas T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9(4), 228-236. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4
- Landman D., Bratu S., y Quale J. (2009). Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*, 58(Pt 10), 1303-1308. doi: 10.1099/jmm.0.012575-0
- Nordmann P., y Poirel L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*, 8(6), 321-331.

- Poirel L., Heritier C., Tolun V., y Nordmann P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(1), 15-22.
- Queenan A. M., y Bush K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20(3), 440-458, table of contents. doi: 10.1128/CMR.00001-07.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2010). Clinical and Laboratory Standards Institute (950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 /customerservice@clsi.org)