

Caracterización molecular de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*

Natividad Castro Alarcón, Etzel Damariz Carreón Valle,
María Elena Moreno Godínez,
Luz del Carmen Alarcón Romero¹

Molecular characterization of extended spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli*

Fecha de aceptación: junio 2008

Resumen

La resistencia a cefalosporinas de tercera generación aumenta cada vez más. Se debe a la adquisición y expresión de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) entre las bacterias Gram negativas. Por lo tanto, las infecciones causadas por aislamientos productores de BLEE continúan siendo un reto en el tratamiento de infecciones mundialmente. El objetivo fue determinar la existencia y, en su caso, describir las características fenotípicas y genotípicas de BLEE en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*. Se analizaron 30 aislamientos de pacientes con infección nosocomial en dos hospitales del estado de Guerrero, México. Los aislamientos fueron tomados durante el periodo de noviembre de 2002 a octubre de 2004. Se efectuaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y las β -lactamasas se caracterizaron por isoelectroenfoque (IFE) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizó la extracción de plásmidos y conjugaciones bacterianas. Los resultados mostraron que 17% de los aislamientos fueron resistentes a ceftriaxona, ceftazidima y cefepime. La proporción de aislamientos productores de BLEE fue de 40%. El IFE especificó seis β -lactamasas con puntos isoeléctricos de 5.4, 7.0, 7.6, 7.8, 8.2 y 9.0. La amplificación por PCR confirmó que los aislamientos de *E. coli* presentaban los genes bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{TLA} y bla_{CTX}. Quince de los aislamientos (50%) fueron capaces de transferir plásmidos de 93 y 170 kb. Este estudio mostró la presencia de genes que codifican para BLEE entre los aislamientos clínicos de *E. coli* en los hospitales. Se sugiere instituir un programa de control de infecciones y un sistema de vigilancia de resistencia a agentes antimicrobianos.

Palabras clave: *Escherichia coli*, β -lactamasas de espectro-extendido, características fenotípicas, características genotípicas

Abstract

Resistance to third generation cephalosporins is increasing. This resistance is explained by the acquisition and expression of extended spectrum β -lactamases (ESBL) enzymes among Gram-negative. Therefore, infections due to ESBL isolates continue to pose a challenge to infection management worldwide. The objective was to determine the existence of and describe phenotypic and genotypic characteristics of ESBL in *Escherichia coli* isolates. Thirty *E. coli* isolates were analyzed. The isolates were obtained from patients with nosocomial infection at two hospitals in the State of Guerrero, Mexico. They were collected during the period of November 2002 through October 2004. Antimicrobial susceptibility tests were performed and the β -lactamases were characterized by isoelectric focusing (IFE) and chain reaction of the polimerasa (PCR). Plasmid extraction and bacterial conjugations were performed as well. The results showed that 40% of these isolates were resistant to ceftriaxone, ceftazidime, and cefepime. The proportion of ESBL producers was 40%. The IEF demonstrated six β -lactamases with isoelectric points of 5.4, 7.0, 7.6, 7.8, 8.2 and 9.0. Specific PCR amplification confirmed that *E. coli* isolates harbored genes bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{TLA} and bla_{CTX}. Fifteen of the isolates (50%) were able to transfer plasmids of 93 and 170 kb. This study shows the presence of ESBL genes among *E. coli* isolates in the two hospitals. There is a need to institute strict hospital infection control policies and regular surveillance of resistance to antimicrobial agents.

Key words: *Escherichia coli*, extended-spectrum β -lactamases, phenotypic characteristics, genotypic characteristics

1. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, en la Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria, 39090 Chilpancingo, Guerrero, México. Teléfono/fax: 017474725503
Autor para Correspondencia: Natividad Castro-Alarcón: natycastro2@hotmail.com

Introducción

La producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es uno de los principales mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en las enterobacterias. Está bien documentado que las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son una importante causa de infecciones del tracto urinario (ITU), bacteriemias, neumonías asociada al cuidado de la salud y la hospitalización, así como varias infecciones intraabdominales.^{1,2,3} Dentro de esta familia de bacterias, la *Escherichia coli* es la causa más frecuente de ITU, así como de bacteriemias, de infecciones quirúrgicas y de enfermedades intraabdominales.^{1,4} Este tipo de infecciones son difíciles de controlar, debido a que se ha observado la emergencia y diseminación de enterobacterias resistentes a todos los antibióticos disponibles.³ Además, es importante mencionar que la tasa de mortalidad se ha correlacionado con el uso de tratamientos inapropiados y la falta de pruebas diagnósticas microbiológicas en la mayoría de los hospitales.^{5,6}

Los antibióticos β -lactámicos se prescriben en forma más frecuente si se comparan con otros antibióticos. Como consecuencia de su alto uso, se ha generado una resistencia, la cual, en la mayoría de los casos, es causada por β -lactamasas. Estas enzimas actúan rompiendo el anillo β -lactámico e inhibiendo así su actividad.⁷ A las primeras β -lactamasas aisladas se les denominó β -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1); posteriormente se confirmó que ofrecían resistencia a la ampicilina y amoxicilina, pero no a cefalosporinas de tercera generación.³ La presencia de mutaciones en los genes que codifican para estas enzimas dio origen a nuevas β -lactamasas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam, a las que se le denominó BLEE.⁸ Durante las dos últimas décadas, las cefalosporinas de amplio espectro, incluidos antibióticos oximino- β -lactámicos se han usado ampliamente. Como consecuencia, han emergido enterobacterias productoras de BLEE, predominantemente cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*.³ Además de las enzimas clásicas tipo TEM y SHV, las enzimas BLEE tipo CTX-M se han incrementado en todo el mundo en años recientes. En contraste con las BLEE tipo TEM y SHV, las enzimas CTX-M son mucho más activas contra cefotaxima y ceftriaxona que contra ceftazidima.^{9,10} La resistencia a cefalosporinas de espectro extendido en las cepas de *E. coli* está frecuentemente asociada con plásmidos que codifican para BLEE. Esto ocasiona un problema, ya que pueden llevar otros genes que confieren resistencia a otros agentes antimicrobianos, como aminoglucósidos y

fluoroquinolonas, que pueden ser transferidos entre especies no relacionadas.^{3,11}

La producción de BLEE en *E. coli* se ha incrementado en forma significativa en varios países. Por ejemplo, en España reportaron 30.8% de CTXM-15,⁹ en Argentina detectaron la presencia de BLEE tipo SHV, PER-2 y CTXM-2¹¹ y en hospitales de Rusia las β -lactamasas CTXM-3 y CTXM-15 fueron debidamente identificadas.¹⁰ En Sudáfrica se encontró una diversidad de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE y se ha especulado que la producción de estas enzimas se ha vuelto endémica, donde la evolución está generando un amplio rango de combinaciones.¹² En el caso particular de México, muy pocos estudios han reportado el problema de las BLEE. Una excepción lo son el estudio de Miranda *et al.*,¹³ quienes reportaron la presencia de BLEE tipo SHV-2 y SHV-5 en aislamientos de *K. pneumoniae* en un hospital pediátrico de la Ciudad de México y el trabajo de Silva *et al.*,¹⁴ quienes identificaron una β -lactamasa autóctona de un aislamiento de *E. coli* a partir de ITU, que denominaron TLA-1. El objetivo de esta investigación fue determinar la existencia y, en su caso, describir las características fenotípicas y genotípicas de BLEE en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*. Estos resultados permitirán conocer las β -lactamasas seleccionadas *in vivo* en dichos hospitales y servirán de base para estudios posteriores.

Material y métodos

Se analizaron 30 aislamientos clínicos de *E. coli*, de los cuales, 43% fueron obtenidos en el Hospital General de Chilpancingo y 57% en el Hospital General de Acaapulco, ambos localizados en el estado de Guerrero, México. Los aislamientos se llevaron a cabo en el período de noviembre de 2002 a octubre de 2004 y procedían del área de cirugía (71%) y pediatría (13%). Se procedió a su identificación mediante el sistema API 20E (bioMérieux SA). Las cepas fueron mantenidas a -70 °C en una mezcla de caldo Luria Bertoni (LB) y glicerol.

La susceptibilidad a 15 antibióticos se determinó por la técnica de difusión en agar Muller-Hinton. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó utilizando la técnica de dilución en placa, que utiliza concentraciones crecientes (0.031 a 256 $\mu\text{g/ml}$) de los antibióticos ceftazidima y cefotaxima. Se realizó la prueba de doble disco combinado para confirmar la

producción de BLEE con base en las recomendaciones del CLSI.¹⁵ Se emplearon discos de cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg) solos y en combinación con ácido clavulánico (10 µg).

Con respecto a la determinación del punto isoelectrico de las β-lactamasas, se procedió como sigue. Los extractos crudos de β-lactamasas obtenidos por roturación de cultivos celulares con perlas de vidrio se analizaron mediante isoelectroenfoque (IEF) sobre geles de poliacrilamida con rangos de pH 3-9, en el equipo PhastSystem (Farmacia). Las β-lactamasas se detectaron por hidrólisis de nitrocefina (500 mg/ml). Los valores de los puntos isoelectricos (pI) se determinaron siguiendo el método descrito por Matthew *et al.*,¹⁶ que utiliza la comparación de β-lactamasas de punto isoelectrico conocidos. Cuando la hidrólisis de nitrocefina se hizo evidente (bandas anaranjadas), se continuó con la prueba biológica.

Con el fin de detectar la actividad frente a ceftazidima o frente a cefotaxima de las β-lactamasas separadas por isoelectroenfoque, se realizó el bioensayo descrito por Silva y Aguilar-Zacarias.¹⁷ El gel de poliacrilamida previamente impregnado con ceftazidima o cefotaxima (500 µg/ml) se incubó en una cámara húmeda a 37 °C, durante 20 min para permitir la hidrólisis total de la cefalosporina por β-lactamasas separadas. De esta manera, el gel se cubrió con células de la cepa de *E. coli* J53-2, sensible a ceftazidima y cefotaxima, suspendidas en agar suave (0.7%). Después de incubar en cámara húmeda a 37 °C, se registraron los puntos de crecimiento bacteriano sobre el gel para establecer el valor de pI de la enzima con capacidad de hidrolizar el antibiótico.

Para el análisis de plásmidos, se procedió a la extracción del ADN de los aislamientos clínicos conforme a la técnica descrita por Kiesser.¹⁸ El ADN fue visualizado después de la electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.7% teñidos con bromuro de etidio. Como marcadores de peso molecular se usaron los siguientes plásmidos; R6K (40kb), RP4 (50kb), IR (93 kb) y pUD21 (170 kb). La transferencia de plásmidos por conjugación se realizó de acuerdo con el método descrito por Miller.¹⁹ Se promovió la conjugación entre los aislamientos clínicos y *E. coli* J53-2 (F, *pro*, *met*, Rif^r). En todos los casos las transconjugantes fueron seleccionadas en medio Luria Bertoni suplementado con rifampicina (200 µg/ml) en combinación con cefotaxima (1 µg/ml) o ampicilina (100 µg/ml). Las cepas transconjugantes se verificaron por la técnica de replicación en palillo que emplea placas de medio mínimo con L-metionina, L-prolina y sin ningún aminoácido.

Para la identificación de genes *bla* se utilizó PCR, para lo cual se amplificaron diferentes genes *bla* (TEM, SHV, CXT y TLA-1) por reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizaron iniciadores específicos descritos en forma previa que se presentan en el Cuadro 1. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 50 µl. Se emplearon 5 µl de ADN molde. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 30 min, donde se verificó el tamaño del ADN amplificado, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Se incluyó un control negativo, así como un control positivo para cada gen.

Cuadro 1
Secuencia de iniciadores y condiciones de PCR utilizados para la identificación de genes *bla*

Gen	Iniciadores	Tamaño del fragmento (pb)	No. de ciclos de la PCR	Ref.
<i>bla</i> _{TEM}	5' TTGGGTGCACGAGTGGGTTA3' 5' TAATTGTTGCCGGGAAGCTA3'	503	30 (2 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C, 1 min)	20
<i>bla</i> _{SHV}	5' ATGCGTTATATTCGCCTGTG3' 5' GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG3'	906	35 (30 s a 94°C, 30 s a 48°C, 30 s a 72°C, 1 min)	12
<i>bla</i> _{CTX-M}	5' TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA3' 5' CGATATCGTTGGTGGTGCCAT3'	544	35 (30 s a 95°C, 30 s a 58°C, 30 s a 72°C, 1 min)	10
<i>bla</i> _{TLA-1}	5' GAAGAAATGCACAAGGCATGG'3 5' CTAGTTAAGGATGGGAAATAG'3	920	35 (30 s a 95°C, 30 s a 48°C, 1 min a 72°C, 1 min)	14

Resultados

Ochenta y seis por ciento de los antibióticos beta-lactámicos fueron resistentes a ampicilina, 17% a ceftriaxona, ceftazidima y cefepime, así como 20% resistentes a aztreonam. Todas las cepas fueron sensibles a imipenem. Cuarenta y tres por ciento de las cepas fueron resistentes a cloranfenicol, 37% a ciprofloxacina, 23% a amikacina, 33% a gentamicina y 57% resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol. Doce cepas en total (40%) fueron productoras de BLEE. En el Cuadro 2 se presentan los diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos utilizados en el tamiz, así como su sensibilidad al resto de los antibióticos probados. De estas

cepas, sólo tres aislamientos fueron resistentes a aztreonam (≤ 15 mm), ceftriaxona (≤ 13 mm), ceftazidima (≤ 14 mm) y cefotaxima (≤ 14 mm) (aislamientos 241, 270 y 983). Estos resultados indican que la mayoría de las cepas productoras de BLEE son sensibles fenotípicamente a las cefalosporinas de tercera generación. En estas cepas, los patrones de resistencia al resto de los antibióticos fueron variados. Se identificaron cepas resistentes a ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol. El rango de concentración inhibitoria mínima (CIM) para la cefotaxima fue de 0.125 a 256 $\mu\text{g/ml}$ y para la ceftazidima, de 0.5 a 64 $\mu\text{g/ml}$.

Cuadro 2
Patrones de susceptibilidad de aislamientos de *Escherichia coli* productores de β-lactamasas de espectro extendido

		Número de Aislamiento											
		684	744	749	772	808	826	932	983	241	204	235	270
Tamizaje y confirmación BLEE (mm)	ATM	29	27	28	34	29	27	25	14	11	28	27	9
	CRO	25	23	25	30	25	25	22	6	6	25	24	6
	CAZ	30	29	30	27	31	25	30	22	30	29	33	6
	CTX	32	30	31	25	35	28	33	6	32	33	35	21
	CAZ+	35	34	35	33	37	36	36	34	35	35	38	22
	CTX+	38	36	36	32	49	14	39	35	37	38	40	25
Difusión en disco	AMP	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
	SAM	R	R	R	I	I	S	R	R	R	I	R	R
	AMC	R	R	R	R	I	S	R	R	R	I	R	R
	FEP	S	S	I	S	S	S	S	R	R	S	S	I
	C	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	R
	CIP	R	R	S	S	R	S	S	R	I	I	S	R
	AK	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	CN	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
	SXT	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R

ATM: aztreonam; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; CAZ+: ceftazidima más clavulanato; CTX+: cefotaxima más clavulanato; AMP: ampicilina; SAM: ampicilina/sulbactam; AMC: Amoxicilina/clavulanato; FEP: cefepime; C: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacina; AK: amikacina; CN: gentamicina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol; S: sensible; I: intermedio; R: resistente

En los aislamientos productores de BLEE sólo se determinaron tres aislamientos con CIM de ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ indicativa de resistencia a ceftazidima, y dos aislamientos con CIM de ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ indicativa de resistencia a cefotaxima (Cuadro 3). Las resistencias a ceftazidima y cefotaxima detectadas por difusión en disco y dilución en agar no fueron concordantes en los aislamientos y la mayor parte de las cepas productoras de BLEE son sensibles a estos antibióticos por ambos métodos.

Los aislamientos analizados presentaron entre 1 y 3 β -lactamasas con pl de 5.4, 7.0, 7.6, 7.8, 8.2 y 9.0 de manera combinada. Estos valores sugieren la presencia de β -lactamasas tipo TEM, SHV, CTX y TLA-1. Los puntos isoelectrónicos más frecuentes fueron 5.4 en 76.6% (23/30), 8.2 en 30% (9/30) y 7.6 en 23.3% (7/30). El pl de nueve se detectó en 20% de las cepas y los pls de 7.0 y 7.8 fueron los menos frecuentes con dos aislamientos cada uno. En el Cuadro 3 se presentan los datos epidemiológicos y la caracterización molecular de los aislamientos clínicos de *E.*

coli productores de BLEE. El bioensayo para detectar BLEE separadas por isoelectroenfoque mostró que tres de los 30 aislamientos produjeron BLEE (aislamientos 684, 241 y 270), cuyos puntos isoelectrónicos fueron 7.0, 7.8, 8.2 y 9.0. La amplificación del gen *bla* se realizó en todos los aislamientos clínicos. Ochenta por ciento (24/30) de las cepas presentó el gen *bla*_{TEM} y 43% (13/30) el gen *bla*_{CTX-M}. Todos los aislamientos productores de β -lactamasas con pl de 5.4 amplificaron para el gen *bla*_{TEM}, mientras que el gen *bla*_{CTX} se amplificó en cepas productoras de β -lactamasas con pl de 7.6 a 9.0. En dos cepas se amplificó el gen *bla*_{SHV} las cuales fueron productoras de β -lactamasas con pl de 8.2. Sólo en dos aislamientos se detectó el gen *bla*_{TLA}, con pl de 9.0. Además, estos dos aislamientos no fueron detectados como productores de BLEE en la prueba fenotípica. Cincuenta por ciento de las cepas conjugó en los antibióticos seleccionados: ampicilina y/o cefotaxima. Se notaron plásmidos de 90 y 170 kb y se detectaron cepas que conjugaron, pero no se encontraron los megaplásmidos buscados y viceversa, es decir, cepas con plásmidos que no conjugaron.

Cuadro 3
Información epidemiológica y molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido

Aisl. núm.	684	744	749	772	808	826	932	983	241	204	235	270
Fecha de aislamiento	05/07/03	13/09/03	18/09/03	15/10/03	26/10/03	03/12/03	06/08/04	08/10/04	29/10/03	15/11/02	05/09/03	24/05/04
Fuente de aislamiento	Hx quirúrgica	Hx quirúrgica	Hx quirúrgica	Pen - rose	Hx quirúrgica	Hx quirúrgica	Hx quirúrgica	Sec bronquial	Hx quirúrgica	Hx quirúrgica	Hx quirúrgica	Hx quirúrgica
Servicio	Pediatría	Cirugía	Cirugía	Cirugía	Traumatología	Cirugía	Cirugía	UCI	Med. Interna	Cirugía	Pediatría	Cirugía
CIM CAZ	1	1	1	0.5	0.5	32	0.5	32	4	4	0.5	64
CIM CTX	0.25	0.5	0.5	0.125	0.125	4	0.125	256	256	16	0.062	8
Puntos isoelectrónicos	5.4, (7)	5.4, 7.6	5.4, 7.6, 8.2	7.6, 8.2	5.4, 8.2	8.2	5.4, 7.6	5.4, 7.6, 8.2	(7.8), (8.2)	5.4	5.4, 9	5.4, (7), (9)
PCR TEM	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
PCR SHV	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
PCR CTX-M	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
PCR TLA-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conjugación	8 x 10 ⁻⁷	8 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	No conjugó	4 x 10 ⁻⁷	No conjugó	No conjugó	No conjugó	4 x 10 ⁻⁷	2 x 10 ⁻⁵	No conjugó
Plásmido	93 kb	-	-	-	-	93 kb	93 kb	170 kb	170 kb	170 kb	170 kb	93 kb

Aisl. núm.: número de aislamiento; CIM: concentración inhibitoria mínima; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; UCI: Unidad de cuidados intensivos; 02: 2002; 03: 2003; 04: 2004.

Discusión

Este estudio constituye una evidencia de la presencia de genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido en cepas de *E. coli*. Esta bacteria es un patógeno importante en el ambiente hospitalario y frecuentemente se le relaciona con infecciones nosocomiales, sobre todo, en unidades de cuidados intensivos y salas de pediatría. Su elevada resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas es un problema clínico en la actualidad. Estas bacterias han sido catalogadas como uno de los principales reservorios de genes de β -lactamasas mediada por plásmidos conjugativos, hecho que ha permitido que sean diseminadas hacia bacilos Gram negativos, especialmente en el ambiente hospitalario.³

En esta investigación, la mayoría de las cepas productoras de BLEE fueron sensibles a cefotaxima y/o ceftazidima por las pruebas de susceptibilidad *in vitro* (difusión en disco y dilución en agar), de acuerdo con los cortes establecidos por el CLSI (2005). Estos resultados fueron indicativos del fenómeno de resistencia oculta en estos aislamientos, por lo que el CLSI (2005) recomendó que los laboratorios reportaran aislamientos productores de BLEE como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, sin considerar los resultados *in vitro*. La detección de BLEE por medio del fenotipo de resistencia, como lo sugiere Familietti,²¹ fue difícil de establecer en estos aislamientos clínicos. Sin embargo, la técnica de disco combinado podría ser una alternativa en los centros hospitalarios del país para el análisis confirmatorio de la producción de BLEE. De esta manera, se podría contribuir a un mejor tratamiento de los pacientes infectados con este tipo de cepas y evitar fracasos en la terapia.

La detección microbiológica de BLEE fue ratificada por isoelectroenfoque y PCR, lo que permitió detectar gran variedad de β -lactamasas del tipo TEM, SHV, CTX-M y TLA-1. En la mayoría de los casos, estas enzimas fueron producidas por la misma bacteria. La β -lactamasa más frecuente fue de pl de 5.4 (76.6%), la cual no fue de espectro extendido y posiblemente corresponde a la TEM. Estos resultados son similares a los reportados por Vignoli *et al.*,²² quienes realizaron una investigación en Argentina con cepas de *E. coli* portadora del gen *bla*_{TEM-116} con pl de 5.4. Las β -lactamasas CTX-M se han reportado con puntos isoeléctricos de 7.6 a 9.0, caracterizadas por su gran actividad hidrolítica frente a cefotaxima y poca o ninguna actividad frente a ceftazidima. Además, diversos estudios han reportado la presencia de BLEE tipo CTX-M en diversas partes del mundo.^{6, 9, 10, 11, 23} Es importante

mencionar que este es el primer reporte de la presencia de BLEE tipo CTX-M en hospitales en México.

Con los bioensayos para determinar la actividad hidrolítica de enzimas separadas por isoelectroenfoque fue posible identificar un aislamiento (684) con pls de 5.4, (7.0) portador del gen *bla*_{TEM}, y un aislamiento (270) con pls de 5.4, (7.0), (9.0) portador de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX}. Las β -lactamasas tipo SHV son las reportadas con pl de (7.0), las cuales no fueron amplificadas en estos aislamientos. Nuestra hipótesis es que es probable que se trate de una BLEE que no ha sido reportada. Por tanto, es conveniente un estudio más amplio para conocer la prevalencia de BLEE en enterobacterias causantes de infección intrahospitalaria.

La resistencia simultánea a diferentes clases de antibióticos (multirresistencia) en enterobacterias se debe a la diseminación de genes portados por elementos genéticos transferibles y de la selección de cepas por el uso inadecuado de antibióticos.³ En este estudio, la resistencia simultánea a gentamicina, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol en aislamientos productores de BLEE, posiblemente esté codificada en los megaplásmidos detectados, los cuales pudieron ser transferidos por conjugación. Estos resultados podrían ser el reflejo de una posible diseminación horizontal de estas cepas dentro de los hospitales. Por otro lado, estas cepas también podrían ser diseminadas entre pacientes en la comunidad, como lo demostró un estudio realizado en la región de Calgary, Canadá.²⁴ Una limitante de este estudio fue no contar con técnicas moleculares para la caracterización epidemiológica que pudiera demostrar la diseminación clonal de los aislamientos de *E. coli* en el ambiente hospitalario.

No obstante, la importancia de este estudio radica en el conocimiento y difusión en el sector salud, y farmacéutico de los diferentes mecanismos que están favoreciendo la resistencia bacteriana. Cabe mencionar que si en algunos países de primer mundo se realizan estudios de este tipo, en nuestro país es aun más importante para contribuir a la prevención como medio para contrarrestar el impacto tanto epidemiológico como económico de la resistencia bacteriana y su modo de transmisión. Los resultados en estos hospitales podrían ser el reflejo de lo que ocurre en otros centros hospitalarios en México de similar complejidad, por lo que hay necesidad de instituir un programa de control de infecciones y un sistema de vigilancia de resistencia a agentes antimicrobianos.

Referencias

1. Ronald A. "The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens". *Am J Med* 2002; 113: 14S-19S
2. Carratalà J, Mykietiuik A, Fernández-Sabé N, Suárez C, Dorca J, Verdaguer R, Manresa F, Gudiol F. "Health care-associated pneumonia requiring hospital admission: epidemiology, antibiotic therapy, and clinical outcomes". *Arch Intern Med* 2008; 168:109-10
3. Paterson DL. "Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae". *Am J Med* 2006; 119: 520-528
4. Dupont H. "The empiric treatment of nosocomial intra-abdominal infections". *Int J Infect Dis*. 2007; 11: S1-6
5. Kang CI, Kim SH, Park W, Lee KD, Kim HB, Kim EC, *et al*. "Bloodstream Infections Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Mortality and Treatment Outcome, with Special Emphasis on Antimicrobial Therapy". *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4574-4581
6. Blomberg BR, Jureen K, Manji B, Tamim D, Mwakagile W, Urassa M, *et al*. "High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by Gram negative bacteria with extended spectrum β -lactamases in Dar Es Salaam, Tanzania". *J Clin Microbiol* 2005; 43: 745-749.
7. Livemore DM. " β -lactamases in laboratory and clinical resistance". *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584
8. Bradford PA. "Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat". *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-9551
9. Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, *et al*. "Spread of *Escherichia coli* strain with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions". *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2359-2366
10. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I y 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
11. Quinteros M, Radice M, Rodríguez M, Costa N, Korbenfeld D, Couto E, *et al*. "Extended spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals". *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2864-2867
12. Essack SY, Hall LM, Pillay DG, Mcfadyen ML y Livemore DM. "Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended spectrum β -lactamases isolated in 1994 y 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa". *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 88-95
13. Miranda G, Castro N, Leaños B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, *et al*. "Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended spectrum β -lactamase in a Mexican Pediatric Hospital". *J Clin Microbiol* 2004; 42: 30-35
14. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, *et al*. "TLA-1: a new Plasmid-Mediated Extended-Espectrum β -Lactamase from *Escherichia coli*". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 997-1003
15. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI/NCCLS). 2005c. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA
16. Matthew M, Harris AM, Marshall MJ y Ross GW. "The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases". *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-78
17. Silva J y Aguilar-Zacarias C. " β -lactamases Bioassay: A simplified method to determine extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in enterobacterias". *Arch Med Res* 1997; 28: 285-287
18. Kiesser T. "Factors affecting the isolation of DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*". *Plasmid* 1984; 12: 10-36
19. Miller JH. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA: Cold Spring Harbor, 1992: 82-85
20. Arlet G y Philippon A. "Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferible β -lactamases (TEM, SHV, CARB)". *FEMS Microbiol. Lett* 1991; 82: 19-26
21. Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Ficola F, Radice M, *et al*. "Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae". *Rev Argen de Microbiol* 2005; 37: 57-66
22. Vignoli R, Varela G, Mota M, Cordeiro N, Power P, Ingold E, *et al*. "Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay". *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2940-2943
23. Ndugulile F, Jureen R, Harthung S, Urassa W y Langeland N. "Extended Spectrum β -Lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an Intensive Care Unit of a tertiary health facility in Tanzania". *BMC Infect Dis* 2005; 5: 86
24. Pitout JD, Gregson D, Church D, Elsayed S y Laupland K. Community wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 β -lactamase producing *Escherichia coli* strains in the Calgary Health region. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2844-2849

Agradecimientos

Agradecemos a la QFB. Amparo Calderón Navarro (SSA Guerrero) por haber recolectado las cepas, y al Dr. Jesús Silva Sánchez (Instituto Nacional de Salud Pública, México), por haber proporcionado los iniciadores para la amplificación del gen bla_{TLA-1}, así como las cepas control utilizadas en el presente estudio.