

# ***Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un hospital universitario**

Abreu, Santina \*  
Varela, Yasmín\*\*  
Millón, Beatriz\*\*  
Araque, María\*\*

Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated from patients with health care-associated infection in a university hospital

Fecha de aceptación: mayo 2014

## Resumen

**ANTECEDENTES.** Las infecciones asociadas con los cuidados de la salud (IACS) causadas por enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), representan un problema emergente de salud pública. En este estudio se determinó la presencia y distribución de genes *bla*<sub>BLEEs</sub> en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* aisladas en pacientes con IACS en el Hospital Universitario de Los Andes (HULA), Mérida, Venezuela.

**MATERIALES Y MÉTODOS.** Se estudió una colección de 14 cepas de *K. pneumoniae* y 12 de *E. coli* aisladas de pacientes con IACS en el HULA durante marzo a julio de 2013. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron por concentración inhibitoria mínima y la presencia de BLEE fue detectada por la prueba del sinergismo del doble disco. La transferencia de los determinantes BLEEs se realizó por conjugación y la caracterización de los genes *bla*<sub>BLEEs</sub> por PCR.

**RESULTADOS.** La neumonía fue el diagnóstico de IACS más frecuente (30.8%). Todas las cepas fueron productoras de BLEEs y la mayoría, se asoció con resistencia a quinolonas y aminoglucósidos. Todos los determinantes BLEEs fueron transferidos por conjugación. El gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> fue el más frecuente en *K. pneumoniae* (50%) y el *bla*<sub>CTX-M-8</sub> en *E. coli* (50%). La asociación de diferentes genes *bla*<sub>BLEEs</sub> se observó en el 46.1% de las cepas.

**CONCLUSIÓN.** Hasta donde es de nuestro conocimiento, esta es la primera descripción en Venezuela del gen *bla*<sub>CTX-M-8</sub> en *E. coli* asociado con *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub>.

**Palabras clave.** *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, beta-lactamasa, CTX-M-1, CTX-M-8, Venezuela.

## Abstract

**BACKGROUND.** Health care-associated infection (HCAI) caused by extended-spectrum beta-lactamase- (ESBL) producing enterobacteria, represent an emerging public health problem. In this study we determined the presence and distribution of *bla*<sub>ESBL</sub> genes in *K. pneumoniae* and *E. coli* strains isolated from patients with HCAI at The Andes University Hospital (TAUH), Mérida, Venezuela.

**MATERIALS AND METHODS.** Fourteen *K. pneumoniae* and 12 *E. coli* strains isolated from patients with HCAI in TAUH collected from March to July 2013 were studied. Susceptibility tests were performed by minimum inhibitory concentration and the presence of ESBLs was detected by the double-disk synergy test. Transfer of ESBLs determinants was performed by conjugation and characterization of the *bla*<sub>ESBL</sub> genes by PCR.

**RESULTS.** Pneumonia was the most frequent diagnosis of HCAI (30.8%). All strains were ESBL producers, most associated with resistance to quinolones and aminoglycosides. All ESBL determinants were transferred by conjugation. The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was the most prevalent in *K. pneumoniae* (50%), and *bla*<sub>CTX-M-8</sub> in *E. coli* (50%). The association of different *bla*<sub>ESBL</sub> genes was observed in 46.1% of strains.

**CONCLUSION.** To our knowledge, this is the first description of *bla*<sub>CTX-M-8</sub> gene in *E. coli* associated with *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> genes in Venezuela.

**Keywords.** *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, beta-lactamase, CTX-M-1, CTX-M-8, Venezuela.

\*Servicio de Medicina Interna. Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes.

\*\*Laboratorio de Microbiología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

Correspondencia: Dra. María del C. Araque  
Laboratorio de Microbiología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.  
Dirección electrónica: araquemc@ula.ve

## Introducción

La producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es el mecanismo más frecuente observado en bacilos Gram negativos resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Estas enzimas hidrolizan la unión amida del anillo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas, oximinocefalosporinas y los monobactámicos y son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.<sup>1</sup> La mayoría de las BLEE producidas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son usualmente variantes alélicas de las conocidas  $\beta$ -lactamasas TEM y SHV.<sup>2</sup> Sin embargo, desde los años 90, otras BLEE incluidas en la clase A de Ambler, identificadas como CTX-M, se han diseminado rápidamente en todos los continentes, en ambientes intra y extrahospitalarios, en humanos y animales.<sup>1-3</sup> Estas enzimas se encuentran principalmente localizadas en plásmidos transferibles, que a menudo también albergan genes que median la resistencia a otras clases de antimicrobianos, lo cual favorece la aparición de cepas con resistencia múltiple, que incluye fenotipos resistentes a los aminoglucósidos, fluoroquinolonas, co-trimoxazol, entre otros.<sup>4</sup>

La gravedad de las infecciones asociadas con los cuidados de la salud (IACS) se incrementa, cuando las bacterias implicadas son resistentes a los antibióticos, especialmente las productoras de BLEE.<sup>5</sup> Las principales enterobacterias involucradas en IACS y productoras de BLEE son *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.<sup>6</sup> La frecuencia de BLEE en estas especies bacterianas es variable, en Europa la producción de estas enzimas se observa principalmente en *K. pneumoniae* (30%), mientras que en el continente asiático es más frecuente en cepas de *E. coli* (67%), seguida por *K. pneumoniae* (55%).<sup>7</sup> En Latinoamérica, la prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* oscila entre 45.5% – 51.9% y 8.5 – 18.1%, respectivamente.<sup>8</sup>

A partir de 1987 en Venezuela, se ha observado un incremento marcado en la producción de BLEE en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* (25%).<sup>9</sup> Desde entonces, numerosos estudios han descrito la presencia de enterobacterias productoras de TEM, SHV y CTX-M en IACS en distintas regiones y hospitales del país.<sup>10-17</sup>

Sin duda, la prevalencia de los diferentes tipos de BLEE y su distribución no es un fenómeno estático, por el contrario se observa una dinámica intensa en la dispersión de los genes *bla*<sub>BLEE</sub>, gracias a una plataforma genética eficiente que les permite diseminarse y movilizarse entre especies y géneros bacterianos diferentes.<sup>15,17</sup> En este sentido, la detección rápida de BLEE en cepas clínicas es fundamental, no solo para indicar la antibiótico-terapia adecuada, sino también para implementar estrategias rigurosas para contención de clones resistentes y vigilar la circulación de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> en áreas hospitalarias de alto riesgo.<sup>4,5,18</sup>

Por lo antes expuesto, el propósito de este trabajo fue determinar fenotípicamente la presencia de BLEE y la distribución de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* aisladas en pacientes con IACS, recluidos en los servicios de hospitalización de medicina interna del Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela.

## Materiales y métodos

Cepas bacterianas: se estudió una colección de 26 cepas de bacterias Gram negativas: 14 *K. pneumoniae* y 12 *E. coli* con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro, aisladas de pacientes adultos hospitalizados en los servicios de medicina interna del Hospital Universitario de Los Andes, (HULA) Mérida-Venezuela, diagnosticados con IACS de acuerdo con los criterios descritos previamente.<sup>19</sup> Las cepas fueron recolectadas durante marzo a julio de 2013 y fueron identificadas mediante el sistema de galerías API 20E (bioMérieux). En el cuadro 1 se muestran las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes en quienes se aislaron las cepas analizadas en este estudio.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana: la susceptibilidad antimicrobiana se analizó determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de dilución en agar, de acuerdo con lo establecido por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013).<sup>20</sup> Los antibióticos probados fueron: cefoxitina (Merck Sharp), cefotaxima (Genven), ceftazidima (Distriquímica S.A), piperacilina/tazobactam (Wyeth), aztreonam (Bristol Myers Squibb, SL), ertapenem (Merck Sharp and Dohme), meropenem (Richet), gentamicina (Quim-Farm C.A), tobramicina (Eurofarm Limited), amikacina (SM Pharma), ácido nalidíxico (Sigma) y ciprofloxacina (PlusAndex). Todas las cepas fueron evaluadas fenotípicamente para determinar la presencia de BLEE mediante la prueba de sinergismo del doble disco (SDD) de acuerdo con lo descrito por el CLSI.<sup>20</sup> En estos ensayos se utilizaron como cepas de control *E. coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* LMM29-ULA (BLEE+).

Transferencia conjugativa de genes que codifican para BLEE: la transferencia de los determinantes de resistencia BLEE de las cepas de *K. pneumoniae* se realizó utilizando *E. coli* MKD135 resistente a la rifampicina como receptora. Las cepas donadoras y la receptora fueron inoculadas en caldo Mueller Hinton (MH) (Oxoid) e incubadas a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.7 a 600 nm. En una proporción de 1:10 a favor de la cepa receptora los cultivos fueron mezclados e incubados durante toda la noche a 37 °C. A partir de este cultivo, una alícuota 100  $\mu$ L se inoculó en placas de agar MH suplementadas con 300  $\mu$ g/mL de rifampicina (Sigma) y cefotaxima (4  $\mu$ g/mL). Las células transconjugantes obtenidas se les verificó su fenotipo por pruebas de susceptibilidad, SDD y PCR.

Extracción del ADN genómico. La extracción del ADN total se realizó mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200  $\mu$ L de agua destilada estéril. Estas suspensiones se congelaron a -20 °C durante 30 minutos y luego se sometieron a ebullición durante 15 minutos. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf estéril, el cual se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

Detección de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>. La detección de genes codificantes para TEM, SHV, CTX-M en las cepas estudiadas se realizó utilizando los iniciadores señalados en el cuadro 2 y las condiciones de amplificación

descritos previamente.<sup>21-23</sup> Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L y la mezcla estuvo compuesta por: 2.5  $\mu$ L del buffer de reacción (10X); 1.25  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50 mM); 1.5 de dNTPs (10 mM, Bioron); 2.5  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmol/ $\mu$ L); 0.3  $\mu$ L de la *Taq* polimerasa (5 U/ $\mu$ L, Bioron); 12.45  $\mu$ L de agua bidestilada ultrapura; y 2  $\mu$ L del ADN extraído. Las PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400). Los productos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1%,

teñidos con 50  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio (Sigma) y fotografiados con el UVP Biodoc-It System. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 100 pb (Bioneer). Las cepas de control utilizadas en estos ensayos fueron: *K. pneumoniae* AMKP135-ULA (TEM-1 y SHV-5), *K. pneumoniae* LMM28-ULA (CTX-M-1), *K. pneumoniae* LMM29-ULA (CTX-M-2), *E. coli* XA3002-ULA (CTX-M-8) y *Citrobacter freundii* LMM07/10-ULA (CTX-M-9).

**Cuadro 1**  
**Datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes hospitalizados en áreas de medicina interna del HULA incluidos en este estudio**

Fecha de aislamiento	Número de cepa	Edad	Sexo	Área Hosp.	Diagnóstico
03/13	2206	35	F	T3	Quemadura de II grado infectada
03/13	2215	34	M	UCI	Sepsis
03/13	2796	50	M	UCI	Sepsis
04/13	2805	81	F	T3	Infección de herida quirúrgica
04/13	2805	81	F	T3	Infección de herida quirúrgica
04/13	2919	32	F	EA	Neumonía nosocomial
04/13	2936	22	M	UCI	Quemadura de II grado infectada
04/13	2976	18	M	EA	Infección urinaria
04/13	2980	21	F	T5	Infección de herida cortante de muslo derecho
05/13	3002	48	F	EA	Infección de cáncer exofítico de mama derecha ulcerado
05/13	3608	32	M	T6	Infección urinaria
05/13	3740	59	F	UCI	Neumonía nosocomial
06/13	3939	60	F	T5	Infección de herida quirúrgica
06/13	3960	52	F	T3	Infección urinaria
06/13	4088	26	M	T5	Sepsis
06/13	4762	30	M	T6	Infección urinaria
06/13	4861	47	M	TS	Sepsis
06/13	4990	71	M	T5	Neumonía nosocomial
07/13	5040	55	F	T6	Neumonía nosocomial
07/13	5042	22	M	TS	Neumonía nosocomial
07/13	5157	60	M	T6	Sepsis
07/13	5497	64	F	UCI	Neumonía nosocomial
07/13	5587	20	M	EA	Neumonía nosocomial
07/13	5724	25	F	T5	Neumonía nosocomial
07/13	5817	25	F	T5	Infección de úlcera en pie izquierdo
07/13	5901	30	M	EA	Absceso en glúteo derecho

Hosp: hospitalización; EA: emergencia de adultos; TS: trauma shock; UCI: unidad de cuidados intensivos; T3: hospitalización Piso 3; T5: hospitalización Piso 5; T6: hospitalización Piso 6.

**Cuadro 2**  
**Iniciadores utilizados en este estudio**

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Referencia
Fwbla <sub>CTX-M</sub>	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	21
Frbla <sub>CTX-M</sub>	CCG CTG CCG GTY TTA TCV CCB AC	
Fwbla <sub>CTX-M-1</sub>	ATG GTT AAA AAA TCA CTG C	21
Frbla <sub>CTX-M-1</sub>	GGT GAC GAT TTT AGC CGC	
Fwbla <sub>CTX-M-2</sub>	TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C	22
Frbla <sub>CTX-M-2</sub>	GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG C	
Fwbla <sub>CTX-M-8</sub>	TGA ATA CTT CAG CCA CAC G	23
Frbla <sub>CTX-M-8</sub>	TAG AAT TAA TAA CCG TCG GT	
Fwbla <sub>CTX-M-9</sub>	AAC ACG GAT TGA CCG TCT TG	23
Frbla <sub>CTX-M-9</sub>	TTA CAG CCC TTC GGC GAT	
Fwbla <sub>CTX-M-25</sub>	CGC CGA TAA CAC GCA GAC	23
Frbla <sub>CTX-M-25</sub>	CGG CTC CGA CTG GGT GAA GTA	
Fwbla <sub>SHV</sub>	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC	23
Frbla <sub>SHV</sub>	TTA GCG TTG CCA GTG CTC	
Fwbla <sub>TEM</sub>	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA	23
Frbla <sub>TEM</sub>	GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	

**Cuadro 3**

Distribución de la frecuencia de aislamiento de las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* de acuerdo con los diagnósticos clínicos y según el área de hospitalización del servicio de medicina interna del HULA

Diagnóstico clínico	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Núm. 14) núm. / %	<i>Escherichia coli</i> (Núm. 12) núm. / %
Neumonía nosocomial	4 / 28,57	4 / 33,33
Sepsis	4 / 28,57	1 / 08,33
Infección de herida no quirúrgica*	2 / 14,29	3 / 25,00
Infección urinaria	2 / 14,29	2 / 16,67
Infección de herida quirúrgica	2 / 14,29	1 / 08,33
Abscesos	0 / 00,00	1 / 08,33
Área de hospitalización		
Emergencia adultos (EA)	1 / 07,14	4 / 33,33
Trauma shock (TS)	2 / 14,28	0
UCI	3 / 21,43	2 / 16,67
Piso T3	2 / 14,28	2 / 16,67
Piso T5	3 / 21,43	3 / 25,00
Piso T6	3 / 21,43	1 / 08,33

\*Incluye quemaduras sobre infectadas, úlceras de miembros inferiores y heridas cortantes. UCI: Unidades de Cuidados Intensivos

**Cuadro 4**  
**Características fenotípicas y genéticas de las cepas *K. pneumoniae* y *E. coli* aisladas en pacientes con IACS en el servicio de medicina interna en HULA**

Enterobacteria Código de cepa	Perfil de resistencia	SDD	Detección de genes de $\beta$ -lactamasas*
<i>K. pneumoniae</i>			
3740	BLEE, CIP, GEN	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
4088	BLEE, ACN, CIP, AMK, GEN	+	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
2976	BLEE, ACN, CIP <sup>I</sup> , GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>
2980	BLEE, PIP/TZ <sup>I</sup> , CIP	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
3608	BLEE, PIP/TZ <sup>I</sup> , ACN, CIP, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
2806	BLEE, ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
2206	BLEE, PIP/TZ, ACN, CIP <sup>I</sup> , AMK, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
2796	BLEE, PIP/TZ, AMK	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>
5157	BLEE, ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
4861	BLEE	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
5040	BLEE, PIP/TZ <sup>I</sup> , ACN, CIP, AMK, GEN	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
5042	BLEE, CIP <sup>I</sup> , GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
3939	BLEE, ACN, CIP, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
5497	BLEE, ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
<i>E. coli</i>			
5817	BLEE, ACN, CIP, AMK, GEN	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
3960	BLEE, ACN, GEN	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>
2919	BLEE, ACN	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>
2936	BLEE, PIP/TZ <sup>I</sup> , ACN, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
2805	BLEE, ACN, CIP, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
2215	BLEE, ACN, CIP, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
3002	BLEE, PIP/TZ <sup>I</sup> , ACN, CIP, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
4990	BLEE, GEN	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>
4762	BLEE, ACN, CIP, GEN, TOB	+	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>
5587	BLEE, PIP/TZ, ACN, CIP, GEN	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
5724	BLEE, ACN, CIP	+	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>
5901	BLEE, ACN, CIP	+	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>

BLEE: Beta-lactamasa de espectro extenso; PIP/TZ: piperacilina/tazobactam; PIP/TZ<sup>I</sup>: piperacilina/tazobactam fenotipo intermedio; ACN: ácido nalidixico; CIP: ciprofloxacina; ; CIP<sup>I</sup>: ciprofloxacina fenotipo intermedio; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; SDD: sinergismo del doble disco. \* Característica genotípica confirmada en las respectivas células transconjugantes.

## Resultados

Catorce cepas de *K. pneumoniae* y 12 de *E. coli*, con susceptibilidad disminuida a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro fueron aisladas de pacientes con diversas IACS. La edad promedio de los pacientes fue de 42 años (rango de 18 a 81 años); el 50% correspondió al género femenino y el resto al masculino (cuadro 1). Seis diferentes diagnósticos relacionados con IACS fueron registrados. De estos, la neumonía fue la más frecuente (30.8%; 8/26), mientras que el segundo lugar con un 19.2% (5/26), lo compartieron la sepsis y las infecciones de heridas no quirúrgicas. En el tercer lugar se ubicaron las infecciones del tracto urinario con un 15.4% (4/26). La distribución de estas bacterias de acuerdo con el diagnóstico clínico y al área de hospitalización se muestra en el cuadro 3. Al respecto, se pudo observar que ambas enterobacterias se distribuyeron en igual número de casos en pacientes con neumonía nosocomial e infección urinaria (4 y 2, respectivamente). Sin embargo, *K. pneumoniae* predominó en pacientes con sepsis (4/5) e infección de heridas quirúrgicas (2/3), mientras que *E. coli* se aisló con más frecuencia en infecciones de heridas no quirúrgicas (3/5). En relación a la procedencia de las muestras clínicas analizadas, el 23.1% (6/26) fueron aisladas de pacientes con IACS reclusos en el piso 5 (T5) de hospitalización y el 19.2% (5/26) de las muestras se obtuvieron tanto del área de emergencia como de la unidad de cuidados intensivos (UCI).

El análisis de la antibiografía permitió evidenciar que tanto las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* mostraron perfiles de susceptibilidad compatibles con la producción de BLEE. En ambos casos la resistencia a cefotaxima fue mayor al 90% (CIM: 4 - 128) y para la ceftazidima superó el 58% (CIM: 8 - 128). Todas las cepas tuvieron muy baja sensibilidad al aztreonam demostrando resistencia entre 91.7% y 100%, respectivamente. El 100% de los aislados fueron inhibidos por el grupo de carbapenémicos en rangos iguales o inferiores a 0.5  $\mu$ g/ml (datos no mostrados). La prueba SDD fue coincidente con los resultados obtenidos en la CIM. En la mayoría de los aislados se observó la resistencia asociada a otros antibióticos, principalmente a quinolonas y aminoglucósidos. Todos los determinantes de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro fueron transferidos por conjugación en una frecuencia de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  transconjugantes/célula donadora. Estas células mostraron un patrón de resistencia similar a las cepas donadoras y fueron positivas a la prueba de SDD (datos no mostrados). En el cuadro 4 se resumen las características fenotípicas y la descripción genotípica de las cepas estudiadas. El gen *bla*<sub>CTX-M</sub> fue detectado en todas las cepas estudiadas, siendo el grupo *bla*<sub>CTX-M-1</sub> el más frecuente entre las cepas de *K. pneumoniae* (50%; 7/14) y el *bla*<sub>CTX-M-8</sub> en el grupo de *E. coli* (50%; 6/12). La presencia de un gen único de BLEE fue la característica genotípica más frecuente entre las cepas (53.8%; 14/26). Sin embargo, en el grupo bacteriano con mayor número de asociaciones de los genes *bla*<sub>BLEEs</sub> fue *K. pneumoniae* (50%; 7/14), siendo la combinación *bla*<sub>SHV</sub> + *bla*<sub>CTX-M-1</sub> la más común (3/7), seguido por el patrón *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>SHV</sub> + *bla*<sub>CTX-M-8</sub> (2/7). Por el contrario, en el grupo de *E. coli* se observó el mayor número de cepas con un gen único productor de  $\beta$ -lactamasa, representado exclusivamente por los genes

*bla*<sub>CTX-M</sub> (7/12). En el resto de las cepas (5/12), se detectaron asociaciones de 2 y 3 genes (4/12 y 1/12, respectivamente), destacando 2 patrones poco frecuentes en *E. coli*: *bla*<sub>CTX-M-8</sub> + *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>CTX-M-8</sub> + *bla*<sub>CTX-M-9</sub>.

## Discusión

La presencia de cepas de enterobacterias resistentes a los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro y a otros antimicrobianos, se ha convertido en un problema creciente en todo el mundo, especialmente en ambientes intrahospitalarios, debido a que contribuyen a elevar las tasas de morbilidad y los costos de las IACS.<sup>5,12,18</sup> En este contexto, desde hace más de una década se ha reportado un aumento de cepas de *K. pneumoniae* y otras enterobacterias multiresistentes productoras de BLEE como causantes de brotes de IACS en unidades de alto riesgo del HULA, Mérida, Venezuela. Estos brotes se han caracterizado por una situación epidemiológica compleja, en la cual se han involucrado clones diferentes, presencia de distintas BLEE y sus combinaciones, así como diversas estructuras genéticas que portan genes *bla*<sub>BLEEs</sub> que facilitan su diseminación.<sup>10,11,15-17</sup> Actualmente esta situación se mantiene, las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* aisladas en pacientes reclusos en distintas áreas de hospitalización del servicio de medicina interna del HULA, revelaron un perfil fenotípico compatible con la producción de BLEE, además de mostrar resistencia a otros grupos de antibióticos, tales como quinolonas y aminoglucósidos. Estas cepas estuvieron involucradas principalmente en pacientes con neumonía, sepsis, heridas no quirúrgicas e infecciones del tracto urinario. Aunque estudios epidemiológicos señalan que las unidades de cuidado intensivo y las quirúrgicas son las áreas de mayor riesgo para adquirir IACS,<sup>5,12,18</sup> en este trabajo se encontró que la mayoría de las cepas analizadas fueron aisladas de pacientes reclusos en áreas de hospitalización general para adultos. Es probable que esta particular distribución esté afectada por una permanencia hospitalaria prolongada, ocasionada no solo por la patología por la cual fue hospitalizado el paciente, sino por deficiencias y lentitud en la atención médica que conlleva al hacinamiento de estos, especialmente en instituciones de salud con recursos limitados.

Independientemente de la especie bacteriana aislada, todas las cepas fueron productoras de BLEE de tipo CTX-M. En las cepas de *K. pneumoniae* predominó la CTX-M-1 y la CTX-M-8 fue observada con mayor frecuencia en *E. coli*. En un estudio previo realizado en HULA, se reportó la circulación de *K. pneumoniae* productora CTX-M-1 y CTX-M-2 en neonatos con septicemia en unidades de alto riesgo neonatal.<sup>15</sup> Del mismo modo, en otras regiones del país, varios estudios confirmaron la presencia de enterobacterias productoras de CTX-M-1 y otras BLEE en hospitales públicos de Caracas y del oriente del país.<sup>12-14</sup> Particularmente, *K. pneumoniae* es el microorganismo productor de BLEE descrito con mayor frecuencia, probablemente por el hecho de que esta especie bacteriana presenta una plasticidad genética eficiente que le permite adquirir e



incorporar nueva información para adaptarse o sobrevivir en circunstancias hostiles, como lo es la presión selectiva de los antibióticos en ambientes intrahospitalarios.<sup>2,3</sup> En este contexto, es posible que la diseminación de los genes *bla*<sub>BLEEs</sub> en las áreas de medicina interna del HULA, sea de naturaleza policlonal, lo que pudiera estar reflejando un fenómeno endémico con factores y orígenes múltiples, dado por los antecedentes epidemiológicos registrados en este hospital desde el año 2000.<sup>10,11,15-17</sup>

Es importante destacar, que cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-8 no han sido reportadas en el país, por lo cual este sería el primer aislamiento de enterobacterias productoras de esta particular BLEE.

La asociación de diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas fue un hallazgo común entre las cepas, pudiéndose observar que la combinación SHV + CTX-M fue frecuente en ambos grupos bacterianos. Por otra parte, se encontró que asociaciones entre diferentes grupos de CTX-M, tales como CTX-M-8 + CTX-M-9 fueron observadas solo en cepas de *E. coli*; y en este mismo grupo bacteriano se detectó una cepa (*E. coli* N° 4990) con la combinación de genes *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>CTX-M-8</sub> + *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. La capacidad transferible demostrada por los genes *bla*<sub>BLEEs</sub> a través de los ensayos de conjugación y sus diversas asociaciones detectadas en cepas provenientes de pacientes con IACS, reclusos en diferentes áreas de hospitalización, podría indicar que existen mecanismos moleculares que facilitan los intercambios o re-arreglos genéticos entre bacterias, y cuya diseminación estaría siendo favorecida por elementos transmisibles como los plásmidos, transposones o integrones en la población bacteriana.<sup>15-17</sup>

La multirresistencia de patógenos causantes de IACS plantea retos importantes desde el punto de vista terapéutico.<sup>4,5</sup> En este estudio se pudo demostrar que todas las cepas fueron sensibles a los carbapenemes, de manera que estos se presentan como una opción válida para el tratamiento y control de las IACS. No obstante, existe el riesgo de que el uso abusivo o inapropiado conduzca a la

aparición de resistencia para este grupo de antibióticos, por lo cual obliga a una vigilancia estricta en cuanto a su utilización terapéutica.<sup>4,5</sup> Otras alternativas posibles son la colistina y la tigeciclina, sin embargo su prescripción se reserva para los casos en que las bacterias involucradas en la infección intrahospitalaria demuestren, a través de pruebas de laboratorio confiables, resistencia a los antibióticos de primera línea y/o los carbapenemes.<sup>24-26</sup>

Aunque una de las limitantes de este estudio fue el pequeño número de cepas analizadas, los hallazgos obtenidos demuestran la presencia de diversas variantes alélicas de BLEE en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* aisladas en pacientes adultos con IACS en el HULA, destacando la prevalencia de los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-8</sub> asociadas a otros determinantes de resistencia diferentes a los  $\beta$ -lactámicos. Por otra parte, hasta donde es de nuestro conocimiento, esta es la primera descripción en la región del gen *bla*<sub>CTX-M-8</sub> en cepas de *E. coli* y su asociación con otras BLEE como TEM y CTX-M-9.

Con base en los resultados, es necesario implementar programas de vigilancia epidemiológica que permitan racionalizar el uso de antimicrobianos de amplio espectro basados en la epidemiología local y en el mecanismo de resistencia presente, así como aplicar técnicas de caracterización molecular para la identificación de genes de resistencia y la tipificación de microorganismos, con el objeto de reducir el surgimiento y diseminación de clones resistentes.

## Agradecimientos

+

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA), código: FA-529-13-03-EE y por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), Venezuela (Proyecto N° 2012002321. Contrato N° 201201213).

## Referencias

1. Bonnet R. "Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes", *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48: 1-14.
2. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. "CTX-M enzymes: origen y diffusion ». *Frontiers microbiol.* 2012;3:doi:10.3389/fmicb.2012.00110.
3. Cantón R, Coque TM. "The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic". *Curr Opin Microbiol.* 2006;9: 466-475.
4. Pitout JDD. "Infections with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Changing epidemiology and drug treatment choices". *Drugs.* 2010;70: 313-333.
5. Alpuche-Aranda CM, Daza-Timaná CA. "Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos". *Enf Infec Microbiol.* 2002;22: 192-199.
6. Díaz MA, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A et al. "*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006)". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27: 503-510.
7. Coque TM, Baquero F, Canton R. "Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe". *Euro Surveill* 2008;13: 19044. Disponible online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>.
8. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. "Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in South America". *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 (suppl.1): 154-158.
9. 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 Publica.* 2011;6: 529-534.

10. Araque M, Nieves B, Ruíz O, Dagert M. "Caracterización de plásmidos que median la resistencia a múltiples antibióticos en bacterias gramnegativas de origen nosocomial". *Enferm Infect Microbiol Clin*. 1997;15: 299-305.
11. Araque M, Nieves B, Lauretti L, Rossolini GM. "Molecular basis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela". *Int J Antimicrob Agents*. 2000;15: 37-42.
12. Tedesco-Maiullari RM, Guevara A. "Epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido". *Rev Soc Ven Microbiol*. 2012;32: 101-106.
13. Redondo C, Chalbaud A, Alonso G. "Frequency and diversity of CTX-M enzymes among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from Caracas, Venezuela". *Microb Drug Resist*. 2013; 19: 42-47.
14. Guzmán M, Rodríguez E, Antón K, Silva S, Navarro J, Lastra L y col. "Genes  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{CTX-M}$  en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intra-hospitalaria". *Invest Clin*. 2013;54: 235-245.
15. Millán B, Castro D, Ghiglione B, Gutkind G, Araque M. "ISCR1 asociado a genes  $bla_{CTX-M-1}$  y  $bla_{CTX-M-2}$  en plásmidos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial en Mérida, Venezuela". *Biomédica*. 2013; 33: 268-275.
16. González AC, Nieves B, Solorzano M, Cruz J, Puig J, Moreno M. "Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos". *Rev Chil Infect*. 2013;30: 374-380.
17. Araque M, Rivera I. "Simultaneous presence of  $bla_{TEM}$  and  $bla_{SHV}$  genes on a large conjugative plasmid carried by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*". *Am J Med Sci*. 2004; 327: 118-122.
18. Echeverri-Toro, LM, Rueda ZV, Maya W, Agudelo Y, Ospina S. "*Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia". *Rev Chil Infect*. 2012;29: 175-182.
19. 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.
20. "Clinical and Laboratory Standards Institute". Document M100-S232. "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Table 2A. Zone diameter and minimal inhibitory concentration (MIC) interpretative standards for *Enterobacteriaceae* M02 and M07". Vol. 33, N° 1, 23<sup>th</sup> informational supplement. Wayne, PA: CLSI. 2013. p. 44-57.
21. Di Conza, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. "Novel class 1 integron (InS21) carrying  $bla_{CTX-M-2}$  in *Salmonella enterica* serovar infantis". *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2257-2261.
22. Eckert C, Gautier V, Arlet G. "DNA sequence analysis of the genetic environment of various  $bla_{CTX-M}$  genes". *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:14-23.
23. Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL *et al*. "Variety of TEM, SHV, and CTX-M type beta-lactamases presente in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* from Taiwan". *Microb Drug Resist* 2005;11: 31-39.
24. Giamarellou H, Poulakou G. "Multidrug-resistant Gram negative infections. What are the treatment options?" *Drugs*. 2009;69: 1879-1901.
25. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact". *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23: 320-326.
26. Giménez MJ, García-Rey C, Barberán J, Aguilar L. "Experiencia clínica con tigeciclina en el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por aislados con mecanismos de resistencia prevalentes". *Rev Esp Quimioter*. 2009;22: 48-56.