
Genes bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CTX-M} en enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria.

Militza Guzmán L¹, Eliosmar Rodríguez¹, Karen Antón C¹, Suyin Silva¹,
Jhonilys Nacarro¹, Loriannys Lastra¹, Elsa Salazar de V¹ y Guillermina Alonso².

¹Laboratorio de Bacteriología Molecular, Departamento de Bioanálisis,
Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre,

²Laboratorio de Biología de Plásmidos, Instituto de Biología Experimental,
Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: β -lactamasas, gen bla_{SHV} , gen bla_{CTX-M} , gen bla_{TEM} , resistencia.

Resumen. El objetivo de este estudio fue identificar los genes bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CTX-M} en aislados clínicos de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), recolectadas entre septiembre y noviembre de 2005. Además de la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, los aislados también mostraron resistencia a cloranfenicol (59,2%) amikacina (37,0%) y gentamicina (40,7%) y se mostraron sensibles a imipenem y meropenem. Nueve cepas lograron transferir la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, así como la producción de BLEE. En los aislados clínicos se detectaron los genes bla_{SHV} , bla_{TEM} y bla_{CTX-M} , donde los tipos bla_{TEM-1} , bla_{SHV-1} , bla_{SHV-5} , $bla_{SHV-5-2a}$ y $bla_{CTX-M-1}$ fueron los prevalentes; mientras que en las transconjugantes sólo se detectaron bla_{TEM-1} , bla_{SHV-5} y $bla_{SHV-5-2a}$. Se identificaron en total siete tipos de genes, de los cuales cinco eran codificantes de enzimas tipo BLEE, lo que demuestra que en el centro hospitalario la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación es debida a diversas enzimas.

***bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} genes in extended-spectrum β -lactamases producing enterobacterias isolated from patients with hospital-acquired infections.**

Invest Clin 2013; 54(3): 235 - 245

Keywords: Plasmids, β -lactamases, gen *bla*_{SHV}, gen *bla*_{CTX-M}, gen *bla*_{TEM}, Resistance.

Abstract. The objective of the present investigation was to identify the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes on extended-spectrum β -lactamases (ESBL) producing Enterobacteriaceae from clinical isolates, collected between September and November 2005. In addition to third-generation cephalosporin resistance, the isolates also showed resistance to chloramphenicol (59.2%), amikacin (37.0%) and gentamicin (40.7%), and demonstrated sensitivity to imipenem and meropenem. Nine strains were capable of transferring third-generation cephalosporin resistance, as well as the production of ESBL. In the clinical isolates, the genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} were detected, being more prevalent the types *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-5-2a} and *bla*_{CTX-M-1}; while in the trans-conjugated only *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-5} y *bla*_{SHV-5-2a} were found. In total, seven types of genes were identified, five of which were codifying genes for ESBL-type enzymes. This demonstrates that in the hospital center, resistance to third-generation cephalosporin is mediated by several enzymes.

Recibido: 27-04-2012. Aceptado: 02-05-2013

INTRODUCCIÓN

La resistencia a las oximinocefalosporinas, es un problema creciente en el tratamiento de las infecciones intrahospitalarias, debido principalmente a la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE); las cuales son enzimas producidas principalmente por bacterias Gram negativas que tienen la particularidad de conferir resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, excepto a las cefamicinas y a los carbapenemas, y pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otro inhibidor de β -lactamasas (1-5).

Las principales BLEE identificadas en enterobacterias pertenecen a la clase molecular A grupo 2be de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiro (6) y entre ellas se encuentran las TEM y SHV. Sin embargo, otras familias no relacionadas con las ante-

rioras, como CTX-M, PER (1 y 2), VEB y GES, también han sido identificadas (7).

Las cepas productoras de BLEE son un importante problema de salud pública, debido a su multirresistencia asociada, sus implicaciones en brotes intrahospitalarios y su tendencia a diseminarse rápidamente en todo el mundo (8-10). Es por eso, que son consideradas marcadores clínicos importantes y el conocimiento de su incidencia juega un papel importante en la selección del tratamiento apropiado (11, 12).

Los genes codificantes de enzimas tipo BLEE se han detectado en diversas regiones a nivel mundial, y el éxito de su diseminación está relacionado con la ubicación de los genes (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, entre otros) en plásmidos auto transferibles o móviles, los cuales pueden co-transferir a cepas de la misma especie o especies diferentes, resistencia a otros antimicrobianos,

aspecto que complica la terapia de algunas infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE (13, 14)

En Venezuela, se ha reportado una marcada frecuencia de cepas de enterobacterias productoras de BLEE, sin embargo, existe poca información sobre los tipos de genes existentes en el oriente del país. El propósito de esta investigación fue determinar los tipos de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en cepas de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado Sucre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados bacterianos e identificación bioquímica

Se analizaron 27 aislados clínicos de enterobacterias recolectados durante el periodo septiembre a noviembre de 2005 de pacientes con diagnóstico clínico de infección intrahospitalaria, atendidos en los diferentes servicios de hospitalización del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Los aislamientos se caracterizaron por presentar resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y ser fenotípicamente productoras de BLEE. Como criterio de selección de las cepas se escogió un aislado por paciente, teniendo en consideración que el paciente cumpliera con los criterios establecidos para infecciones intrahospitalarias (aquellas ocurridas después de 48 horas de hospitalización) (15). La identificación del género y especie se determinó mediante protocolos convencionales para enterobacterias.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Con el propósito de determinar el perfil de resistencia a los betalactámicos y la co-existencia de resistencia contra otros antimicrobianos, se realizaron pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante

el método de difusión en disco siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (16). Los antimicrobianos ensayados (Todos marca Oxoid Ltd, Reino Unido) fueron: cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), aztreonam (30 µg), piperacilina-tazobactam (100/10 µg), imipenem (10 µg), cefoxitin (30 µg), cefepima (30 µg), amoxicilina ácido clavulánico (2:1) (30 µg), amikacina (30 µg), kanamicina (30 µg), tobramicina (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg). Se ubicaron estratégicamente discos de ceftazidima, cefotaxima y amoxicilina ácido clavulánico para observar BLEE mediante sinergia, así como EDTA e imipenem y meropenem para detectar posibles metalobetalactamasas.

La confirmación fenotípica de las BLEE se realizó mediante la técnica de disco combinando (16)

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

Transferencia de la resistencia

Los experimentos de conjugación se realizaron en medio sólido bajo las condiciones establecidas por Narváez y col. (14).

Extracción de ADN en los aislamientos clínicos y transconjugantes

La extracción del ADN se realizó mediante el empleo del kit de purificación Wizard Genomic (Promega).

Detección por PCR de los genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}

La presencia de los genes *bla* se determinó en los aislamientos clínicos y transconjugantes. Se emplearon iniciadores específicos para los genes *bla*_{TEM} (17), *bla*_{SHV} (18), y *bla*_{CTX-M} (19). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final

de 25 μL . En cada reacción se empleó 12,5 μL de master mix 2X (Promega), 1 μL de cada oligonucleótido específico, para una concentración final de 0,4 $\mu\text{mol/L}$, 2 μL de ADN y 8,5 μL de agua libre de ADNasas. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (Techne, modelo TC-312, Inglaterra) empleando las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de una desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 45°C por 1 min y extensión a 72°C por 2,5 min, durante 30 ciclos, con una extensión final de 72°C por 10 min (20). Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, tratados con bromuro de etidio y visualizados en un transluminador de luz ultravioleta (Labnet, modelo U1000 302Mn, USA).

Secuenciación de los genes *bla*

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

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva, empleando porcentajes de frecuencias, para ello, se elaboraron tablas y figuras de los datos obtenidos mediante el programa estadístico SPSS versión 11.5.

RESULTADOS

Del total de aislados clínicos evaluados, se identificaron trece cepas de *K. pneu-*

moniae, nueve de *Enterobacter* sp. y cinco de *E. coli* (Tabla I). La susceptibilidad antimicrobiana realizada a los aislados reveló que 100% (27/27) fueron resistentes a cefotaxidima, 92,6% (25/27) a cefotaxima, 59,2% (17/27) a amoxicilina ácido clavulánico y 18,5% (4/27) a cefepima. Además de la resistencia a los β -lactámicos, las cepas presentaron resistencia a cloranfenicol (59,2%), gentamicina (40,7%), amikacina (37,0%) y a trimetoprim-sulfametoxazol (37,0%). No se observó resistencia a los carbapenemas en las cepas evaluadas.

El 33,33% (9/27) de las cepas clínicas lograron transferir plásmidos mediante los ensayos de conjugación bacteriana, con una frecuencia de 10^{-4} transconjugantes/aislamiento clínico. La conjugación sólo se obtuvo para los aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *Enterobacter* sp., de los cuales cuatro aislados provenían de la unidad de cuidados intensivos (UCI).

Los resultados del estudio de la resistencia realizada a las bacterias transconjugantes revelaron que seis presentaron susceptibilidad disminuida a las cefalosporinas de tercera generación y fueron productoras de BLEE (Tabla II). Los resultados también demostraron que en seis cepas se observó cotransferencia de determinantes de resistencia para otros antimicrobianos como aminoglucósidos y cloranfenicol, independientemente de la adquisición o no de la resistencia a las cefalosporinas y producción de BLEE.

La presencia de los genes *bla* en los aislados clínicos reveló que 81,5% (22/27) presentaban el gen *bla*_{SHV}, 51,9% (14/27) el gen *bla*_{TEM}, y 25,9% (7/27) el gen *bla*_{CTX-M}. (Fig. 1). Se encontró la amplificación de más de un gen en algunos aislados clínicos, siendo la combinación *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} la más frecuente con 37,0% (10/27), seguido de *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M} con 14,8% (4/27), *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} con 7,4% (2/27) y *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{SHV} con 3,7% (1/27).

TABLA I
CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, FENOTÍPICAS Y MOLECULARES DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE PACIENTES CON INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA. HOSPITAL UNIVERSITARIO “ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ”

Cepas	Tiempo (Días)	Muestra	Terapia Previa	Servicio	Resistencia	BLEE	Genes <i>bla</i>
Kp 01	24	Sangre	CAZ	Retén	CF, CAZ CTX FEP AK TE CL	+	<i>bla</i> _{SHV-5}
Kp 02	14	Secreción	CIP	Medicina B	CF CAZ CTX FEP	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-1*} + <i>bla</i> _{CTX-M-1}
Kp 04	5	Sangre	AMS,GN	Retén	CF CAZ CTX AMC GN SXT	+	<i>bla</i> _{SHV-5}
Kp 06	8	Secreción	CAZ,AK	Retén	CF CAZ CTX AMC SXT CL	+	<i>bla</i> _{SHV-2a}
Kp 07	7	Catéter	CAZ, OXA	UCI	CF CAZ CTX AMC CL	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-1}
Kp 08	9	Secreción	CAZ, OXA	Medicina A	CF CAZ CTX FEP GN SXT CL CIP	+	<i>bla</i> _{SHV1*} + <i>bla</i> _{CTX-M-2}
Kp 09	9	Secreción	CAZ, OXA	Medicina A	CF CAZ, AK, GN	+	<i>bla</i> _{SHV-1*}
Kp 14	30	Catéter	MER	Pediatría A	CF CAZ CTX SXT CL	+	<i>bla</i> _{SHV-1*}
Kp 22	5	Secreción	CTX, VAN	UCI	CF CAZ CTX FEP AMC AK GN SXT CL CIP	+	<i>bla</i> _{SHV-1*} + <i>bla</i> _{CTX-M-2}
Kp 24	9	Secreción	VAN, AK	UCI	CF CAZ CTX AMC	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-5}
Kp 27	6	LCR	GN	Retén	CF CAZ CTX AMC CL	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-1*}
Kp 33	5	Heces	GN	Retén	CF CAZ CTX AMC SXT CL	+	<i>bla</i> _{SHV-5-2a}
Kp 34	9	Secreción	AK, AZT	UCI	CF CAZ CTX AMC SXT CL	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-5}
Esp 61	7	Catéter	CAZ, OXA	UCI	CAZ CTX AK GEN	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-5}
Esp 03	14	Orina	CIP, OXA	Medicina A	CAZ CTX FEP TE CL	+	<i>bla</i> _{SHV-5} + <i>bla</i> _{CTX-M-1}
Esp 06	7	Catéter	CAZ, OXA	UCI	CAZ CTX SXT CL CIP	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-5-2a}
Esp 07	7	Sangre	CAZ, OXA	UCI	CAZ CTX AMC CL	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-14}
Esp 12	13	Secreción	VAN, IPM	Medicina C	CAZ CTX AK GN CL	+	<i>bla</i> _{SHV-5-2a}
Esp 13	30	Secreción	MER	Pediatría A	CAZ CTX AMC AK GN CL	+	<i>bla</i> _{SHV-5}
Esp 16	9	Secreción	VAN, CAZ	UCI	CAZ CTX AK GN CL	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-5}
Esp 28	7	Secreción	CAZ	UCI	CAZ CTX AMC AK GN CL	+	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-1}

TABLA I (Continuación)

Cepas	Tiempo (Días)	Muestra	Terapia Previa	Servicio	Resistencia	BLEE	Genes bla
Esp 29	7	Secreción	CAZ	UCI	CAZ CTX AMC AK GN	+	bla _{TEM-1}
Ec 15	30	Catéter	VAN	UCI	AMP CF CAZ CTX GN SXT	+	bla _{TEM-1} + bla _{SHIV-5}
Ec 17	24	Secreción	CIP,AM	Medicina B	AMP CF CAZ CTX AMC GN SXT	+	bla _{TEM-1} + bla _{SHIV-5-2a}
Ec 20	8	Catéter	CIP,AM	Medicina C	AMP CF CAZ CTX AMC CL	+	bla _{SHIV-1} + bla _{CTX-M-1}
Ec 26	6	Heces	AMS,GN	Retén	AMP CF CAZ CTX AMC SXT CIP	+	bla _{TEM-1} + bla _{CTX-M-1}
Ec 32	12	Sangre	GN	Retén	AMP CF CAZ AMC AK	+	bla _{TEM-1}

Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Esp: *Enterobacter* sp, Ec: *Escherichia coli*. LCR: Líquido cefalorraquídeo, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, OXA: oxacilina, AMS: Ampicilina-Sulbactam, GEN: Gentamicina, AK: Amikacina, VAN: Vancomicina, IPM: Imipenem, MER: Meropenem, AM: Ampicilina, CTX: Cefotaxima, AZT: Aztreonam, FEP: Cefepima, TE: tetraciclina, CL: Cloranfenicol, AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico, STX: Trimetoprim sulfametoxazol, bla_{SHIV}: Gen que codifica una Betalactamasa tipo SHV, bla_{TEM}: Gen que codifica una Betalactamasa tipo TEM, bla_{CTX}: Gen que codifica una Betalactamasa tipo CTX-M, * Gen constitutivo de *Klebsiella pneumoniae*.

TABLA II

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES PRESENTADAS POR LAS CEPAS TRANSCONJUGANTES

Cepa Donante	Cepa transconjugante	BLEE	Resistencia adquirida	Genes bla
Kp09	T09	+	AM CF CAZ CTX GEN	bla _{SHIV-5-2a}
Kp12	T12	+	AM CF CAZ CTX CL	bla _{SHIV-5}
Kp13	T13	+	AM CF CAZ CTX CL	bla _{SHIV-5}
Kp22	T22	+	AM CF CAZ CTX	bla _{SHIV-5}
Kp33	T33	+	AM CF CAZ CTX AMC GN CL	bla _{SHIV-5}
Esp06	T06	+	AM CF CAZ, CTX, CL	bla _{TEM-1} + bla _{SHIV-5}
Esp16	T16	-	AM	bla _{TEM-1}
Esp28	T28	-	AM, CL	bla _{TEM-1}
Esp29	T29	-	AM CF	bla _{TEM-11}

Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Esp: *Enterobacter* sp, T: Transconjugante, BLEE: Betalactamasas de espectro extendido, AM: Ampicilina, AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico, CAZ: Cefotaxidima, CTX: Cefotaxima, CL: Cloranfenicol, GEN: Gentamicina.

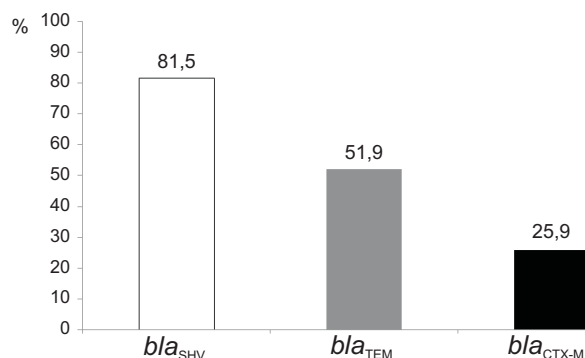


Fig. 1. Frecuencia de los genes bla en cepas de enterobacterias. Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

En las cepas transconjugantes se logró evidenciar que 66,66% (6/9) amplificaron el gen bla_{SHV} y 33,33% (3/9) el bla_{TEM} . Sólo en una cepa se detectó la combinación de los dos genes. No se detectó la presencia de bla_{CTX-M} en las cepas transconjugantes (Tabla II). El análisis de secuenciación reveló en los aislados clínicos la presencia de enzimas tipo betalactamasas de espectro ampliado (BLEA), así como de BLEE. Todos los amplificados del gen bla_{TEM} pertenecen a la variante TEM-1. Con respecto al gen bla_{SHV} , la similitud obtenida del GenBank reveló la presencia de SHV-1, SHV-5 y SHV-5-2a. Así mismo, se detectaron las variantes CTX-M-2, CTX-M-1 y CTX-M-14 (Tabla I). En las cepas transconjugantes solo se detectaron las variantes SHV-5, SHV-5-2a y TEM-1 (Tabla II).

DISCUSIÓN

La presencia de cepas de enterobacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y a otros antimicrobianos, representan un problema de salud pública a nivel mundial, debido a que contribuyen significativamente con el aumento de las tasas de mortalidad en los centros hospitalarios (20).

La producción de BLEE de la clase molecular A, es el principal mecanismo de resistencia adquirido por las bacterias para protegerse de la acción de los β -lactámicos (11). Esta resistencia se observa en todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* y actualmente es una de la más diseminada en todo el mundo. En este estudio se comprobó la presencia de genes bla_{SHV} , bla_{TEM} y bla_{CTX-M} en los aislados clínicos, donde bla_{SHV} (23/27) fue el más prevalente, al respecto, se puede acotar que el aumento en la frecuencia del gen puede estar condicionada al hecho que *K. pneumoniae* presenta de forma constitutiva el gen bla_{SHV-1} (21).

El gen bla_{CTX-M} se detectó en cuatro cepas de *K. pneumoniae*, dos *Enterobacter* y una *E. coli*. Estos resultados coinciden con algunos reportes a nivel nacional donde se ha descrito este gen en cepas de enterobacterias (22-24).

De acuerdo al análisis de la secuencia de los genes detectados, en las cepas se encontraron las enzimas tipo BLEE SHV-5, SHV-5-2a; CTX-M-1; CTX-M-2 y CTX-M-14. No obstante, también se presentaron las enzimas SHV-1 y TEM-1. Las enzimas tipo BLEE identificadas con mayor frecuencia en los aislados fueron SHV-5 y CTX-M-1, ambas enzimas no habían sido reportadas en cepas aisladas del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", sin embargo, en otras localidades se había reportado SHV-5 como responsable de conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación (23, 25), así como CTX-M-1 (22, 23) y CTX-M-14 (24).

La identificación de bla_{TEM-1} en los aislados, corresponde con lo reportado por otros autores en diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (22, 23, 25, 26). Si bien, a nivel nacional se han identificado una gran diversidad de enzimas BLEE, hasta ahora, no existen reportes de variantes derivadas de TEM-1 con actividad sobre las

cefalosporinas de tercera generación como los señalados en otros países (27-29).

Se conoce que el gen bla_{TEM} puede ser responsable de conferir resistencia a amoxicilina ácido clavulánico (30). En el estudio se encontró un elevado porcentaje de cepas resistentes a los inhibidores de β -lactamasas, pero la identificación de TEM-1 descarta la posibilidad de que la resistencia al inhibidor sea por las variantes IRT (del inglés Inhibitor-Resistant TEM), quedando la posibilidad de que otros mecanismos que confieren resistencia a los inhibidores puedan ser los responsables, entre ellos una hiperproducción de TEM-1, la presencia de enzimas tipo OXA, impermeabilidad o bombas de expulsión.

En siete cepas fenotípicamente productoras de BLEE no se detectaron genes responsables de este fenotipo. Es posible que la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y la producción de BLEE corresponda a otra enzima inhibible por ácido clavulánico, por lo que se hace necesario continuar los estudios para la confirmación de otras enzimas. Al respecto, a nivel nacional se ha reportado la presencia del gen bla_{PER} en cepas aisladas de diferentes centros del área metropolitana (22).

En los aislados bacterianos se encontraron asociaciones de genes, en su mayoría $bla_{TEM-1} + bla_{SHV-BLEE}$. Estas asociaciones pueden conferirles a los aislados un aumento en los niveles de resistencia, así como diversos espectros de hidrólisis hacia los diferentes antibióticos, lo que puede traer como consecuencia que los fenotipos expresados varíen con respecto a los esperados.

Al comparar los resultados del presente estudio con los reportados en una investigación previa realizada en el mismo centro hospitalario (26), donde únicamente se detectaron genes bla_{SHV-2a} y $bla_{CTX-M-2}$, como codificadores de enzima tipo BLEE, se evidencia la emergencia de nuevos genes (bla_{SHV-5} , $bla_{CTX-M-1}$ y $bla_{CTX-M-14}$) en cepas de

K. pneumoniae. Estos resultados demuestran una tendencia creciente en la frecuencia y variabilidad del tipo de β -lactamasa presente en aislados de esta especie, incremento que está relacionado con las enzimas SHV y CTX-M. En cuanto a la resistencia antimicrobiana observadas en las cepas de *K. pneumoniae*, no hay cambios relevantes desde el punto de vista fenotípico, entre los resultados publicados en el 2009 y los presentados en esta investigación.

La mayoría de los mecanismos enzimáticos que confieren resistencia contra los agentes terapéuticos de uso clínico, presentes en enterobacterias, se encuentran en plásmidos conjugativos, los cuales también portan genes que proporcionan resistencia a otros antimicrobianos como amikacina, gentamicina y ciprofloxacina. La presencia de genes de resistencia en plásmidos u otro elemento genético móvil como transposones e integrones, garantiza que los mismos sean transferidos a otras bacterias relacionadas o no filogenéticamente por mecanismo de transferencia horizontal (31, 32).

La detección de los genes bla_{SHV-5} , bla_{TEM-1} y $bla_{SHV-5-2a}$, en las cepas transconjugantes, demuestra el papel que tiene la conjugación en la diseminación de las BLEE. En contraste con otros artículos publicados (33, 34) en este estudio no se encontró la presencia del gen bla_{CTX-M} en las cepas transconjugantes. No obstante, estos resultados no son consistentes para demostrar que el gen no se encuentra en moléculas plasmídicas u otro elemento genético móvil.

Desde el punto de vista epidemiológico diversas investigaciones han reportado la presencia de las diferentes variantes alélicas bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CTX-M} identificadas en este estudio tanto en cepas aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria como en pacientes con infección comunitaria (20, 22, 24, 35), no obstante, bla_{CTX-M} es uno de los genes más prevalentes en infecciones adquiridas en la comunidad (22, 36).

Los resultados de la presente investigación revelan la existencia de distintas variantes de enzimas tipo BLEE en cepas de enterobacterias aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, donde SHV-5 y CTX-M-1 representan un porcentaje importante, además demuestran la diseminación de los genes codificantes de las enzimas entre especies diferentes, es por ello que se recomienda enfatizar las medidas de vigilancia y control de los antimicrobianos en el centro hospitalario, de tal forma que el cumplimiento de dichos programas permita frenar la diseminación de los genes presentes en los microorganismos resistentes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de la Licenciada Belkis Medina y del personal que labora en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" por apoyarnos en la realización del trabajo y al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por el apoyo financiero en el Proyecto identificado con el código N° CI-2-040102-1409/08.

REFERENCIAS

1. **Razazi K, Derde LP, Verachten M, Legrand P, Lesprit P, Brun-Buisson C.** Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 2012; 38: 1768-1778.
2. **Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, Ofner-Agostini M, Chistianson S, Simor AE, Paton S and The Canadian Hospital Epidemiology Committee of The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada.** Ambler class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* spp. in Canadian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1204-1214.
3. **Valcerde A, Coque TM, Garcia-San Miguel L, Vaquero F y Cantón R.** Complex molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 64-72.
4. **Bush K, Jacoby G.** Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-976.
5. **Livmore D.** Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27: 128-142.
6. **Bush K, Jacoby G, Medeiros A.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
7. **Deepthi R, Deepthi N.** Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. *J Glob Infect Dis* 2010; 2: 263-274.
8. **Paterson D, Bonomo R.** Extended-Spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-687.
9. **Maina D, Revathi G, Kariuki S, Hastings O.** Genotypes and cephalosporin susceptibility in extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae in the community. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6: 470-477.
10. **Biröl O, Tosun I, Aydin F, Osman A.** Horizontal dissemination of TEM- and SHV-type β -lactamase genes carrying resistance plasmids amongst clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Braz J Microbiol* 2008; 39: 636-643.
11. **Bush K, Jacoby G.** Updated functional classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-976.
12. **Goyal A, Prasad K, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A.** Extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. *Indian J Med Res* 2009; 129: 695-700.
13. **Hammond D, Harris T, Bell J, Turnidge J, Giffard P.** Selection of SHV extended-spectrum- β -lactamase-dependent cefotaxime and ceftazidime resistance in *Klebsiella pneumoniae* requires a plasmid-

- borne blaSHV gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 441-445.
14. **Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V.** Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005; 25: 29-34.
 15. **Horan TC, Andrus M, Dudeck MA.** CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36: 309-332.
 16. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement, M100-S21. CLSI 2011. Wayne, PA.
 17. **Eckert C, Gautier V, Saladin-Allaard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, Barnaud G, Delisle F, Rossier A, Lambert T, Philippon A, Arlet, G.** Dissemination of CTX-M- type β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1249-1255.
 18. **Haeggman S, Löfdal S, Poauw A, Verhoef J, Brisse S.** Diversity and evolution of the Class A chromosomal Beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2400-2408.
 19. **Eldestein M, Pimkin M, Palagin I, Eldestein I, Strachounski L.** Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3724-3732.
 20. **Bourjilat F, Bouchrif B, Dersi N, Claude J, Amarouch H, Timinouni M.** Emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in community-acquired urinary infections in Casablanca, Morocco. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5: 850-855.
 21. **Chavés J, Ladona M, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C.** SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 10: 2856-2861.
 22. **Marcano D, De Jesús A, Hernández L, Torres L.** Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Pública* 2011; 30: 529-534.
 23. **Torres L, Gagliotta V, Torres O, Benitez M, Domínguez M, Pedroza R.** β -lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol* 2006; 26: 80-88.
 24. **Millán B, Ghiglione B, Díaz T, Gutkind G, Araque M.** CTX-M-14 β -lactamase-producing *Citrobacter freundii* isolated in Venezuela. *Ann Clin Microb and Antimicrobials* 2011; 10: 22
 25. **Araque M, Nieves B, Lauretti L, Rossolini G.** Molecular basis of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 15: 37-42.
 26. **Guzmán M, Alonso G.** Caracterización de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre-Venezuela. *Invest Clin* 2009; 50: 419-431.
 27. **Cantón R, Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque M.** Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; Suppl 1:144-153.
 28. **Coque M, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13: 1-11.
 29. **Robin F, Demas J, Machado E, Bouchon B, Peixe L, Bonnet R.** Characterization of the novel CMT Enzyme TEM-154. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1262-1265.
 30. **Robin F, Krebs M, Delmas J, Gibold L, Mirande C, Bonnet R.** In vitro efficiency of the piperacillin/tazobactam combination against inhibitor-resistant TEM- and complex mutant TEM-producing clinical

- strains of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 1052-1056.
31. **Bennett P.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Braz J Pharmacol 2008; 153: S347-S357.
 32. **Sun H, Li S, Xie Z, Yang F, Sun Y, Zhu Y, Zhao X, Jiang S.** A novel multidrug resistance plasmid isolated from an *Escherichia coli* strain resistant to aminoglycosides. J Antimicrob Chemother 2012; 67:1635-1638.
 33. **Wang X, Chen J, Kang Y, Jiang N, An S, Gao Z.** Prevalence and characterization of plasmid-mediated *bla*_{ESBL} with their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with pneumonia. Chin Medical J 2012; 125: 894-900.
 34. **Kim J, Bae I, Jeong S, Chang C, Lee C, Lee K.** Characterization of IncF plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-14} gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. J Antimicrob Chemother 2011; 66:1263-1268.
 35. **Younes A, Hamouda A, Dave J, Amyes SG.** Prevalence of transferable *bla*_{CTX-M-15} from hospital and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* isolates in Scotland. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 313-318.
 36. **Martínez P, Garzón D, Mattar S.** CTX-M producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. Braz J Infect Dis 2012; 16: 420-425.