

Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo- Perú.

Detection of SHV, TEM and CTX-M genes in extended spectrum β -lactamase (ESBL) *Escherichia coli* in a Hospital in Chiclayo- Peru.

Zhandra Arce-Gil^{1,a,b}, José Llontop-Nuñez^{1,a}, Edwin Alarcón-Benavides^{1,a}, Elmer López-López^{1,a}

RESUMEN

Objetivo: Determinar la presencia de genes TEM, SHV y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), aisladas de un Hospital de Chiclayo. **Materiales y Métodos:** Estudio de tipo descriptivo transversal, con muestreo por conveniencia. **Resultados:** 50 cepas de *E. coli* fueron aisladas de 04 áreas de hospitalización. Todas fueron confirmadas fenotípicamente como productoras de BLEE. A nivel molecular, utilizando la técnica de PCR, 16% presentaron el gen TEM, 44% el SHV, 20% el CTXM, 4% presentaron los tres genes y un 20% no presentó ninguno de los tres genes en estudio. **Conclusiones:** Las cepas BLEE halladas son de particular importancia por mostrar multirresistencia a antibióticos hasta de cuarta generación. Se reportan cepas que expresan hasta tres genes haciéndolas más patógenas en comparación con otras cepas.

Palabras clave: beta-Lactamasas, *Escherichia coli*, Genes (Fuente: DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Objective: To determine the presence of TEM, SHV and CTX-M genes in extended spectrum β -lactamase (ESBL) *Escherichia coli* isolated in a hospital in Chiclayo. **Materials and Methods:** A descriptive cross sectional study with convenience sampling. **Results:** 50 *E. coli* strains were isolated from 04 hospitalization areas. All were confirmed phenotypically as ESBL producers. At molecular level, using PCR, 16% had MET gene, 44% SHV, 20% CTXM and 20% did not express any of the three genes under study. **Conclusions:** ESBL strains found are particularly important to show multidrug resistance to fourth-generation antibiotics. Strains expressing three genes, which are most pathogenic compared with other strains, are reported.

Key words: beta-Lactamases. *Escherichia coli*. Genes (Source: MeSH-NLM).

INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae constituye el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos de importancia médica y son las bacterias que se recuperan con mayor frecuencia en muestras clínicas humanas. Muchos miembros de esta familia poseen betalactamasas cromosómicas naturales. Los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos

móviles⁽¹⁾.

Las betalactamasas de espectro extendido se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, monobactams y cefalosporinas de tercera generación pero son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam^(2,3). Se han descrito más de 200 β -lactamasas diferentes en todas las regiones del mundo y en casi todas las especies de enterobacterias, principalmente de los tipos SHV, TEM, CTX-M, PER y OXA.4 Algunas son específicas para penicilinas (penicilinasas) o cefalosporinas (cefalosporinasas), mientras que otras tienen un espectro amplio de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar la mayoría de antibióticos β -lactámicos. En 1989 se detectó un aislado clínico de *Escherichia coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M1 por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima^(5,6).

Las primeras BLEE se describieron en 1983 en Alemania en diferentes aislados de enterobacterias que presentaban resistencia a cefotaxima y ceftazidima, transfiriéndose por conjugación. Desde entonces estos microorganismos se han descrito cada vez con más frecuencia en diferentes países del mundo⁽⁷⁾. Desde el año 2010, *E. coli* productora de enzimas CTX-M (especialmente CTX-M-15) han surgido en todo el mundo como causas importantes a infecciones al tracto urinario en la comunidad e infecciones al torrente sanguíneo debido a la propagación de las betalactamasas de espectro extendido que producen estas bacterias⁽⁸⁾.

Hasta finales de los años noventa la mayoría de las BLEE, principalmente el tipo TEM y SHV, se aislaban en cepas de *K. pneumoniae* implicadas en brotes nosocomiales, sobre todo en unidades de cuidados intensivos. Actualmente la atención se centra en el cambio epidemiológico que se está produciendo

1. Escuela de Medicina. Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo. Chiclayo-Perú.
a. Licenciado en Biología.
b. Magister en Microbiología.

en cuanto a los tipos BLEE más prevalentes y su distribución, con mayor presencia en *E. coli* procedente del medio extrahospitalario (principalmente en el aislamiento de muestras urinarias) y en relación con BLEE del tipo CTX-M 9.

Existen otras β -lactamasas comunes en algunos hospitales pero que no son consideradas estrictamente BLEE, se denominan β -lactamasas AmpC. Estas enzimas mediadas por plásmidos confieren resistencia a la ampicilina, amoxicilina, aztreonam y a la mayoría de las cefalosporinas. Se diferencian de las BLEE porque son susceptibles a las cefalosporinas de cuarta generación.

Múltiples estudios indican que el amplio, inadecuado y muchas veces irracional uso de antimicrobianos, así como la falta de programas integrales de vigilancia y control son causas de la selección de bacterias resistentes siendo las personas más expuestas las que están en los hospitales, lo que puede empeorar su pronóstico e incrementar los costos de atención incluyendo un mayor tiempo de estancia hospitalaria^(10,11).

En el Perú, hay muy pocos estudios que han evaluado este tema. En un estudio realizado en niños de comunidades rurales de la selva peruana que no se exponen a antimicrobianos, se determinó que las *E. coli* comensales en heces presentaban una tasa de resistencia a ceftriaxona de 0,1% y de 1,7%. Asimismo se determinó la presencia de BLEE tipo CTX-M del grupo 9 (CTX-M14 y CTX-M 15)^(11,12).

Se requieren estudios para conocer las características epidemiológicas de las cepas productoras de BLEE en nuestras unidades de cuidados intensivos, sobre todo por la resistencia a betalactámicos de amplio espectro como cefalosporinas, así como la resistencia cruzada a otros grupos de antimicrobianos. La detección oportuna de estas cepas en los hospitales, permite la implementación de medidas de control de infecciones para impedir su diseminación y lo más importante, brindar una terapia apropiada a quienes sufren infección por una bacteria productora de BLEE.

La vigilancia de resistencia en nuestros hospitales, se realiza de manera in vitro mediante métodos fenotípicos, donde se determina la sensibilidad o resistencia antibiótica, siendo muy pocos los estudios de investigación realizados para la búsqueda de genes de resistencia antibiótica y aún menos los dirigidos hacia enteropatógenos específicamente. Debido a esto, nos planteamos el objetivo de determinar la presencia de genes del tipo TEM, SHV y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* aisladas de un Hospital de nuestra Región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: descriptivo transversal. La muestra estuvo constituida por 50 cepas clínicas de *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivos proveniente del laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional "Almanzor Aguinaga Asenjo" de la Ciudad de Chiclayo-Perú durante el período comprendido entre Enero- Mayo del 2013. Todas las cepas aisladas de urocultivos y confirmadas como BLEE positivas por el Sistema automatizado Vitek 2. Una cepa de *E. coli* ATCC 3456 sensible a todos los antibióticos fue usada como control negativo.

Muestreo: no probabilístico por conveniencia.

Criterios de inclusión: cepas de *E. coli* BLEE positivas aisladas del Hospital Nacional "Almanzor Aguinaga Asenjo" a partir de urocultivos positivos de pacientes provenientes de los servicios de Urología, Unidad de cuidados intensivos, Cirugía y

Medicina Interna entre los meses de Enero-Mayo 2013

Criterios de exclusión: cepas de *E. coli* BLEE provenientes de pacientes ambulatorios.

Test Confirmatorio BLEE (Método de Jarlier):

Las cepas fueron tamizadas a través del método de disco de difusión; que presentaron los halos de inhibición para las cepas BLEE sospechosas, usando los siguientes discos de antibióticos Aztreonam (30 ug) \leq 27 mm, Cefotaxima (30 ug) \leq 27 mm, Ceftazidima (30 ug) \leq 22 mm y Ceftriaxona (30 ug) \leq 25 mm según el (CLSI); que luego fueron confirmadas por el método de Jarlier (Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología)⁽¹³⁾. La presencia de BLEE fue manifestado por el efecto sinérgico del inhibidor Amoxicilina/ácido clavulámico (AMC) (20/10mcg) en el centro de una placa petri con agar Müller Hinton y alrededor a 25mm de distancia, y los discos de Ceftazidima, CAZ (30mcg); Cefepime, CPM (30mcg); Ceftriaxona, CRO (30mcg) y Aztreonam/Monobactam ATM(30ug) a las 24 horas se observaron las siguientes características en las placas de cultivo (efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano) Y finalmente se registraron 35 cepas que cumplían con las condiciones para ser BLEE fenotípicamente positivas^(14,15).

Extracción de ADN: La extracción de ADN de todas las cepas de *Escherichia coli* fue realizado con el Kit Pure Link Genomic DNA según el protocolo de purificación rápida de ADN de Invitrogen para muestras bacterianas. El ADN extraído fue guardado de -24 a -20 °C hasta su posterior uso.

Reacción en cadena de la polimerasa: la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa de los genes blaTEM fue realizado con los oligonucleótidos TEM -1 (5' - ATAAAATTCTTGAAAGACGAAA) y TEM -2 (5' - GACAGTTACCAATGCTTAATC), siguiendo las recomendaciones descritas por Mabilat C y Cols.⁽¹⁶⁾.

Para la amplificación de los genes blaSHV fueron empleados los oligonucleótidos siguientes: SHV - 1 (5' - TGTTATGCGTTATATTCGCC) y SHV - 2 (5' - GGTTAGCGTTGCCAGTGC) siguiendo las recomendaciones descritas por Howard C y Cols.⁽¹⁷⁾.

La amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes blaCTX-M fue realizado con los oligonucleótidos: CTX-M - 1 (5' - TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA3') y CTX-M - 2 (5' CGATATCGTTGGTGGTGCCAT3'). Siguiendo las recomendaciones descritas por Castro y otros⁽¹⁸⁾.

La mezcla de reacción fue ajustada a un volumen final de 50 μ L según las condiciones descritas en el protocolo FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack de Roche: 25,6 μ L agua PCR; 5 μ L de buffer PCR 10x, 4 μ L 25mM MgCl₂, 1 μ L del mix de nucleótidos grado PCR; 5 μ L cebador TEM-1, 5 μ L del cebador TEM-2; 0,4 μ L de FastStart Taq DNapolimerasa (ROCHE) y 4 μ L del ADN extraído previamente de cada cepa bacteriana. Las RCP fueron realizados en un termociclador Verita Thermal Cycler (Applied Biosystems), bajo las condiciones que cada autor describe. El producto de amplificación fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (Promega Corporation, USA). El gel teñido con bromuro de etidio (1,0 g/mL) fue examinado a través de un transiluminador Biorad Pharos FX Plus® y editado con el programa Quantity one®

Se verificó el tamaño del ADN amplificado usando un marcador de peso molecular de 100 pb. La corrida electroforética fue

llevada a cabo a 100 V por 45-60 minutos.

Aspecto ético

Se solicitó el permiso a los directivos del Hospital para que autoricen el ingreso de uno de los investigadores y el traslado de las cepas bacterianas desde el Laboratorio de Microbiología hasta el Laboratorio de Microbiología y Genética de la Universidad; los investigadores tomaron todas las medidas de bioseguridad antes, durante y después de cada procedimiento microbiológico y molecular. Este trabajo fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo.

RESULTADOS

Las 50 cepas de *Escherichia coli* fueron confirmadas fenotípicamente como productoras de BLEE a través del método de Jarlier.

Todas las cepas fueron analizadas mediante la amplificación de ADN por PCR. De éstas cepas, 8 (22,8%) presentaron sólo el gen TEM, 22 cepas (62,8%) presentaron sólo el gen SHV, 10 cepas presentaron el gen CTX-M. (28,5%). Asimismo, 2 cepas expresaron los tres genes (5,7%), 10 cepas no expresaron ninguno de los tres genes (Tabla N°01).

Los productos de PCR (amplicones) fueron del tamaño esperado, de aproximadamente 1078pb para los genes blaTEM, 870pb para blaSHV y 544pb para blaCTX-M.

DISCUSIÓN

El presente estudio se inició realizando un reconocimiento de los patrones de susceptibilidad a antibióticos β- lactámicos con el sistema automatizado VITEK2, en 50 cepas clínicas de *E. coli* aisladas de urocultivos de pacientes internados en 04 áreas del Hospital Nacional "Almanzor Aguinaga Asenjo" en la Ciudad de Chiclayo-Perú-. De acuerdo a los resultados obtenidos, estos patrones eran indicativos de la presencia de cepas BLEE. Del total de cepas presuntas productoras de BLEE, 40 cepas fueron confirmadas como tal utilizando la técnica molecular del PCR, lo cual nos indica que las 10 cepas restantes, que no fueron productoras de BLEE presentarían otro mecanismo de resistencia, tales como β- lactamasas AmpC cromosómicas o mediadas por plásmidos⁽²⁾.

En el año 2012, en nuestra región se detectó la presencia de

genes tipo TEM y SHV en 66 cepas de *E. coli* aisladas de infecciones urinarias de las cuales, 18 no expresaban ninguno de los dos genes en estudio. (TEM y SHV). El gen más frecuente fue TEM (60.6%)⁽¹⁹⁾. En nuestro trabajo el gen más frecuente fue el SHV, seguido del CTX-M. También resulta interesante observar que existen cepas que pueden expresar más de un gen, en nuestro caso reportamos dos.

Las BLEE son consideradas como causas importantes del incremento en la morbilidad y mortalidad de pacientes hospitalizados, de la prolongada estancia hospitalaria y del aumento de los costos globales de salud. Asimismo, las pruebas rutinarias de la susceptibilidad antimicrobiana no son suficientes para determinar la presencia de cepas productoras de BLEE. Las principales BLEE derivan de los tipos TEM y SHV debido a mutaciones puntuales en la estructura del gen que las codifica. En el 2005 se realizó uno de los primeros trabajos para detectar la presencia de Blee del tipo TEM y SHV en dos Hospitales de Lima trabajando con cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* encontrándose una elevada resistencia para ambas bacterias⁽²⁰⁾.

Las limitaciones de este trabajo se presentan por el hecho de tener como referencia sólo un hospital y una única especie en estudio, que sería *E. coli*, aislada a partir de pacientes internados y no ambulatorios. No se contó con registro de datos de los pacientes por lo que no se realizó un estudio epidemiológico más completo, como lo presenta el trabajo de investigación realizado el año 2013 donde se mencionan a los métodos invasivos como sonda nasogástrica, sonda vesical, cirugía previa y catéter venoso central, como causas importantes para adquirir la infección por bacterias productoras de BLEE⁽²¹⁾.

El reporte de Blee realizado en este trabajo es importante debido a que estas cepas están relacionadas por ser multirresistentes y ser aisladas a partir de muestras de pacientes hospitalizados, sería interesante realizar trabajos de este tipo incluyendo también a pacientes ambulatorios, ampliando más el número de Hospitales muestreados y trabajando asimismo con más de una especie bacteriana. También sería necesario establecer desde el punto de vista genético la relación de clonalidad entre cepas para determinar si presentan o no un origen común.

Agradecimientos

Los investigadores del presente artículo científico expresan su

Tabla N°01: Distribución de cepas de *E. coli* por servicio de Hospitalización. Enero- Mayo 2013.

Presencia del gen	UCI		CIRUGÍA		MEDICINA INTERNA		UROLOGÍA	
	n	%	n	%	n	%	n	%
TEM	2	28,5	1	50	0	0	4	13,7
SHV	2	28,5	1	25	3	25	16	55,1
CTX-M	1	14,3	0	0	1	8	8	27,5
No TEM, SHV, CTX-M	1	14,3	1	25	8	67	0	0
TEM, SHV, CTX-M	1	14,3	0	0	0	0	1	3,7
Total	7	100	4	100	12	100	29	100

TEM: primera betalactamasa mediada por plásmidos de una paciente llamada Temoniera

SHV: Betalactamasas sulfhidrilo variables

CTX-M: betalactamasa con actividad hidrolítica a la cefotaxima aislada por primera vez en Múnich

agradecimiento al personal de Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional "Almanzor Aguinaga Asenjo" por proporcionarnos las cepas de *Escherichia coli*, y a la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo por su ayuda en el financiamiento de este trabajo.

Conflictos de interés: Los autores niegan conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Huayán-Dávila G, Mercado-Martínez P. [Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de espectro extendido \(BLEE\) en Enterobacteriaceae aisladas de reservorios ambientales de un hospital general en Cajamarca, Perú. Rev Med Hered. 2011;22\(2\):69-75](#)
- García C, Astocondor L, Banda C. [Enterobacterias productoras de \$\beta\$ lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. Acta Med Per. 2012;29\(3\):163-8.](#)
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. [CTX-M enzymes: Origin and Difusión. Front Microbiol.2012;3:110.](#)
- Paterson DL, Bonomo RA. [Extended-Spectrum \$\beta\$ -Lactamasas: a Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005;18\(4\):657-86.](#)
- Álvarez Almanza D. [Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2010;9\(4\):516-24.](#)
- Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. [Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas a *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28\(Supl 1\):12-8.](#)
- Díaz MA, Ramón Hernández J, Matínez-Matínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Grupo de estudios de Infección Hospitalaria. [Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27\(9\):503-10.](#)
- Pitout JD. [Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. Drugs. 2010;70\(3\):313-33.](#)
- García-Hernández AM, García-Vásquez E, Hernández-Torres A, Ruíz J, Yagüe G, Herrero JA, et al. [Bacteremias por *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido \(BLEE\): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter. 2011;24\(2\):57-66.](#)
- Máttar S, Martínez P. [Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las \$\beta\$ -lactamasas de espectro extendido \(BLEE\): detección, impacto clínico y epidemiología. INFECTIO.2007;11\(1\):23-35.](#)
- Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al. [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. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51\(8\):2720-5.](#)
- Bartoloni A, Pallecchi L, Benedetti M, Fernandez C, Vallejos Y, Guzman E, et al. [Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. Emerg Infect Dis. 2006;12\(6\):907-13.](#)
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21.2011 31(1):48-49.
- Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, et al. [Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. Rev Arg Microb. 2005;37\(1\):57-66.](#)
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. [Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988;10\(4\):867-78.](#)
- Mabilat C, Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ ed. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1993. p. 553-9.
- Howard C, van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. [Identification and minisequencing-based discrimination of SHV \$\beta\$ -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46\(3\):659-64.](#)
- Castro Alarcón N, Carreón Valle DE, Moreno Godínez ME, Alarcón Romero LC. [Caracterización molecular de \$\beta\$ lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*. ENF INF MICROBIOL. 2008;28\(3\):114-20.](#)
- Arce Z, Alarcón E, Limo J, Llontop J, Valle J. [Detección de genes SHV y TEM en cepas de *Escherichia coli* productoras de \$\beta\$ -lactamasas de espectro extendido procedentes de dos centros hospitalarios de Chiclayo- Perú: Enero- Agosto 2011. Rev. cuerpo méd. HNAAA. 2012; 5\(3\):13-6.](#)
- Morales JL, Reyes K, Monteghirfo M, Roque M, Irey J. [Presencia de \$\beta\$ -lactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. An Fac Med Lima. 2005; 66\(1\):24-32.](#)
- Escalante-Montoya JC, Síme-Díaz A, Díaz-Vélez C. [Características Clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Rev. Peru. Epidemiol. 2013;17\(1\):1-6.](#)

Correspondencia

Zhandra Arce.
Correo: zarce@usat.edu.pe

Revisión de pares

Recibido: 14/08/2014
Aceptado: 15/09/2014