UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Estudio molecular de resistencia bacteriana a antibióticos b-lactámicos en hospitales de Loja.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Calva Delgado, Diana Yessenia.

DIRECTORA: Baculima Peña, Daysi Eliana, Mgrt.

CO-DIRECTOR: Ausili, Alessio, Dr.

LOJA-ECUADOR

2016

Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Daysi Eliana Baculima Peña

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Estudio molecular de resistencia bacteriana a antibióticos b-lactámicos en hospitales de Loja, realizado por Calva Delgado Diana Yessenia, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, julio del 2016

f…….

Mgrt. Daysi Eliana Baculima

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Calva Delgado Diana Yessenia declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Estudio molecular de resistencia bacteriana a antibióticos b-lactámicos en hospitales de Loja, de la Titulación Bioquímica y Farmacia ECTS 1C, siendo la Mgrt. Daysi Eliana Baculima Peña directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f……..

Calva Delgado Diana Yessenia

CI. 1900738624

DEDICATORIA

En señal de agradecimiento, dedico este esfuerzo y logro a mi padre celestial Dios, por brindarme las fuerzas necesarias para seguir en pie ante las diferentes adversidades que se me han presentado y a Jesús por ser mi guía y compañía en toda mi existencia.

A Santos Calva por ser la figura sólida, protectora y admirable que me ha acompañado a dar pasos firmes a lo largo de mi vida y a Mercedes Delgado por su apoyo y consejos me permitieron tomar las mejores decisiones; ambos mis amados padres quienes han obsequiado sus mejores años de vida en formarme con amor y dedicación para ser cada día una mejor persona con buenas convicciones.

A mi querida hermana Viviana Calva, mi compañera de vida, por ser la persona quien me ha entregado su paciencia, atención y ánimos para no rendirme ante los obstáculos.

"Ellos son la inspiración y la cuna
de mis mejores logros"
Diana Calva.

AGRADECIMIENTO

Primeramente quiero agradecer de forma sincera a mi Co-director de tesis, Dr. Alessio Ausili, por haberme brindado la oportunidad de hacer provecho de sus valiosos conocimientos, gran paciencia, orientación y motivación que han sido fundamentales para llevar a cabo de forma experimental la presente tesis.

De la misma forma Agradezco a mi Directora de tesis, Mgrt. Eliana Baculima, quien me ha ofrecido su saber académico, tiempo y paciencia para desarrollar teóricamente de forma admisible mi tesis.

Ambos por su dedicación y disposición, han logrado internar en mí un gran sentido de deuda, respeto y admiración por todas las destrezas y conocimientos que me han inculcado durante todo el periodo de tiempo que ha concurrido durante la presente Tesis.

También quiero manifestar mi agradecimiento a Dios y a mis padres Santos y Mercedes quienes me han brindado la oportunidad de ingresar a la prestigiosa Universidad Técnica Particular de Loja, para llegar a convertirme en una profesional y ante ello dar mi primer paso a un futuro prometedor. Asimismo reitero mis agradecimientos a los docentes que me formaron académicamente durante todo los años cursados en la carrera de Bioquímica y Farmacia.

“La grandeza radica no en ser fuerte,
sino en el correcto uso de la fuerza.”
Henry Ward Beecher

ÍNDICE DE CONTENDOS

CARÁTULA……..... i

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN……..…….. ii

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS……..... . iii

DEDICATORIA……... …… iv

AGRADECIMIENTOS……..... v

ÍNDICE DE CONTENDOS ……..……. vi

RESUMEN …… 1

ABSTRACT …….…….. 2

INTRODUCCIÓN…….. 3

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO ……..…… 5

1.1. Antecedentes …….…… 6

1.2. Generalidades de las bacterias gram negativas…… 6

1.2.1. Enterobacteriaceae. ……... 8

1.2.1.1. Escherichia coli. …… 8

1.2.1.2. Enterobacter. ……..… 8

1.2.1.3. Citrobacter……... 8

1.2.1.4. Klebsiella. …… 9

1.2.1.5. Proteus…… 9

1.2.2. Bacilos Gram negativos no fermentadores. …… 9

1.2.2.1. Pseudomona. ……... 10

1.2.2.2. Acinetobacter. …….. 10

1.3. Mecanismo de ingreso de los microorganismos. …….. 10

1.4. Mecanismo de Resistencia. …….. 11

1.4.1. Clasificación de betalactamasas plasmídicas. ……..… 13

1.4.1.1. *Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).* ……..… 13

1.4.1.2. Betalactamasas de tipo AmpC. …… 15

1.5. Uso de antibióticos. …… 16

1.6. Antibióticos betalactámicos. ……... 16

1.6.1. Mecanismo de acción. …… 16

1.6.2. Clasificación y estructura de los antibióticos betalactámicos. …… 16

1.7. Epidemiología en Ecuador. 18

CAPÍTULO II: OBJETIVOS..... 19

2.1. Objetivo General. 20

2.2. Objetivos específicos. 20

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA..... 21

3.1. Tipo de Estudio. 22
3.2. Muestra.. 22
3.3. Materiales y métodos del trabajo experimental. 22
3.3.1. Preparación de stocks de bacterias..... 23
3.3.2. Siembra de stock de bacterias. 23
3.3.3. Extracción de DNA. 23
3.3.4. Preparación de primers. 24
3.3.4.1. Preparación de multimix de primers..... 25
3.3.5. Preparación del DNA para PCR multiplex..... 26
3.3.5.1. Condiciones de PCR. 26
3.3.6. Electroforesis y visualización..... 26
3.3.7. Secuenciación. 27
3.3.8. Estudio estadístico. 29

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 30

4.1. Determinación de la presencia de genes BLEE y AmpC. 31
4.2. Determinación de los grupos de genes BLEE y AmpC independientemente a la cepa bacteriana. 32
4.3. Determinación del número de diferentes genes encontrados por muestra..... 34
4.3.1. Identificación de un solo grupo génico por cepa bacteriana..... 36
4.3.2. Determinación de frecuencias de más de dos grupos génicos diferentes por cepa bacteriana. 37
4.4. Determinación de variantes de genes BLEE por Secuenciación. 42
4.4.1. Identificación de Variantes TEM. 42
4.4.2. Identificación de Variantes OXA. 43
4.4.3. Identificación de Variantes SHV. 45
4.4.4. Identificación de Variantes CTX-M1. 46
4.4.5. Identificación de Variantes de CTX-M2 48
4.4.6. Identificación de Variantes de CTX-M9. 49
4.5. Determinación de Variantes AmpC. 50

4.5.1. Variantes DHA ……. 51
4.5.2. Variantes CIT. …….. 52
4.5.3. Variante MOX. …….. 53
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES …… 55
RECOMENDACIONES …….. 58
BIBLIOGRAFIA …… …… 59
ANEXOS …… …… …….. 68

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 1: Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas……..... 7
Figura 2: Mecanismo infección de *E. coli*……...…….……..... 11
Figura 3: Mecanismo de resistencia bacteriana……...……....12
Figura 4. Estructura del antibiótico betalactámico…….. 17
Figura 5: Crecimiento de cuatro cepas distintas de bacterias en agar MacConkey……..... 23
Figura 6: Esquema de agrupaciones de primers por tubo eppendorfs……...……. 25
Figura 7: Comparación de bandas de los geles: mPCR1, mPCR2 y mPCR…..…….27
Figura 8: Secuencia resultante de TEM……..……...…….. 28
Figura 9: Similitud porcentual de secuencia en BLAST..……...…….29
Gráfico 1: Frecuencias de genes tipo BLEE y AmpC. ……...… 31
Gráfico 2: Frecuencias de tipos de genes BLEE por muestra……..…….… 33
Gráfico 3: Frecuencias de genes tipo AmpC por muestra….....…….….. 34
Gráfico 4: Frecuencia de número de genes diferentes por muestra…….……...…. 35
Gráfico 5: Frecuencia de un solo tipo de gen por muestra…….....…….. 36
Gráfico 6: Frecuencia de dos tipos de genes por muestra……...…….. 38
Gráfico 7: Frecuencia de tres tipos de genes por muestra …….....40
Gráfico 8: Frecuencia de cuatro y cinco tipos de genes por muestra…….….41
Gráfico 9: Frecuencia de tipos de variantes TEM…….….43
Gráfico 10. Frecuencia de tipos de variantes OXA…….…. 44
Gráfico 11: Frecuencia de tipos de variantes SHV…… 45
Gráfico 12: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M1…….… 47
Gráfico 13: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M2……...……..… 48
Gráfico 14: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M9……...…….…… 50
Gráfico 15: Frecuencia de tipos de variantes DHA……...…….... 51
Gráfico 16: Frecuencia de variantes CIT……..... 52
Gráfico 17: Frecuencia de variantes MOX……...…….…. 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de CTX-M según su homología……..... 15

Tabla 2: Clasificación y espectro antimicrobiano de antibióticos betalactámicos…..…..….. 17

Tabla 3: Cepas bacterianas identificadas…….....……22

Tabla 4: Concentraciones y parámetros de primes …….…….. 25

Tabla 5: Frecuencia de genes BLEE y AmpC por cepa bacteriana…….…… 32

Tabla 6: Frecuencia de número de genes diferentes por cepa bacteriana…….…… 35

Tabla 7: Frecuencia un solo tipo de gen por cepa bacteriana…….…… 37

Tabla 8: Frecuencia dos tipos de genes por cepa bacteriana…….…… 38

Tabla 9: Frecuencia de tres tipos de genes por cepa bacteriana……..…….…… 40

Tabla 10: Frecuencia de cuatro y cinco tipos de genes por cepa bacteriana……..….. 42

Tabla 11: Frecuencia de tipos de variantes TEM por cepa bacteriana…….…… 43

Tabla 12: Frecuencia de tipos de variantes OXA por cepa bacteriana…….…… 44

Tabla 13: Frecuencia de tipos de variantes SHV por cepa bacteriana…….…… 46

Tabla 14: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M1 por cepa bacteriana……..…...47

Tabla 15: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M2 por cepa bacteriana……..…. 49

Tabla 16: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M9 por cepa bacteriana……..….. 50

Tabla 17: Frecuencia de tipos de variantes DHA por cepa bacteriana……..….51

Tabla 18: Frecuencia de tipos de variantes CIT por cepa bacteriana…….....… 52

Tabla 19: Frecuencia de tipos de variantes MOX por cepa bacteriana……..... 53

ABREVIATURAS

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido.

BLEA: Betalactamasa de espectro ampliado.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético (quelante de cationes)

H2O MiliQ: Agua desionzada.

LB: Medio nutricional de Luria-Bertani.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBP: Proteínas fijadoras de penicilinas.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RENARBEC: Red Nacional de Resistencia Bacteriana de Ecuador.

TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA (quelante de cationes y regulador de pH)

TE: Tampón Tris-EDTA (regulador de pH).

ul: Microlitros.

uM: Micromolares.

UV: Rayos ultravioleta.

RESUMEN

Las bacterias gram negativas utilizan el mecanismo de modificación enzimática para sobrevivir a la actividad de los antibióticos betalactámicos, mediante la producción de betalactamasas codificadas por plásmidos que transforman al antibiótico en un derivado sin actividad bactericida, esto causado por el uso inapropiado de dichos fármacos. El presente proyecto de investigación se enfocó en determinar de forma cualitativa y cuantitativa las variantes génicas que codifican distintos tipos de betalactamasas BLEEs y AmpC presentes en cepas bacterianas resistentes procedentes de los hospitales Manuel Ygnacio Monteros y Hospital del Día del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social IESS de la ciudad de Loja, mediante la aplicación de técnicas como PCR multiplex, secuenciación y comparación de secuencias en el programa en línea BLAST. Partiendo de los resultados obtenidos, se determinó una alta prevalencia de genes tipo BLEE cuyo grupo génico predominante fue TEM, mientras que dentro de la baja frecuencia de genes tipo AmpC llegó a prevalecer el grupo génico DHA, además se identificó frecuencias de diferentes variantes de cada grupo génico, ratificando así la propagación de éstos genes en bacterias gram negativas patógenas.

PALABRAS CLAVES: Modificación enzimática, antibióticos betalactámicos, plásmidos, betalactamasas BLEE y AmpC, TEM y DHA

ABSTRACT

Gram negative bacteria use the enzyme modification mechanism to survive the activity of beta-lactam antibiotics, through production of beta-lactamase plasmid-encoded that transform into a derivative antibiotic without bactericidal activity, due to the inappropriate use of these drugs. This research project focused on determining qualitative and quantitative gene variants that encode different types of beta-lactamases BLEEs and AmpC present in resistant bacterial strains from hospitals Manuel Ygnacio Monteros and Hospital Day Ecuadorian Social Security Institute IESS of the city of Loja, by applying techniques such as multiplex PCR, sequencing and sequence comparison in the online program BLAST. Based on the results obtained, we determine a high prevalence of genes type BLEE whose gene group TEM was predominant, while within the low frequency of genes type AmpC became to prevail the group gene DHA, besides we identified the frequencies of different variants for each gene group, reaching to ratify the spread of these resistance genes in pathogenic bacteria gram negative.

KEYWORDS: Modification enzyme, beta-lactam antibiotics, plasmids, ESBL and AmpC beta-lactamase, TEM and DHA

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es la capacidad que poseen las bacterias de sobrevivir a los efectos bactericidas de los antibióticos en dosis terapéuticas (Fica, 2015). Los antibióticos betalactámicos son los más utilizados clínicamente para la profilaxis de infecciones bacterianas, esto gracias a su capacidad de inhibir la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana (Costa y Botta, 1984), pero debido a su uso indiscriminado y erróneo ha dado cabida al surgimiento de cepas bacterianas con capacidad de sobrevivir a la acción de estos, utilizando mecanismos de modificación enzimática, característica importante dentro de los bacilos gram negativos, los cuales secretan enzimas betalactamasas que hidrolizan el anillo β-lactámico del antibiótico transformándolo en derivados sin actividad bactericida. Estas enzimas son codificadas a nivel cromosómico y extracromosómico (plásmidos y transposones) (Jacoby y Munoz-Price, 2005).

A nivel clínico las betalactamasas codificadas por plásmidos se pueden clasificar en: Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), betalactamasas de amplio espectro (BLEA) y otras betalactamasas como las de tipo AmpC. Dentro de las BLEE se encuentran los grupos génicos: TEM, SHV, CTX-M y OXA (Jacoby y Matthew, 1979); y entre las betalactamasas AmpC están los grupos: CIT, DHA, ACC, FOX, MOX y EBC (Philippon et al., 2002); cada uno de estos grupos poseen diferentes variantes causadas por sustituciones entre los aminoácidos de sus estructuras proteicas.

La prevalencia de éstas variantes en las bacterias gram negativas resistentes de importancia clínica ha ido aumentando y expandiéndose a nivel local y mundial con el pasar del tiempo: en el año 2000 estudios mostraron que en Rusia existió una prevalencia del 50% y en Polonia del 40% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *E. coli* (Cantón et al., 2008); en New York se identificaron variantes de tipos: MIR-1, ACT-1 y FOX-1 en cepas de *K. pneumoniae* en 1994 y 2001 con una prevalencia del 1.1-2.6% (Seral, Gude y Castillo, 2012), mientras que América Latina se reportó la tasa más elevada de cepas multirresistentes productoras de CTX-M, PER, TEM y SHV en *K. pneumoniae* con una prevalencia del 45.4-51.9% y en *E. coli* con el 8.5-18.1% (Paterson y Bonomo, 2005). En Ecuador, la Red Nacional de Resistencia Bacteriana del Ecuador (REDNARBEC) en el año 2008 indicó que a nivel comunitario hubo una frecuencia del 71% de *Escherichia coli* resistente a ampicilinas, a nivel hospitalario una prevalencia del 65% de *Klebsiella pneumoniae* inmune a cefotaxima y el 67% de *Enterobacter* resistente a ampicilina + sulbactam. Otro estudio realizado por Alcocer,

(2012) en las ciudades de Quito, Cuenca y Guayaquil revelaron una alta frecuencia de *Klebsiella spp.* productora de CTX-M y TEM a nivel hospitalario, por otro lado Cadena, (2014) en hospitales de la ciudad de Quito identificó variantes génicas de CTX-M, las variantes más frecuente fueron CTX-M28 con el 66.4% frente a CTX-M14 con el 6.4%, siendo *E. coli* la bacteria más representativa de su investigación

Ante la importancia del estudio de resistencia bacteriana, el presente trabajo busca la identificación de las diferentes variantes de betalactamasas mediante el uso de métodos de identificación genotípicos o moleculares, cuyos resultados proporcionen datos específicos que permitan dar una idea de la prevalencia actual de cepas productoras de betalactamasas a nivel local, y además que la información obtenida sea de utilidad para la elección adecuada del tratamiento en infecciones bacterianas, evitando así la formación de nuevas variantes génicas resistentes y la proliferación de estas en bacterias patógenas.

En este estudio se trabajó con 80 stocks de cepas bacterianas ya confirmadas como BLEE y AmpC positivas provenientes del hospital Manuel Ygnacio Monteros y Hospital del Día del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social IESS de la ciudad de Loja, se analizaron las muestras mediante PCR multiplex y secuenciación. Las secuencias resultantes se analizaron en el programa en línea BLAST para la identificación de las variantes génicas y finalmente se realizó cálculos estadísticos simples para determinar las frecuencias.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes.

El ser humano desde la antigüedad ha sido capaz de dar uso a diferentes componentes orgánicos como plantas y hongos para el uso terapéutico de diferentes enfermedades infecciosas, conllevando de esta forma al interés investigativo para la elaboración de antídotos eficaces ante las patologías presentadas, por ejemplo en el siglo XIX el francés Louis Pasteur identificó ciertas bacterias saprofíticas que podrían destruir el ántrax; luego en los primeros años del siglo XX el alemán Paul Ehrlich realizó el hallazgo de los primeros agentes quimioterapéuticos para la sífilis. El inicio de los antibióticos se dio en 1928 con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, quien observaba el decrecimiento de *Staphylococus aureus* en sus cultivos mediante la aplicación de este componente (Lilliam, Machado, y Hamilton, 1998).

En 1939 Howard Florey y Ernst Chain implementaron métodos de análisis y ensayos de la penicilina para su síntesis a grandes escalas, más tarde Abraham y Chain en el año de 1940 identificaron una sustancia proveniente de *E. coli* que tenía la propiedad de destruir la penicilina la cual la denominaron penicilinasa; confirmando así el hallazgo de Fleming quien en 1929 observó bacterias que no decrecían en presencia de la penicilina; sin embargo debido a las consecuencias infecciosas que acarreaba la segunda guerra mundial, se llegó a disponer de penicilina en gran cantidad para el uso civil y militar en 1941. En tanto en 1960 comenzó el nacimiento de penicilinas semisintéticas, meticilinas, ampicilinas, la gama de cefalosporina, cefaloridina y cefalotina, y junto con ello las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilinas en Estados Unidos y Europa (Alvarez, 1991). Posteriormente estos fármacos se constituyeron como tratamientos de primera línea para infecciones bacterianas, hasta que se manifestaron los primeros bacilos gram negativos productores de betalactamasas los cuales les conferían resistencia, la primera de estas en descubrirse fue TEM-1 en 1963, poco después se manifestó un aumento dominante de infecciones nosocomiales, cuya problemática llevó a la introducción de nuevas clases de antibióticos betalactámicos como penicilinas para *Pseudomona* en 1978, cefalosporinas de 1^{era} y 3^{era} generación en 1981, inhibidores de betalactamasas en 1984, monobactámicos y carbapenems en 1985 (Torres, 2012). Desde entonces ha ido aumentando el consumo terapéutico de antimicrobianos con la creencia de que se extinguirían las enfermedades causadas por éstos agentes patológicos; luego en los años 70 identificaron cepas bacterianas que mostraron las primeras resistencias a meticilina (MRSA) y a la vancomicina (VISA); en 1996 de la misma forma para *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Avellaneda y Pacheco, 2001).

1.2. Generalidades de las bacterias gram negativas.

Las bacterias gram negativas son microorganismos unicelulares que carecen de un núcleo y su multiplicación lo realiza por fisión binaria. Se caracterizan por la coloración rosada adquirida mediante tinción gram, esto debido a que no poseen en su pared celular el ácido teicoico, el mismo que se encuentra en las gram positivas otorgándoles la coloración azul (Forbes et al., 2007).

La estructura antigénica de las gram negativas está constituida por:

- **Antígenos O,** se los denomina como antígenos somáticos, son propios de ciertas especies bacterianas y confieren especificidad serológica.
- **Antígenos H o flagelares**, son proteínas termolábiles (flagelina) que se encuentran constituyendo a los flagelos, estas estructuras permiten el movimiento de la bacteria formando una película para la adhesión a sustratos vivos o inertes.
- **Antígenos K o capsulares,** se encuentran en bacterias con cápsula, actúa como barrera defensiva evitando la adhesión con los anticuerpos e impidiendo la fagocitosis, constituyéndose así como un factor de virulencia (Mandell et al., 2005).

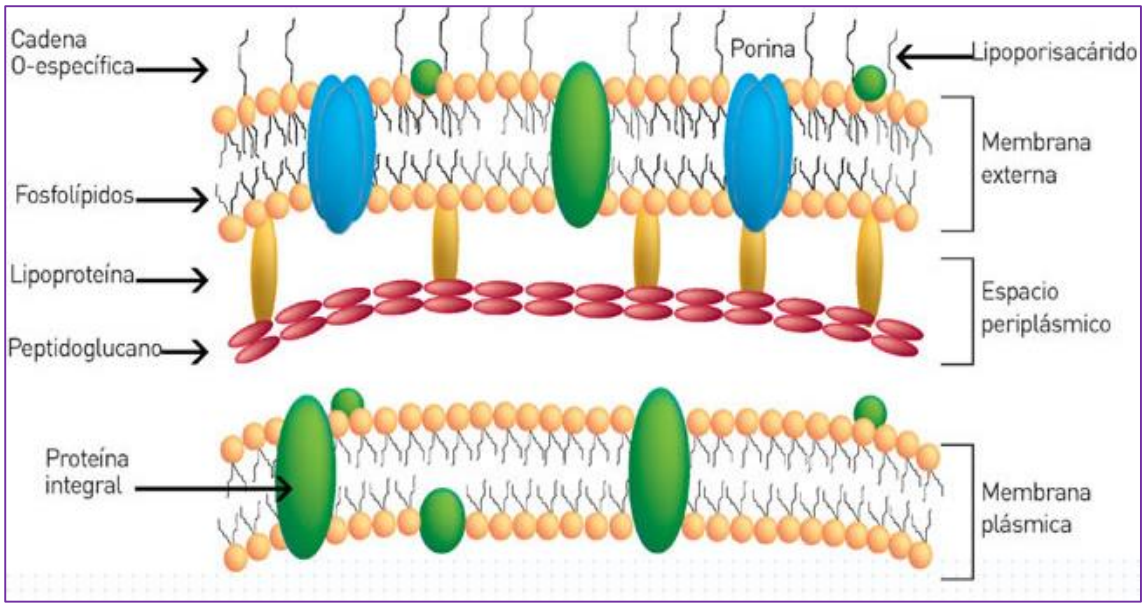

Figura 1: Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas
Fuente: Merino, 2013.

Los lipopolisacáridos o LPS están constituidos por tres componentes: Lípido A, polisacárido central o de corte y la cadena lateral O; tienen propiedad endotóxica asociada al componente lipídico A, el cual es liberado por la lisis bacteriana inducida por fagocitosis o por la acción de antibióticos, determinando de esta forma la gravedad del cuadro clínico infeccioso según la cantidad de endotoxina liberada.

Las bacterias gram negativas comprenden una amplia clasificación de familias, dentro de las cuales encontramos los fermentadores de glucosa como la familia *Enterobacteriaceae* y los no fermentadoras de glucosa como la familia *Pseudomonadaceae* (Hart y Espinoza., 2008).

1.2.1. Enterobacteriaceae.

Se encuentran en agua, suelo, alimentos, flora intestinal tanto de animales y seres humanos; su forma de transmisión hacia el huésped humano es a través de infecciones nosocomiales e ingesta de agua y alimentos contaminados. Bioquímicamente son aerobios y anaerobios facultativos, tienen la propiedad de reducir nitratos a nitritos, son negativos en reacciones de catalasa y oxidasa, fermentan glucosa y crecen en agar MacConkey (Forbes et al., 2007), dentro de ésta familia se encuentran: *Escherichia coli, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella* y *Proteus.*

1.2.1.1. Escherichia coli.

Son capaces de fermentar lactosa (Lactosa +) por lo que sus colonias toman una coloración rosada o roja en agar MacConkey (Suarez et al., 2006). Esta bacteria es de gran importancia patológica ya que en la mayoría de los casos afectan al aparato genitourinario (especialmente femenino) y tracto digestivo causando patologías clínicas como bacteriemia, meningitis, enfermedades diarreicas e infecciones genitourinarios en mujeres. También forma parte de la flora intestinal, pudiendo aislarse en la cavidad oral de pacientes alcohólicos, diabéticos y hospitalizados (Shinagawa et al., 2000).

1.2.1.2. Enterobacter.

Estas bacterias pueden ser móviles dependiendo de la presencia o ausencia de flagelos perítricos, son anaerobias facultativas, fermentadoras de glucosa, lactosa y transforman los nitratos a nitritos. Promotores oportunistas de infecciones del tracto urinario y respiratorio, se encuentran en la flora intestinal normal del ser humano. Las especies de importancia clínica son: *Enterobacter cloacae* que alcaliniza la orina mediante la hidrólisis de la urea a través de la ureasa y *Enterobacter aerogenes* que actúa como patógeno oportuno nosocomial. Estos agentes se encuentran en: suelo, agua, piel humana, plantas, cloacas, en ciertos lácteos y en tractos intestinales (Ryan y Ray, 2010).

1.2.1.3. Citrobacter.

Son bacterias aerobias con capacidad de fermentación variable de lactosa, algunos pueden o no usar citrato, están presentes en: suelo, agua, alimentos, tracto intestinal de animales y del ser humano. Presente en procesos infecciosos como quirúrgicos, vías urinarias, piel, tejido subcutáneo, bacteriemia, abscesos cerebrales y meningitis; siendo *Citrobacter freundii* el agente causal más común en infecciones consecuencia de una asepsia inadecuada después de la remoción intestinal o acto sexual y *Citrobacter koseri* que se ha hecho presente como un agente causal de meningitis en pacientes neonatales e imunodeprimidos (Azrak et al., 2009).

1.2.1.4. Klebsiella.

Klebsiella se diferencia de los demás géneros de la familia *Enterobacteriaceae* por poseer una cápsula de polisacáridos grande, no presenta movilidad y es anaerobia facultativa. Se encuentran en ambientes acuáticos, proliferándose sin problemas en presencia de nutrientes. Frecuentemente se presenta como un patógeno hospitalario, la forma de contagio se da por la constante manipulación de pacientes infectados; las personas con mayor riesgo de adquirir el agente patógeno y posteriormente desarrollar la enfermedad infecciosa son los de edades avanzadas o muy jóvenes con sistema inmunitario poco activo, aquellos que presentan quemaduras o heridas graves y los inmunodeprimidos. La mayoría de los casos clínicos son causadas por *Klebsiella pneumoniae y Klebsiella oxytoca* (Martínez et al., 2005).

1.2.1.5. Proteus.

Son bacterias anaerobias facultativas, viven en el tracto intestinal de animales y del hombre. Son responsables de muchas infecciones del tracto urinario, por lo general *Proteus mirabilis* el cual es causante del 90% de los casos clínicos, esta enterobacteria muestra aglutinación y genera ureasa, la cual hidroliza la urea de la orina a amoníaco, haciéndola más alcalina y formando cristales de estruvita, apatita y carbonato de calcio. *Proteus vulgaris* es considerada como patógena oportunista que causa infecciones en vías urinarias, abscesos hepáticos y heridas; fermenta glucosa, amigdalina y sacarosa, no fermenta manitol y lactosa (Ryan y Ray, 2010).

1.2.2. Bacilos Gram negativos no fermentadores.

Estos microorganismos son similares morfológicamente a las enterobacterias, pero su diferencia radica en la incapacidad de fermentar glucosa y son aerobias. La mayoría de estos

agentes se comportan como oportunistas y causan infecciones graves, a nivel hospitalario se ha presenciado la frecuencia de *Pseudomona aeruginosa y Acinetobacter spp.* con resistencia ante la acción terapéutica de diferentes antibióticos especialmente en pacientes ingresados a cuidados intensivos (Larrondo, 2010). Dentro de este grupo se encuentran las bacterias *Pseudomona* y *Acinetobacter.*

1.2.2.1. Pseudomona.

Estas bacterias poseen flagelos polares que permiten su motilidad, son oxidasa y catalasa positivas. Se encuentran distribuidas en agua, ambientes húmedos; son causantes de infecciones quirúrgicas, otitis, neumonías, bacteriemia, endocarditis y en pacientes inmunodeprimidos provocan infecciones complicadas en el aparato urinario. *Pseudomona aeruginosa* es el agente con mayor frecuencia en pacientes hospitalarios recluidos en cuidados intensivos por lo cual se lo considera como un patógeno nosocomial y es común en infecciones tanto respiratorias como en heridas de quemaduras (Larrondo, 2010).

1.2.2.2. Acinetobacter.

Son bacterias aeróbicas, no móviles y oxidasa negativas, se encuentran en superficies animadas e inanimadas. Actúan como patógenos oportunistas que se asocian a infecciones nosocomiales causando neumonías, bacteriemias, meningitis, infecciones urinarias, heridas y de carácter intravascular. *Acinetobacter baumannii* es muy común a nivel clínico, es catalasa positivo, se localiza en la piel de los seres humanos y pueden colonizar cavidad oral, faringe e intestino provocando las infecciones nosocomiales. (Larrondo, 2010).

1.3. Mecanismo de ingreso de los microorganismos.

Los diferentes microorganismos patógenos poseen múltiples formas de ingresar al organismo, éstos patógenos utilizan como puertas de entrada la mucosa y piel lesionada, colonizándolas y causando daño mediante toxinas que secretan. Algunos microorganismos aprovechan la lesión causada para poder invadir tejidos adyacentes como por ejemplo: al causar daño en la epidermis estos agentes se extienden por consanguinidad a la dermis, luego a las fascias hasta llegar al hueso; mientras que otros agentes patógenos utilizan como vehículo los vasos sanguíneos o linfáticos para poder diseminarse en órganos internos (Ingraham y Ingraham, 1998).

Un ejemplo común es la infección de vías urinarias (Figura 2), el cual inicia mediante la contaminación de la zona perineal y genital por microorganismos provenientes del tracto gastrointestinal, luego estos agentes ingresan por la uretra y ascienden a la vejiga colonizando su urotelio (epitelio transicional seudoestratificado) e incorporándose a las células huéspedes, provocando el proceso infeccioso característico de *Escherichia coli* (Rosen et al., 2007).

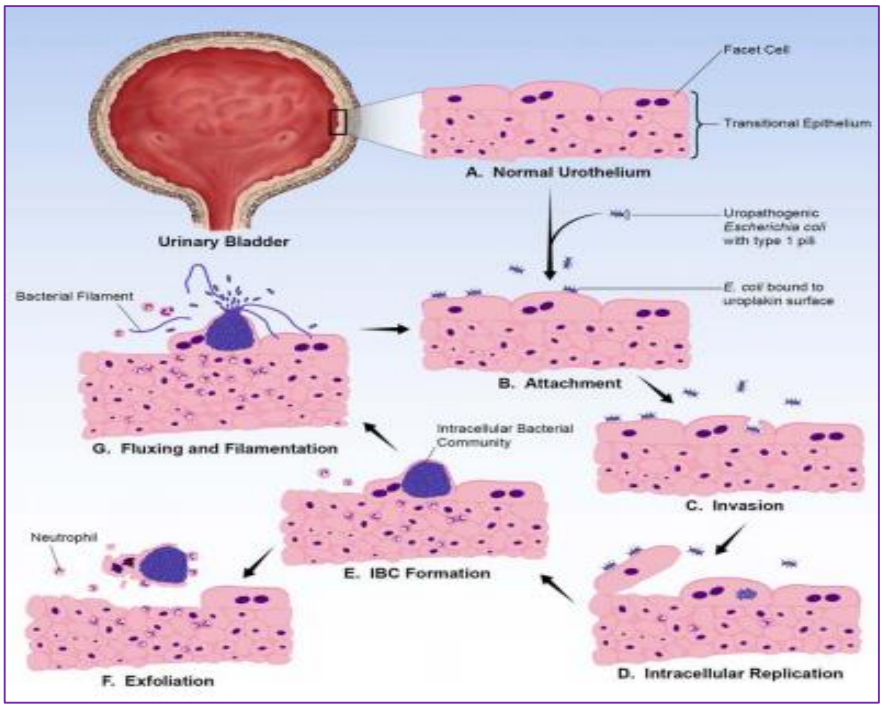

Figura 2. Mecanismo de infección de *E. coli.*
Fuente: Rosen et al. (2007)

1.4. Mecanismo de Resistencia.

La capacidad de resistencia que presentan las bacterias ante los efectos causados por los antibióticos en dosis terapéuticas, conservando su propiedad de replicación y originando una nueva población con dicha capacidad, es lo que se denomina resistencia bacteriana (Fica, 2015). Sin embargo las bacterias gram negativas poseen mecanismos adversos que les permite adquirir inmunidad ante la actividad bactericida de los antibióticos, llevando así a la falla de la acción terapéutica (figura 3); de allí la importancia del reconocimiento de estos mecanismos de resistencia, los cuales se pueden resumir en:

- Modificación enzimática del antibiótico: Este mecanismo es el más utilizado por las bacterias gram negativas, debido a que tienen la capacidad de secretar ciertas enzimas denominadas betalactamasas que inactivan a los antibióticos betalactámicos.

Estas enzimas son codificadas por genes alterados de cromosomas, plásmidos y transposones que pueden ser transferidos a otras bacterias (Livermore, 1991). Las enzimas codificadas por los plásmidos resistentes se encuentran a nivel periplásmico, permitiendo que el antibiótico betalactámico se inactive antes de llegar a la membrana citoplasmática y a las proteínas blanco (Iañez, 1998).

- Alteraciones del sitio de acción: Ciertas estructuras vitales de la bacteria son el blanco de acción del antibiótico, como en el caso de los antibióticos betalactámicos que actúan sobre las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) provocando muerte de la bacteria mediante lisis, debido a que éstas proteínas son encargadas de la transpeptidación necesaria para la estabilidad de la pared celular. Sin embargo si se permite que la bacteria sobreviva con su pared celular parcialmente destruida, las proteínas fijadoras de penicilinas pierden afinidad con los antibióticos betalactámicos causando resistencia en la bacteria (Livermore, 1991).
- Alteraciones de la permeabilidad de la membrana externa: Los agentes bacterianos provocan modificaciones en la bicapa lipídica y en las porinas, bloqueando el ingreso del antibiótico.
- Bombas de salida: Las bacterias gram negativas usan dichos dispositivos, para alojar las moléculas de antibiótico llevándolas al espacio periplásmico para luego expulsarlo fuera de la bacteria e impidiendo que éste llegue a su sitio de acción. Las bombas de salida pueden ser específicas para un fármaco debido a que son codificadas por un plásmido, mientras que las bombas que son expresadas cromosómicamente son inespecíficas (Vila et al., 2007).

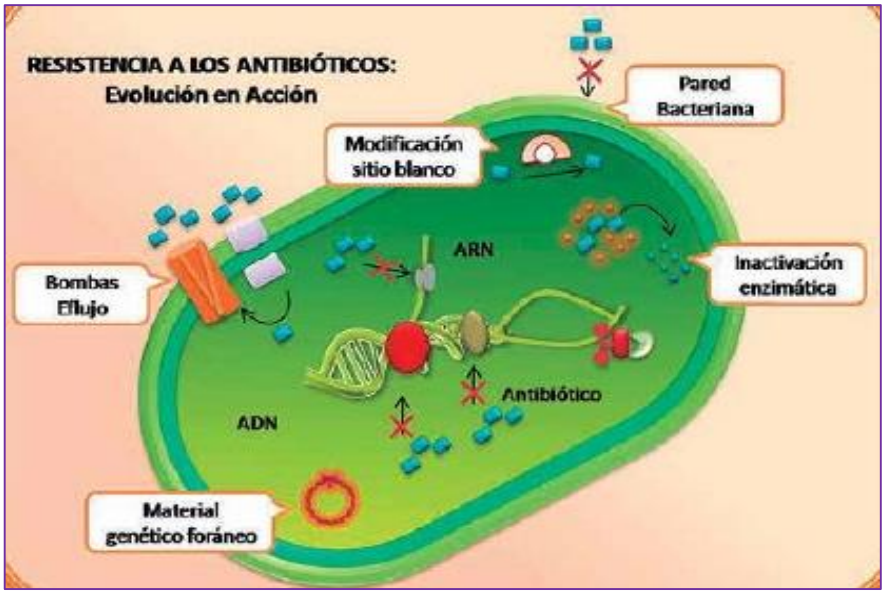

Figura 3: Mecanismo de resistencia bacteriana
Fuente: Pinilla et al. (2012)

1.4.1. Clasificación de betalactamasas plasmídicas.

Las enzimas betalactamasas son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β-lactámico de penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactames transformándolas en derivados sin actividad bactericida. Las betalactamasas plasmídicas son extracromosómicas ya que son codificadas por genes alterados que se encuentran en los plásmidos y transposones; cuya capacidad de autotransferencia determina la distribución de estas enzimas en la población patógena y la consecuencia clínica de las mismas (Martínez, 1992).

En 1965 se detectó bacterias gram negativas del grupo *Enterobacteriaceae* resistentes a la terapia antibiótica a causa de la producción de betalactamasas de tipo TEM-1, esto fomentó el desarrollo de nuevos antibióticos y con ello la evolución enzimática (Datta y Kontomichalon, 1965). A nivel clínico las betalactamasas codificadas por plásmidos se pueden clasificar en: Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), betalactamasas de amplio espectro (BLEA) y otras betalactamasas como las de tipo AmpC.

1.4.1.1. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Su actividad hidrolítica inactiva a penicilinas, no hidrolizan cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas, monobactames o carbapenems; son inhibidas por el ácido clavulánico y en ocasiones también por la oxacilina. Las BLEE son codificadas por genes alterados presentes en los transposones, sus mutaciones comprometen a ciertos pares de bases dando lugar a nuevas variedades de betalactamasas con características diferentes (Jacoby y Munoz-Price 2005). Dentro de las BLEE se incluyen: TEM, OXA, SHV y CTX-M.

- **BLEE tipo TEM:** Dentro de este grupo se encuentra la variante TEM-1, la cual fue la primera betalactamasa descrita en 1965 en cepas de *E. coli* que no respondían a los antibióticos betalactámicos. Su fenotipo de resistencia se presenta hacia las penicilinas y a veces en las cefalosporinas de 1^{era} y 2da generación, pero se inhiben en presencia de ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Se encuentran en los géneros: *Enterobacteriaceae, Salmonella, E. coli, P. aeruginosa, Acinetobacter, Haemophilus, Neisseria y Vibrio* (Martinez, 1992). Otra variante de importancia clínica es TEM-2, su capacidad hidrolítica es similar a TEM-1 diferenciándose entre sí de manera estructural con el reemplazo de la lisina por la glicina, confiriéndole mayor actividad ante ceftazidima y cefaloridina, excepto en meticilina y cefazolina. Su prevalencia es menor queTEM-1 en bacterias patógenas*;* el patrón resistencial es frecuente en TEM-3, TEM-7, TEM-8, TEM-11, TEM-13, TEM-14, TEM-16, TEM-18, TEM-24, (Martinez, 1992).

- **BLEE tipo SHV :** Su nombre se debe al grupo sulfhídrico contenido en su molécula, reconocida en *Klebsiella* y en otras enterobacterias, la resistencia fenotípica se da por su alta capacidad hidrolítica en ampicilinas que en cefalosporinas y carbenicilina, existen más de 100 variantes de éste tipo las cuales derivan de SHV-1 mediante sustituciones de aminoácidos. SHV-1: Esta enzima es frecuente en *K. pneumoniae* que le otorga una resistencia específica en ampicilinas y en menor grado a carbenicilina; también se encuentran en cepas de *E. coli* y *Proteus* (Martínez, 1992).

SHV-2, se aisló en Alemania en el año de 1983 en una cepa de *Klebsiella*, presenta resistencia ante la actividad de cefalosporinas de amplio espectro (Knothe et al., 1983). SHV-12 y SHV-11 fueron descritas en 1997 y manifiestan actividad hidrolítica ante penicilinas y ceftazidimas; con frecuencia se los encuentra en *K. pneumoniae, E. coli* y en *Enterobacter cloacae*, su prevalencia es muy extendida en Korea que en Estados Unidos y Europa. Así mismo existen otros tipos de betalactamasas SHV que con frecuencia se hallan en bacterias patógenas resistentes, entre ellas mencionamos: SHV-3, SHV-4, SHV-5, SHV-6, SHV-7, SHV-8, SHV-9, SHV-10, SHV-16, SHV-49 y SHV-57 (Ling et al., 2005)

- **BLEE tipo CTX-M o Cefotaximasas:** En 1989 en Alemania, se describió la resistencia a cefotaxima en cepas de *E. coli* no productoras de TEM y SHV denominándola CTX-M-1 mostrando gran inmunidad ante el antibiótico ya mencionado. Estas variantes muestran un alto grado de resistencia a cefepime, cefotaxima y ceftriaxona, sucediendo lo contrario ante ceftazidima, mientras que el tazobactam presenta una elevada acción en comparación con el ácido clavulánico. La variante CTX-M-15 se diferencian de las variantes CTX-M-3, CTX-M-9 y CTX-M-14 por la impunidad que le confiere a la bacteria ante la acción de la ceftazidima (Paterson y Bonomo, 2005) (Livermore et al., 2007). Al igual que las variantes CTX-M-65**,** CTX-M-55 y CTX-M-2 son muy frecuentes en *Klebsiella y E. coli* provocando resistencia a cefotaxima o ceftriaxona (Yin et al., 2009).

Se identifican más de 65 variantes de betalactamasas CTX-M las cuales se subdividen en cinco subclases de acuerdo a la homología de sus secuencias de aminoácidos, (tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de CTX-M según su homología

Variante CTX-M	Subclase
CTX-M-1	CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-10; CTX-M-12; CTX-M-15 y FEC-1
CTX-M-2	CTX-M-2; CTX-M-4; CTX-M-4L; CTX-M-5; CTX-M-6; CTX-M-7; CTX-M-20 y Toho-1
CTX-M-8	Solo incluye este grupo.
CTX-M-9	CTX-M-9; CTX-M-13; CTX-M-14; CTX-M-16; CTX-M-17; CTX-M-19; CTX-M-21; CTX-M-27 y Toho-2
CTX-M-25	CTX-M-25 y CTX-M-26

Fuente: Jacoby y Muñoz-Price, (2005)

- ***BLEE tipo OXA u Oxacilinasas:*** Este tipo de betalactamasa se descubrió inicialmente en *Pseudomona aeruginosa***,** degradan antibióticos como**:** oxacilina, cloxacilina, meticilina y cefalosporina de espectro reducido pero se inhiben débilmente en presencia de ácido clavulánico (Jacoby y Munoz-Price, 2005), estas enzimas son frecuentes en bacterias de tipo *Enterobacteriaceae* y *Pseudomona* (Natthew, Hedqes y Smith, 1979).

OXA-1: Esta betalactamasa es bastante común en infecciones clínicas se presenta con mucha frecuencia en bacterias de tipo *Enterobacteriaceae* como *E. coli* y *P. aeruginosa*. Su capacidad hidrolítica es más eficaz en meticilina, cefepime y cefotaxima que en oxacilina (Yamannto et al.,1981).Otras variantes de frecuencia clínica son OXA-2 y OXA-3, OXA-4, OXA-5, OXA-6, OXA-7, OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-15, OXA-18, OXA-28, OXA-31, OXA-32, OXA-35 y OXA-45 (Levesque y Jacoby, 1988) (Paterson y Bonomo, 2005).

1.4.1.2. Betalactamasas de tipo AmpC.

Estos tipos de enzimas presentan resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación y a combinaciones de antibióticos betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, sin embargo la hidrólisis de estas betalactamasas pueden ampliarse hasta afectar a las cefalosporinas de cuarta generación, además son inhibidas por la cloxacilina y ácido bórico pero no en ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. A menudo se encuentran presentes en bacterias de *E. coli, Proteus mirabilis, Enterobacter spp.* y *Klebsiella spp.* (Philippon, Arlet y Jacoby, 2002).

En el año de 1989 en Corea se describe la variante bla_{CMY-1} (CMY-1) presente en cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, los mismos que mostraron resistencia ante la actividad de penicilinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas y monobactams (Bauernfeins, Chong y Schweighart, 1989). Debido a ciertas diferencias en las secuencias de aminoácidos en genes AmpC, estos se clasifican en: CIT (incluyen CMY y LAT), DHA, ACC, FOX, MOX (incluye CMY-1) y EBC dentro de esta se encuentra ACT y MIR. Los grupos génicos DHA y CIT proporcionan resistencia a cefamicinas, mientras que MOX induce la hidrólisis a moxalactam.

1.5. Uso de antibióticos.

La OMS (2001), conceptualiza al uso adecuado de antibióticos como la manipulación correcta de estos, obteniendo el efecto clínico-terapéutico esperado y a la vez minimizando la toxicidad del medicamento y el desarrollo de la resistencia microbiana.

1.6. Antibióticos betalactámicos.

Son antibióticos que presentan en su estructura un anillo betalactámico obteniendo su actividad antibacteriana. Su propiedad bactericida es conferida gracias a su capacidad de inhibir la última etapa de la síntesis de la pared celular de la bacteria provocando su deceso (Mar y Francesc, 2003).

1.6.1. Mecanismo de acción.

Los antibióticos betalactámicos tienen la propiedad de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana provocando un efecto autolítico, consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano o transpeptidación (Jones, 1985). La transpeptidación es catalizada por las PBP o proteínas fijadoras a penicilinas en donde se une el anillo betalactámico del antibiótico interrumpiendo la función de formar los tetrapéptidos unidos para alargar, dar forma y dividir la bacteria. Además estos antibióticos son capaces de activar la autolisina bacteriana endógena que destruye al peptidoglicano, provocando la lisis de la bacteria (Costa y Botta, 1984).

1.6.2. Clasificación y estructura de los antibióticos betalactámicos.

La clasificación de los betalactámicos se da de acuerdo a la modificación de las propiedades del antibiótico mediante la adición de cadenas lineales en el anillo dando lugar a nuevos grupos de antibióticos betalactámicos (García et al., 1999).

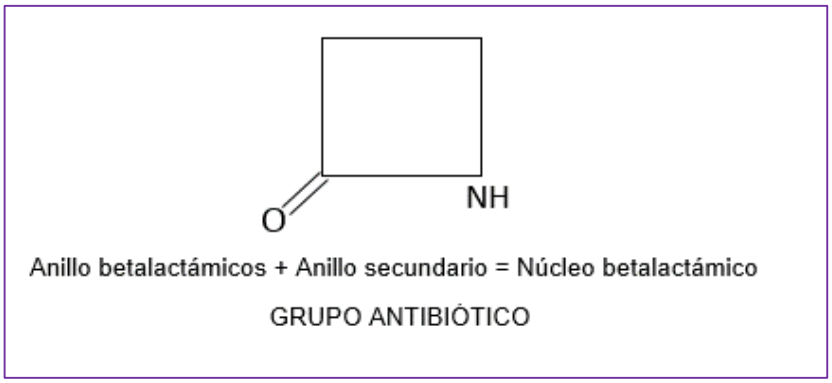

Figura 4. Estructura del antibiótico betalactámico
Fuente: Suarez y Francesc (2009)

En la tabla 2 se describe la clasificación de los antibióticos betalactámicos con su espectro antimicrobiano.

Tabla 2: Clasificación y espectro antimicrobiano de antibióticos betalactámicos.

Clase	Tipo	Antibiótico	Espectro antimicrobiano
Penicilinas	Bencilpenicilinas	Bencilpenicilinas procaína Bencilpenicilinas benzatina	*E. coli, Enterobacteriaceae, Pseudomona spp., Klebsiella spp., Enterobacter spp., Bacterias gram positivas, Neisseria spp. Streptococcus spp., Staphylococcus spp.*
	Alquilpenicilinas	Fenoximetilpenicilina benzatina	
	Isoxazopenicilinas	Cloxacilina	
	Aminopenicilinas	Ampicilina/amoxicilina	
	Ureidopenicilinas	Piperacilina	
Cefalosporinas	Primera generación	Cefazolina, Cefalexina	*Streptococcus spp., Staphylococcus spp, E. coli, Proteus spp., Klebsiella spp., Haemophilus influenzae*
	Segunda generación	Cefonicid, Cefuroxima, Cefaclor	
	Tercera generación	Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, Ceftizoxima Cefixima, Cefpodoxima Ceftibuteno	
	Cuarta generación	Cefepime, Cefpiroma	
Cefamicinas	Cefalosporinas 2da generación parenterales	Cefoxitina	*E. coli, Haemophilus influenzae, Morganella morganii, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus spp., Staphylococcus spp.*
Monobactámicos		Aztreonam	*E. coli, Proteus spp, H. influenzae*
Carbapenémicos	Carbapenemas	Imipenem	*Enterobacteriaceae P. aeruginosa Acinetobater spp. , Brucella spp S. pyogenes, S. pneumoneae, E. faecalis*
	4-beta-metilcarbapenema	Meropenem	
	1-beta-metilcarbapenema	Ertapenem	
Inhibidores de betalactamasas	Sulfonas de ácido penicilánico	Sulbactam, Tazobactam	*E. coli, Neisseria gonorrhoeae, Proteus spp. Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus spp. Staphylococcus spp.*
	Oxapenamas o clavamas	Ácido clavulánico	

Fuente García et al. (1999); Moellering (1999); Solórzano (2004); Suarez y Francesc (2009).
Elaboración: La autora

1.7. Epidemiología en Ecuador.

La Red Nacional de Resistencia Bacteriana de Ecuador (REDNARBEC), creada en 1999, emitió un informe en el año 2008, en la que informó que en nuestro país a nivel comunitario se presentaron agentes patógenos resistentes a antibióticos, entre ellos: *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* con resistencia a tetraciclinas en un 30% y 96% respectivamente, *Shigella spp.* y *Escherichia coli* se mostraron inmunes para ampicilinas con el 93% y 71% cada uno, mientras que *Staphylococcus aureus* era invulnerable a eritromicina en un 30% y a oxacilina con el 25%. A nivel hospitalario también se presentaron resistencias en *Escherichia coli* en un 77% a ampicilina, *Klebsiella pneumoniae* con el *65% a* cefotaxima*, Staphylococcus aureus* el 41% a oxacilina, *Enterobacter* al 67% ante ampicilina + sulbactam, *Acinetobacter baumannii* con 68% a trimetropina + sulfametoxazol y a ciprofloxacina en un 64%; finalmente en *Pseudomona aeruginosa* se mostró resistente a gentamicina en un 55% y a ciprofloxacina al 54% (Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana Ecuador, 2008).

Otro estudio realizado en hospitales de Quito, Cuenca y Guayaquil en el año 2004, revelaron la presencia de *Klebsiella spp.* productora de CTX-M en 281 hospitales, mientras que en 162 hospitales se encontraron cepas productoras de TEM y en 125 hospitales con cepas generadoras de SHV. Un estudio realizado por Alcocer et al. (2012) indicó la presencia de un *Klebsiella pneumoniae* productoras de TEM en un 65.2% a nivel hospitalario en las ciudades Quito, Azogues, Guayaquil y Cuenca. Una investigación realizada posteriormente por Cadena (2014) en centros hospitalarios de la ciudad de Quito, mostró un aumento de prevalencia enzimática de tipo CTX-M en bacterias entéricas a nivel hospitalario y comunitario, en donde se encontró que de 110 aislados clínicos se encontraron variantes como: CTX-M28 en un 66.4%, CTXM-2 con el 13.6 %, CTX-M12 en un 8% y de menor prevalencia el CTX-M14 con el 6.4%, en los cuales *Escherichia coli* fue la cepa bacteriana más representativa de estas resistencias.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General.

Estudiar e identificar mediante técnicas moleculares los diferentes genes que codifican las enzimas BLEEs y β-lactamasas AmpC, implicadas en los mecanismos de resistencia a los β-lactámicos en patógenos aislados de pacientes de los hospitales Manuel Ignacio Monteros y Hospital del Día del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social IESS de Loja.

2.3. Objetivos específicos.

- Determinar mediante PCR los genes responsables de la resistencia antibiótica de las cepas bacterianas productoras de betalactamasas BLEE y AmpC, obtenidas de los hospitales Manuel Ygnacio Monteros y Hospital del Día del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social IESS de la ciudad de Loja.
- Identificar por secuenciación del producto de PCR, las variantes de los diferentes tipos de genes BLEE y AmpC.
- Determinar la frecuencia de grupos y variantes existentes.
- Determinar la frecuencia alélicas de los genes anteriormente identificados.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Estudio.

Este proyecto fue de tipo observacional con enfoque cuali y cuantitativo, basado en la identificación de variantes responsables de resistencia antibiótica bacteriana mediante la aplicación de técnicas moleculares en muestras de bacterias provenientes de los hospitales: Manuel Ygnacio Monteros y Hospital del Día del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social IESS de la ciudad de Loja, identificadas previamente como productoras de BLEE y AmpC.

3.2. Muestra.

En el presente proyecto se utilizaron 80 de 114 stocks de cepas bacterianas (tabla 3), provenientes de pacientes ambulatorios y hospitalizados en los hospitales antes mencionados; previamente clasificadas fenotípicamente por estudios realizados de la Universidad Técnica Particular de Loja desde el año 2010 hasta la fecha como productoras de betalactamasas BLEE y AmpC.

Tabla 3: Cepas bacterianas identificadas

Especie	Positivo BLEE	Positivo AmpC	Positivo BLEE /AmpC	Total Positivos
Citrobacter freundii		2	1	3
Enterobacter aerogenes	10			10
Enterobacter cloacae	4	1		5
Enterobacter koseri	1			1
Escherichia coli	44	5		49
Klebsiella oxytoca	8			8
Klebsiella pneumoniae	12			12
Proteus mirabilis	4			4
Proteus vulgaris	3	2		5
Pseudomona aeruginosa	2	4	1	7
Total	88	14	2	114

Fuente: Estudios de la Universidad Técnica Particular de Loja
Elaboración: La autora

34 stocks fueron descartados del estudio, debido a que algunas cepas bacterianas no fueron viables.

3.3. Materiales y métodos del trabajo experimental.

3.3.1. Preparación de stocks de bacterias.

Con la finalidad de disponer bacterias durante todo el proceso del trabajo experimental se llegó a preparar stock de bacterias criopreservadas:

- Se colocó en un tubo eppendorf 800ul de medio LB o Luria-Bertani (medio nutricional) con un inóculo de las bacterias en estudio, esto se agitó durante 3-4 horas a una temperatura de 37°C para promover el crecimiento bacteriano. A continuación, se añadió 200ul de glicerol (crioprotector para bacterias) y se almacenó a una temperatura de 4°C.

3.3.2. Siembra de stock de bacterias.

Las bacterias que se criopreservaron se sembraron en agar MacConkey, el cual es un medio selectivo para aislar bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa.

- El cultivo se sometió a una temperatura de 37°C por 24 horas en una incubadora. Algunas cepas bacterianas como las *Proteus spp,* necesitan 12 horas más debido a que su periodo de incubación es mucho más prolongado. Luego se observó el crecimiento bacteriano por la presencia de colonias.

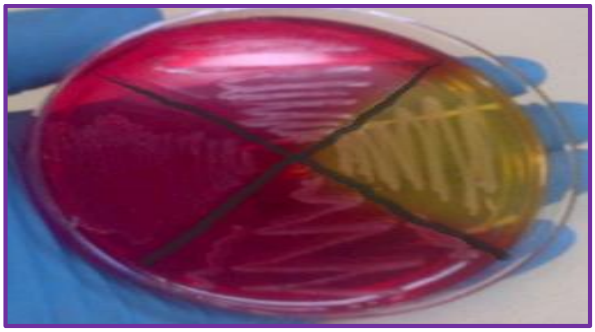

Figura 5: Crecimiento de cuatro cepas distintas de bacterias en agar MacConkey.
Elaboración: La autora

3.3.3. Extracción de DNA.

Para la extracción del DNA bacteriano se utilizó la técnica de shock térmico:

- Se recolectó una colonia de bacterias y se diluyó en un tubo eppendorf con 100ul de H_2O MiliQ; luego se sometió a ebullición durante 10 min. con la intención de lisar la pared bacteriana y liberar el DNA.
- Continuamente se centrifugó a 4000 rpm durante 50 segundos, esto ayudó a separar el DNA de los restos celulares; luego se sacó el sobrenadante que contiene el DNA liberado con ayuda de una micropipeta y se lo almacenó en otro tubo eppendorf. Las muestras de DNA que no se usaban se conservaban a una temperatura de 4°C.

3.3.4. Preparación de primers.

El diseño de primers se realizó de acuerdo con el método descrito por Dallenne et al. (2010) para la realización del PCR multiplex, en donde cada primer cumplieron con los parámetros descritos en la tabla 4.

Los primers utilizados fueron de la marca comercial INVITROGEN, estos fueron hidratados de la siguiente forma:

- Los primers deshidratados o liofilizados fueron centrifugados a 4000 rpm durante 30-60 segundos, con la finalidad de bajar el producto que se encuentra al fondo del tubo y se dejó reposar durante 20 minutos a 4°C. A continuación se adicionó tapón TE logrando una concentración de 100 uM (los volúmenes se expresan en la tabla 4). Esta disolución se centrifugó durante 13-30 segundos y se separó 100ul en diferentes tubos para almacenarlos a 4°C.

Tabla 4: Concentraciones y parámetros de primes

Primers	Nmoles	ul de TE	Concentración (uM)	Secuencia	Tamaño del Amplicón (pb)
TEM for	48,0	480		CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800
TEM rev	45,9	459		CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
SHV for	40,2	402		AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713
SHV rev	41,1	411		ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
OXA for	43,5	435		GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
OXA rev	40,1	401		GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
CTXM-1 for	38.1	381		TTAGGAARTGTGCCGCTGYA[b]	688
CTXM-1-2 rev	33,9	339		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT[b]	
CTXM-2 for	51,1	472		CGTTAACGGCACGATGAC	404
CTXM-1-2 rev	39,5	395		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT[b]	
CTXM-9 for	47,2	472		TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561
CTXM-9 rev	44,7	447		TGATTCTCGCCGCTGAAG	
CTXM-825 for	45,1	451	100	AACRCRCAGACGCTCTAC[b]	326
CTXM-825 rev	45,7	457		TCGAGCCGGAASGTGTYAT[b]	
ACC for	44,2	442		CACCTCCAGCGACTTGTTAC	346
ACC rev	41,7	417		GTTAGCCAGCATCACGATCC	
FOX for	51,8	518		CTACAGTGCGGGTGGTTT	162
FOX rev	44,7	447		CTATTTGCGGCCAGGTGA	
MOX for	33,9	339		GCAACAACGACAATCCATCCT	895
MOX rev	34,7	347		GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	
DHA for	39,8	398		TGATGGCACAGCAGGATATTC	997
DHA rev	48,7	487		GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	
CIT for	40,0	400		CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538
CIT rev	42,0	420		ACGGACAGGGTTAGGATAGY[b]	
ACT for	44,7	447		CGGTAAAGCCGATGTTGCG	683
ACT rev	40,7	407		AGCCTAACCCCTGATACA	

Elaboración: La autora
Fuente: Dallenne et. al. (2010).

3.3.4.1. Preparación de multimix de primers.

Esta preparación consistió en mezclar grupos de primers según lo especificado por Dallenne et al. (2010) y descrito en la figura 6, en donde se colocó en un tubo eppendorf 10 ul de cada primers y se igualó a 500ul con tampón TE (Tris-EDTA), obteniendo una concentración de 2 uM. Cada grupo de primers se los denominó como: mPCR1, mPCR2 y mPCR3. Aquellos fueron almacenados 4°C

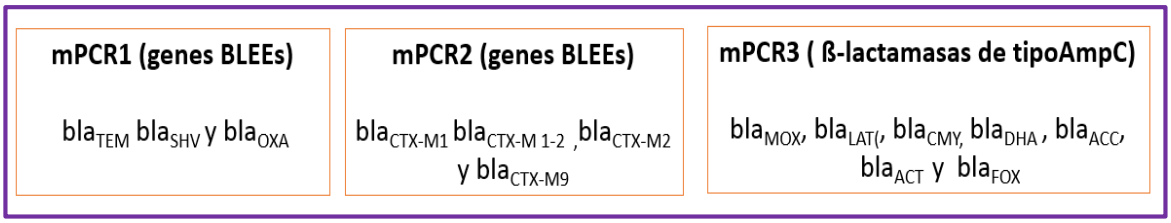

Figura 6: Esquema de agrupaciones de primers por tubo eppendorfs
Elaboración: La autora

3.3.5. Preparación del DNA para PCR multiplex.

El DNA bacteriano se lo preparó con los reactivos del kit Platinum Multiplex PCR Master Mix de Applied Biosystem de la siguiente manera:

- En un tubo eppendorf para PCR se mezcló: 12,5 ul de Platinum multiplex (enzima polimerasa); 2,5ul de primers (ya sea mPCR1, mPCR2 y mPCR3); 9 ul de H_2O MiliQ y 1ul de DNA. Se realizó controles para descartar contaminaciones, en el cual en lugar de DNA se colocó 1ul de H_2O MiliQ,
- El volumen total de preparado fue 25 ul.

3.3.5.1. Condiciones de PCR.

Los preparados de PCR multiplex se sometieron a condiciones propuestos según Dallenne et al. (2010), utilizando un termociclador:

- Se aplicó a una desnaturalización Inicial: 5´ a 95°C con 35 ciclos de 40¨ a 95°C; 90¨ a 60 °C y 60¨a 72°C
- La elongación que se ejecutó fue de 10´ a 72°C y el paso final en que se expusieron las muestras fue de ∞ a 4°C.
- Los productos de PCR se almacenaron a 4°C.

3.3.6. Electroforesis y visualización.

Antes de realizar la electroforesis se mezcló 5ul de productos de PCR + 1,25 ul de tapón carga o Loading Buffer, esto se colocó en los pocillos del gel agarosa al 2% previamente ubicada en la cubeta del equipo de electroforesis con tapón TAE.

Posteriormente se hizo correr el DNA de polo negativo a positivo a 100 voltios durante 1.15 horas y se observó los fragmentos de DNA separados en la cámara UV. La identificación de grupos génico se realizó mediante la comparación de patrón de bandas de tamaño conocido que nos proporcionó el marcador (Figura 7).

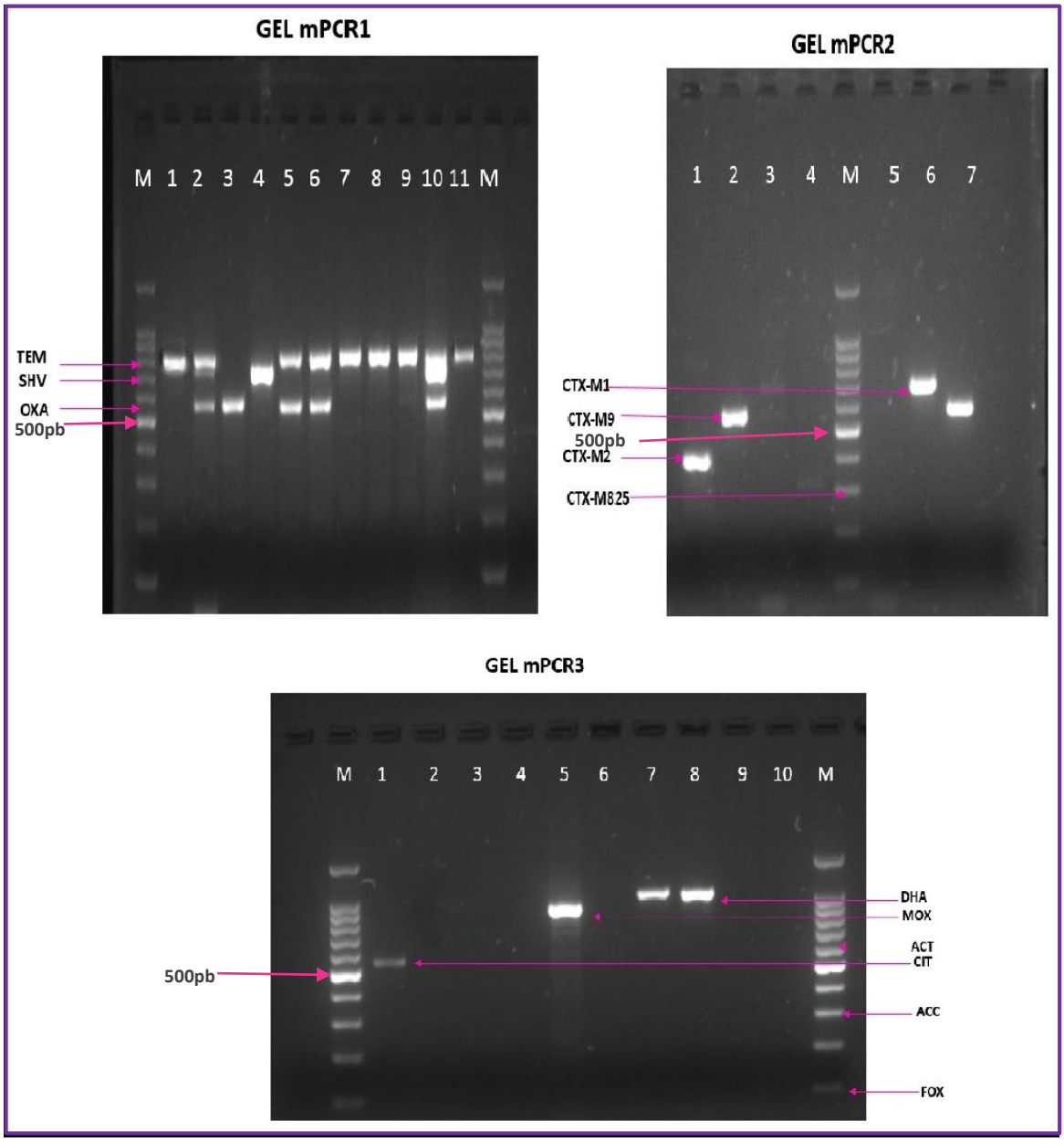

Figura 7: Comparación de bandas de los geles: mPCR1, mPCR2 y mPCR3.
Elaboración: La autora.

3.3.7. Secuenciación.

Los productos de PCR se a secuenciar a MACROGEN - Korea, una empresa que ofrece servicios de secuenciación de alta calidad (Figura 8).

p1_A01_TEMfor: Bloc de notas

Archivo Edición Formato Ver Ayuda

```
>150728-23_A02_p1_A01_TEMfor.ab1        806
CCTAGCCATTGCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGA
TCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTC
CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
GTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAA
TGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCA
TGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT
GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGC
TTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAAC
CGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCT
GCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTAC
TCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGAT
AAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGG
GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGAAATTC
AGCATTTTTTTATAAAAAAAAAAAAGGGGGAAAGAGAGGTAAATGATTAA
AAGAGG
```

Figura 8: Secuencia resultante de TEM.
Fuente: La autora

La identificación de variantes se realizó por medio del programa en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), mediante el siguiente protocolo:

- Se ingresó a http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi y se pulsó en la opción **nucleotide blast.**
- Se copió la secuencia problema y se pegó en el cuadro de **Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s).**
- En la opción **Database** se eligió la opción Nucleotide collection (nr/nt).
- La opción **Organism,** de manera opcional se colocó en nombre de la cepa bacteriana a la que pertenecía la secuencia problema.
- En **optimize for** se pulsó en Highly similar sequences (megablast).
- A continuación se pulsó el botón BLAST para la comparación. Seguidamente apareció una lista se opciones el cual se debe escoger la de mayor porcentaje de similitud, (Figura 9).

Escherichia coli strain ECONIH1 plasmid pKPC-629, complete sequence	1354	1354	91%	0.0	99%	CP009862.1
Escherichia coli strain ST540, complete genome	1354	1354	91%	0.0	99%	CP007390.1
Escherichia coli plasmid pEC386IL genomic sequence	1354	1354	91%	0.0	99%	KF182193.1
Escherichia coli plasmid pNDM-1_Dok01 DNA, complete sequence, strain: NDM-1 Dok01	1354	1354	91%	0.0	99%	AP012208.1
Escherichia coli plasmid p838C-R1, complete sequence	1354	1354	91%	0.0	99%	HQ201416.1
Escherichia coli plasmid R1 transposon Tn4, partial sequence; and transposon Tn3, complete sequence	1354	1354	91%	0.0	99%	NG_041151.1
Cloning vector pr8a	1354	1354	91%	0.0	99%	FM209526.1
Escherichia coli plasmid pAPEC-O2-R, complete sequence	1354	1354	91%	0.0	99%	AY214164.3
Escherichia coli plasmid pIGAL1, complete sequence	1354	1354	91%	0.0	99%	AY424310.1
Escherichia coli strain 8C beta-lactamase TEM-1 (blaTEM-1) gene, complete cds	1354	1354	91%	0.0	100%	GQ983301.1
Escherichia coli isolate CIT-T10 TEM beta-lactamase gene, complete cds	1354	1354	91%	0.0	99%	AF397068.1
Transposon Tn3 (E. coli)	1354	1354	91%	0.0	99%	V00613.1
E.coli plasmid pMM200 DNA	1354	1354	91%	0.0	99%	X64334.1
Transconjugation vector pROKB1	1354	1354	91%	0.0	99%	AM180349.1
Transconjugation vector pROCKB2	1354	1354	91%	0.0	99%	AM180348.1
Cloning vector RSV 5(gpt)	1354	1354	91%	0.0	99%	M83236.1

Figura 9: Similitud porcentual de secuencias en BLAST
Fuente: (BLAST, s.f.)

3.3.8. Estudio estadístico.

Una vez obtenido los datos de grupos de genes y sus variantes, se realizó cálculos estadísticos simples para determinar las frecuencias alélicas de cada uno de los genes de resistencia encontrados.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la presencia de genes BLEE y AmpC.

Después de la identificación de genes BLEE y AmpC en diferentes cepas bacterianas se obtuvo lo siguiente: el 91.25% de las cepas presentaron genes tipo BLEE y el 8.75% poseían genes de tipo AmpC (Gráfico 1). Dentro de las cepas bacterianas que presentaron genes BLEE se encontró que el 52.05% corresponden a cepas de *E. coli,* el 21.92% a *Klebsiella spp.,* el 16.44% a *Enterobacter spp*. y por último el 9.59% corresponden al grupo "otras bacterias". Para las cepas con genes AmpC se obtuvo: el 14.29% en cepas de *Enterobacter spp.* y *E. coli* respectivamente, y con el 71.43% en otras bacterias (Tabla 5). Cabe mencionar que en el presente estudio el grupo "otras bacterias" corresponden a cepas de *Citrobacter freundii, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa,* agrupadas bajo este término debido a que corresponden a diferentes familias y géneros, además de que son agentes patógenos cuya presencia en este estudio se obtuvieron en un mínimo valor porcentual.

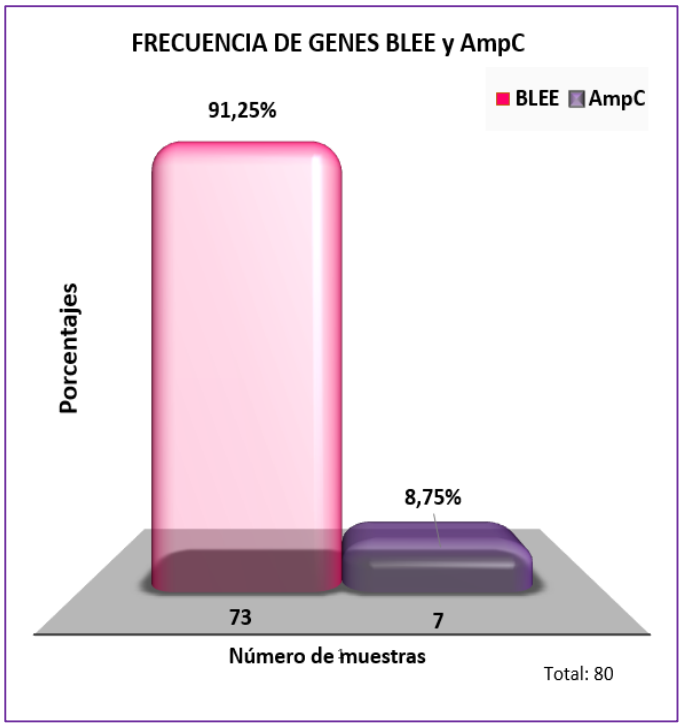

Gráfico 1: Frecuencias de genes tipo BLEE y AmpC.
Fuente: La autora

Tabla 5: Frecuencia de genes BLEE y AmpC por cepa bacteriana

Frecuencia de genes BLEE y AmpC por cepa bacteriana					
Número de cepa Bacteriana	Cepa bacteriana	Tipo de gen			
		BLEE (73 cepas)		AmpC (7 cepas)	
		N°	%	N°	%
39	*Escherichia coli*	38	52.05	1	14.29
16	*Klebsiella spp.*	16	21.92	0	0
13	*Enterobacter spp.*	12	16.44	1	14.29
12	*Otras bacterias*	7	9.59	5	71.43

Elaboración: La autora

De acuerdo al estudio realizado en Argentina por Nastro et al. (2004) se encontró que el 90% de cepas bacterianas poseen genes BLEE y el 7% presentan genes AmpC. Un estudio realizado por Malla (2014) en la ciudad de Loja, se identificó un 64.51% de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y una frecuencia del 15.78% entre *Proteus, Citrobacter y Pseudomonas* productoras de AmpC; demostrando de esta forma la predominancia de factores génicos tipo BLEE en ciertas cepas bacterianas en nuestro medio y concordando de esta forma con el presente estudio sobre la alta prevalencia de genes tipo BLEE en cepas bacterianas patógenas especialmente en *E. coli,* la cual se encuentra frecuentemente en infecciones comunes de tipo intra y extraintestinales tanto a nivel hospitalario como en comunitario.

4.2. Determinación de los grupos de génicos BLEE y AmpC independientemente a la cepa bacteriana.

En el presente estudio se detectó mediante PCR, 6 grupos diferentes de genes tipo BLEE y 3 de AmpC, cuyas proporciones se describen a continuación:

Dentro del total de cepas bacterianas que presentaron genes tipo BLEE, el grupo génico más frecuente fue TEM con el 71%, seguido de CTX-M1 con el 66%, continuando con 47% de OXA, el 29% de SHV, el 27% de CTX-M9 y 4% de CTX-M2 (Gráfico 2), dichos porcentajes se debieron a que algunas bacterias se manifestaron como portadoras de más de un grupo diferente de genes tipo BLEE.

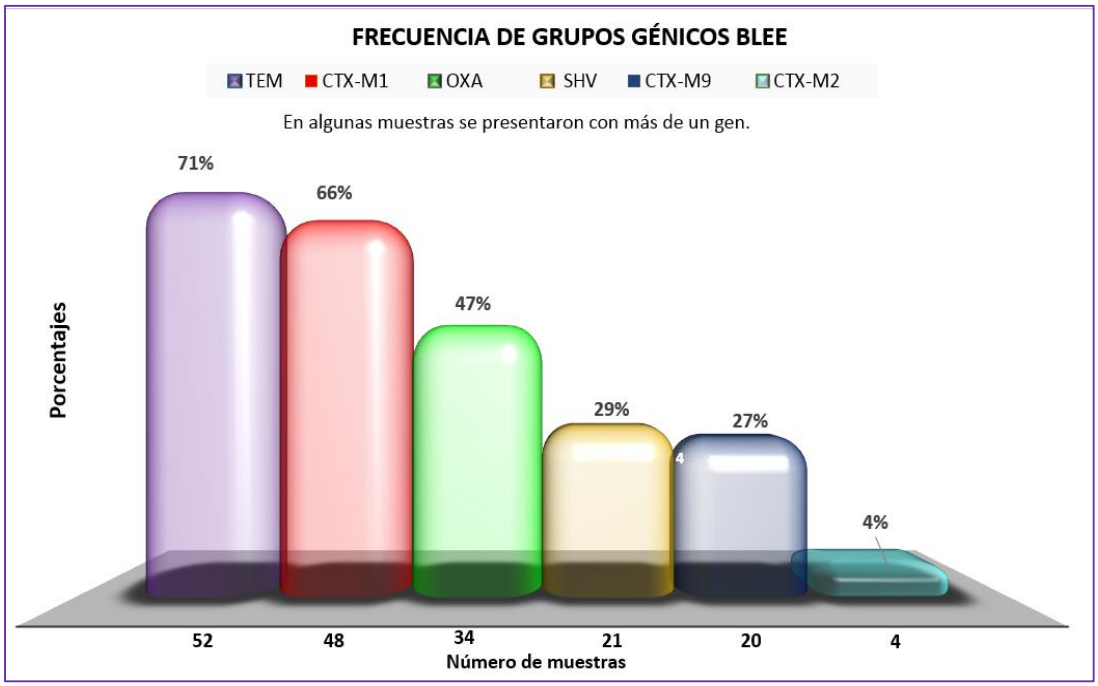

Gráfico 2: Frecuencias de tipos de genes BLEE por muestra.
Fuente: La autora

La prevalencia de los distintos tipos de genes BLEE es variable en diferentes países, ciudades u hospitales de la misma ciudad debido a su ubicación en los plásmidos, los cuales pueden transferirse a una misma o diferente cepa bacteriana y por ende llegan a diseminarse peligrosamente en diferente regiones del mundo (Guzmán et al., 2013). Una investigación realizada por Sandra, et al. (2009) en Colombia, afirmó que el grupo génico BLEE más prevalente fue TEM con el 89.3%, continuando con 85.7% de SHV y el 53.6% para los de grupo CTX-M1 (hubieron casos de bacterias que amplificaron más de un gen). Jones et al. (2009) obtuvo un valor superior del 40% de OXA en varios países de América Latina y Europa; datos que concuerdan con los hallazgos del presente estudio.

En cuanto a las 7 cepas con genes AmpC, en el presente trabajo se observó un 57% del grupo génico DHA, 29% de CIT y por último un 14% de MOX (Gráfico 3).

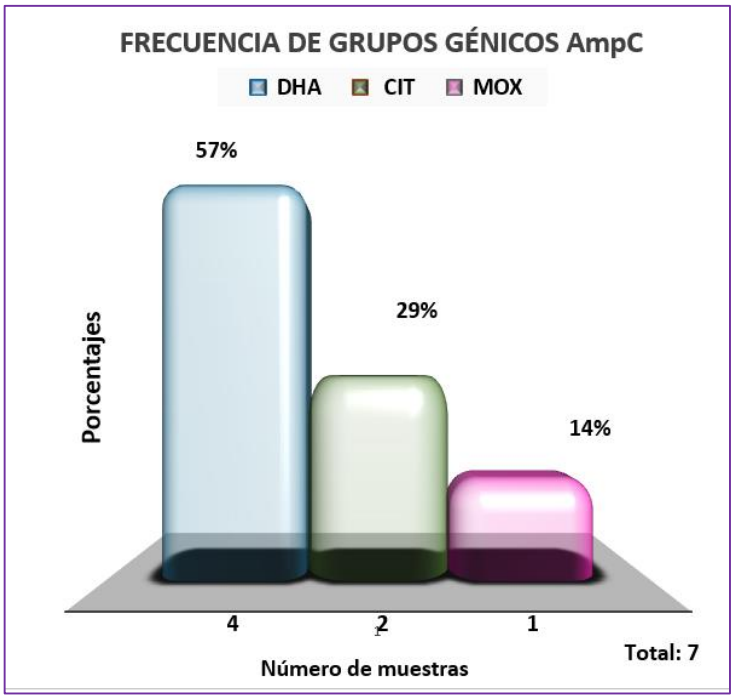

Gráfico 3: Frecuencias de genes tipo AmpC por muestra
Fuente: La autora

En Logroño-España, un estudio realizado por Porres (2015) se determinó que el 57% de sus cepas bacterianas presentaron genes de tipo DHA (variante 1), siendo este el gen más común entre los diferentes tipos de genes AmpC estudiados, los mismos que conllevan al fracaso terapéutico ante los tratamientos por combinaciones de antibióticos betalactámicos con inhibidores de betalactamasas; coincidiendo con este trabajo de investigación.

4.3. Determinación del número de genes diferentes por muestra.

Las cepas estudiadas presentaron uno o varios genes diferentes presentando una frecuencia del: 30% como portadoras de un solo gen, 28.75% presentaron dos tipos de genes, un 20% con tres genes, el 18.75% con cuatro genes y 2.5% portaron cinco genes (Gráfico 4). Además se encontró que en cepas de *E. coli* predomina la presencia de un gen con el 25.64%, en *Klebsiella spp.* se encontró tres y cuatro genes con una frecuencia del 25.33%, mientras que en *Enterobacter spp*. prevalece la presencia de uno y dos genes con 30.77%, y en “otras bacterias” dominó la presencia de un gen con el 41.67%; estos nuevos datos reflejan el surgimiento de diferentes tipos de cepas bacterianas inmunes a distintos tipos de antibióticos, a causa de la adquisición de varios genes distintos de resistencia en su estructura génica (Tabla 6).

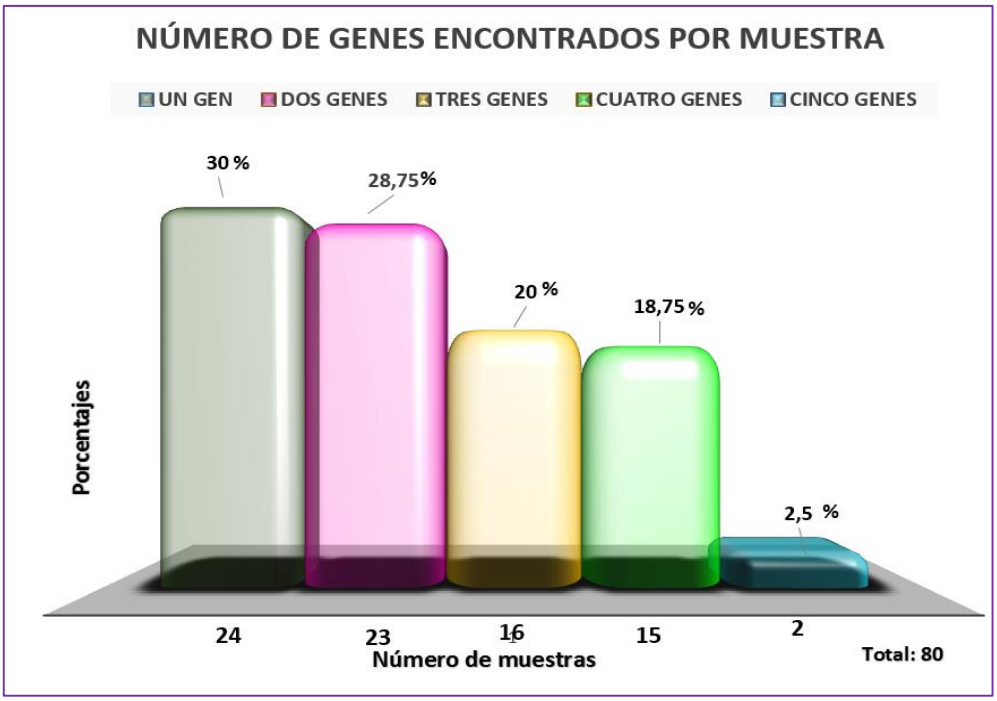

Gráfico 4: Frecuencia de número de genes diferentes por muestra.
Fuente: La autora

Tabla 6: Frecuencia de número de genes diferentes por cepa bacteriana.

Frecuencia de número de genes diferentes por cepa bacteriana								
Número de genes por bacteria	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
1 Gen	10	25.64	4	25	4	30.77	5	41.67
2 Genes	15	38.46	2	12.50	4	30.77	3	25
3 Genes	8	20.51	5	31.25	2	15.39	0	0
4 Genes	5	12.82	5	31.25	2	15.39	4	33.33
5 Genes	1	2.56	0	0	1	7.69	0	0

Elaboración: La autora

En Colombia, Sandra et al. (2009) identificó un 64.4% de bacterias productoras de un tipo de betalactamasa, un 37.1% con dos clases de estas enzimas y el 1.4% de cepas productoras de tres tipos de betalactamasas, frecuencias que junto a lo encontrado en el presente estudio demuestra la usual presencia de cepas bacterianas multirresistentes gracias a su portación de varios tipos de genes resistenciales, lo que implica mayor dificultad terapéutica en los tratamientos de infecciones.

4.3.1. Identificación de un solo grupo génico por cepa bacteriana.

Dentro de las bacterias portadoras de una sola clase de gen, se identificó la predominancia del grupo génico CTX-M1 con el 24.35%, continuando con DHA con 13.91%, seguido por SHV y TEM con un valor del 10.43% cada uno, los grupos CTX-M2 y CTX-M9 se presentaron con el 6.96% respectivamente, y MOX y CIT cada uno con un 3.48% (Gráfico 5).

También se ha observado que el grupo génico CTX-M1 predomina en *Enterobacter* con el 15.39% y en *E. coli* con un 10.26% respectivamente, tanto SHV y CTX-M9 prevalecen en *Klebsiella* spp. con una incidencia del 12.50% cada uno y DHA se presentó en "otras bacterias" con el 25% (Tabla 7).

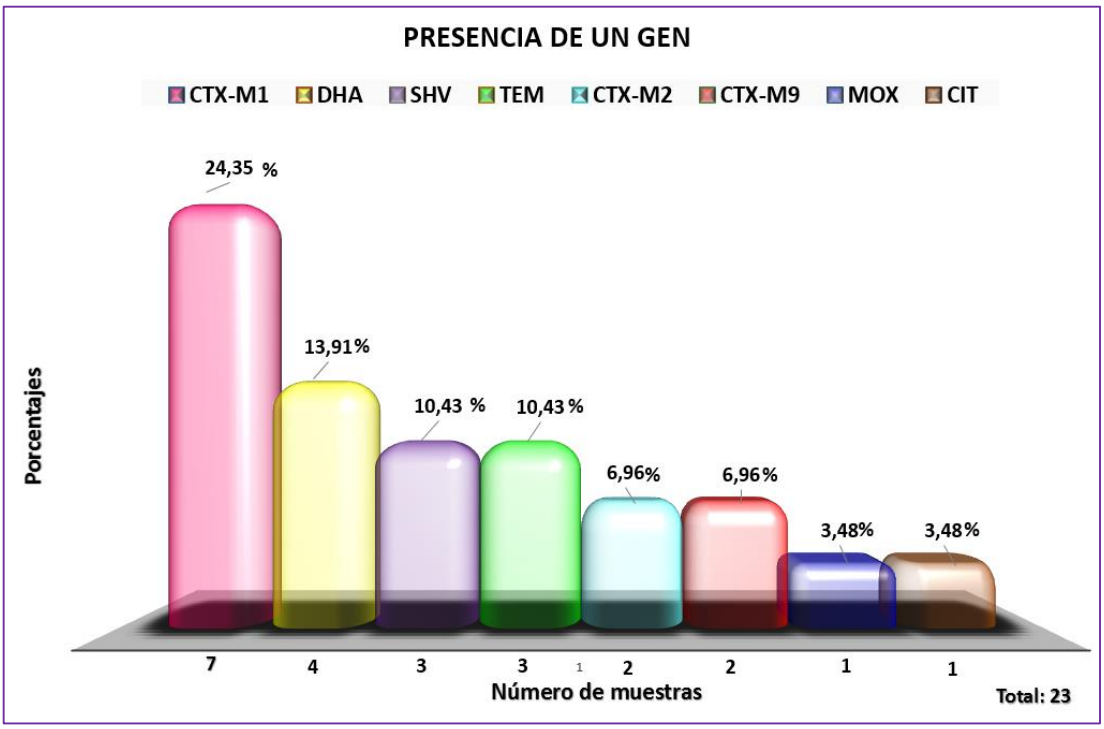

Gráfico 5: Frecuencia de un solo tipo de gen por muestra.
Fuente: La autora

Tabla 7: Frecuencia un solo tipo de gen por cepa bacteriana

Frecuencia de un solo tipo de gen por cepa bacteriana								
Tipo de gen	Cepa bacteriana.							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
CTX-M1	4	10.26	0	0	2	15.39	1	8.33
DHA	1	2.56	0	0	0	0	3	25
TEM	3	7.69	0	0	0	0	0	0
SHV	0	0	2	12.50	1	7.69	0	0
CTX-M2	2	5.13	0	0	0	0	0	0
CTX-M9	0	0	2	12.50	0	0	0	0
CIT	0	0	0	0	0	0	1	8.33
MOX	0	0	0	0	1	7.69	0	0

Fuente: La autora

En Caracas – Venezuela, Torres et al. (2006) encontró una prevalencia del 13.3% de SHV, mientras que Arce et al. (2014) determinó una frecuencia del 13% de genes TEM en Perú; sin embargo en Venezuela se identificó un valor del 4.3% para CTX-M2 de acuerdo al análisis de Marcano (2011) y en España Gude, (2010) asegura la existencia del 25.6% de genes DHA (tipo 1).

De acuerdo al estudio realizado en la ciudad de Quito por León (2014), se identificó una frecuencia del 10.9% de CTX-M1 en cepas de *E. coli y Klebsiella* resistentes a cefotaxima. En Alemania, García (2015) identificó cepas de *E. coli* con el 14.2% de CTX-M9, Casabonne, (2012) encontró en Argentina cepas de *Klebsiella pneumoniae* con un 12% de SHV. Concordando de esta forma con los datos obtenidos en este trabajo de investigación.

4.3.2. Determinación de frecuencias de más de dos grupos génicos diferentes por cepa bacteriana.

Dentro de las 24 cepas bacterianas con dos grupos de genes diferentes se reconoció combinaciones distintas, en donde la conjunción de genes TEM, CTX-M1 se presentó con el 50%, seguida por la agrupación OXA, CTX-M1 con 25%; continuando con el conjunto TEM, CTX-M9 con un 12.50%; el grupo de genes tipo TEM, SHV con 8.33% y la conjunción TEM, CTX-M2 con un 4.17% (Gráfico 6).

Tomando en cuenta el tipo de bacteria, la presencia del par génico OXA, CTX-M1 se encontró prevalente en cepas de *E. coli* en un 15.39%; mientras que el conjunto de genes TEM, CTX-

M1 se identificó en *Klebsiella spp*. con un 12.50% y en *Enterobacter spp.* con el 30.77%, y la agrupación TEM, SHV se encontró en “otras bacterias” en un 16.67% (Tabla 8).

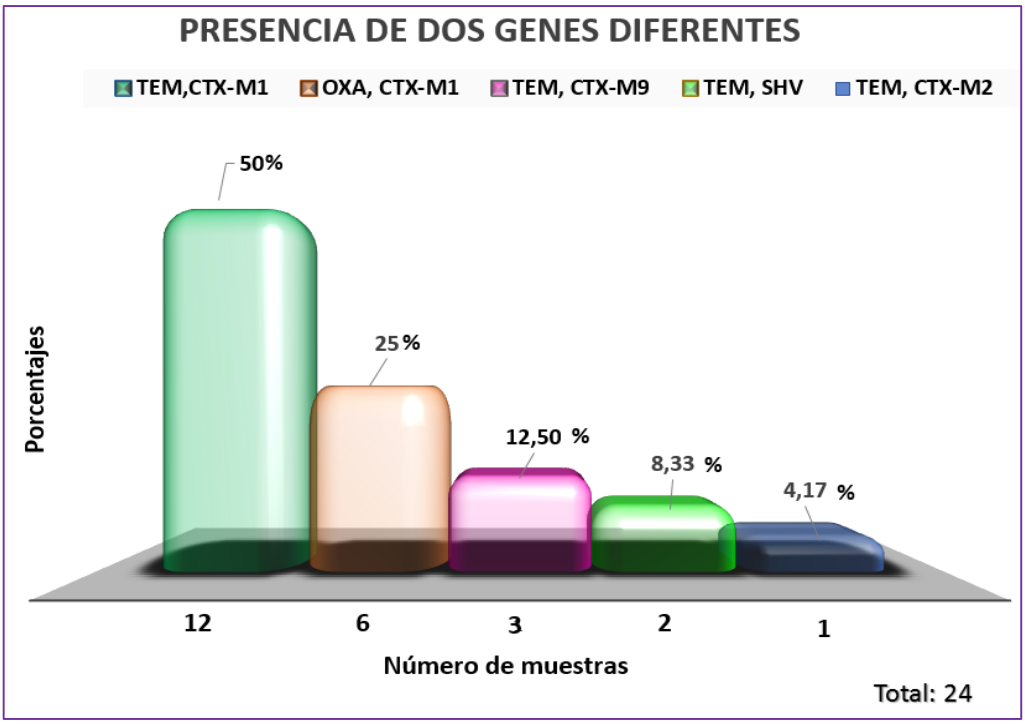

Gráfico 6: Frecuencia de dos tipos de genes por muestra.
Fuente: La autora

Tabla 8: Frecuencia dos tipos de genes por cepa bacteriana

Frecuencia de dos tipos de genes por cepa bacteriana								
Genes diferentes	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otros (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
TEM, CTX-M1	5	12.82	2	12.50	4	30.77	1	8.33
OXA, CTX-M1	6	15.39	0	0	0	0	0	0
TEM, CTX-M9	3	7.69	0	0	0	0	0	0
TEM, SHV	0	0	0	0	0	0	2	16.67
TEM, CTX-M2	1	2.56	0	0	0	0	0	0

Fuente: La autora

Acorde al estudio realizado por Torres et al. (2005) en Venezuela se encontró la asociación de TEM, SHV con el 1.96% en *Citrobacter freundii*; SHV, CTX-M con el 5.9% en *Klebsiella pneumoniae* y el 3.9% en *E. coli.* Hijaz et al. (2016) obtuvo en Líbano combinaciones de TEM, CTX-M en un 48.4%; pero Marcano et al. (2011) en Venezuela encontró la agrupación TEM, CTX-M2 con el 0.6%.

El presente trabajo concuerda con los datos de referencia sobre la reincidencia de los genes de tipo TEM y CTX-M; pero cabe mencionar que la información de ciertas combinaciones descritas en la tabla 8 y gráfico 6 no se encuentra disponible en bibliografía por falta de estudios multicéntricos que proporcionen datos al respecto.

De las 15 cepas bacterianas con combinaciones de tres tipos diferentes de genes codificantes a betalactamasas encontradas en el presente estudio, se identificó una mayor frecuencia del 26.67% del conjunto génico TEM, OXA, CTX-M9; continuando con el 20% de la agrupación de genes tipo TEM, OXA, CTX-M1; luego con el 13.33% de los conjuntos de genes TEM, OXA, SHV y de TEM, SHV, CTX-M9 respectivamente, y en un 6.67% de las siguientes combinaciones de genes: TEM, OXA, CTX-M2; la agrupación TEM, SHV, CTX-M1; el grupo de genes tipo TEM, CTX-M1, CTX-M9 y el conjunto OXA, CTX-M1, CTX-M9 (Gráfico 7).

Igualmente se ha identificado frecuencias de las diferentes combinaciones génicas por tipo de cepa bacteriana, en el cual en cepas de *E. coli* las combinaciones de genes más prevalentes son el conjunto génico TEM, OXA, CTX-M9 y el conjunto TEM, OXA, CTX-M1 con el 7.69% respectivamente, mientras que en *Klebsiella spp.* prevalece la agrupación de genes tipo TEM, OXA, SHV con el 12.50%; en *Enterobacter spp.* se encontraron los grupos de genes tipo TEM, OXA, CTX-M9 y el grupo TEM, OXA, CTX-M2 con el 7.69%, y en “otras bacterias” no se hallaron la presencia de tres tipo genes diferentes (Tabla 9).

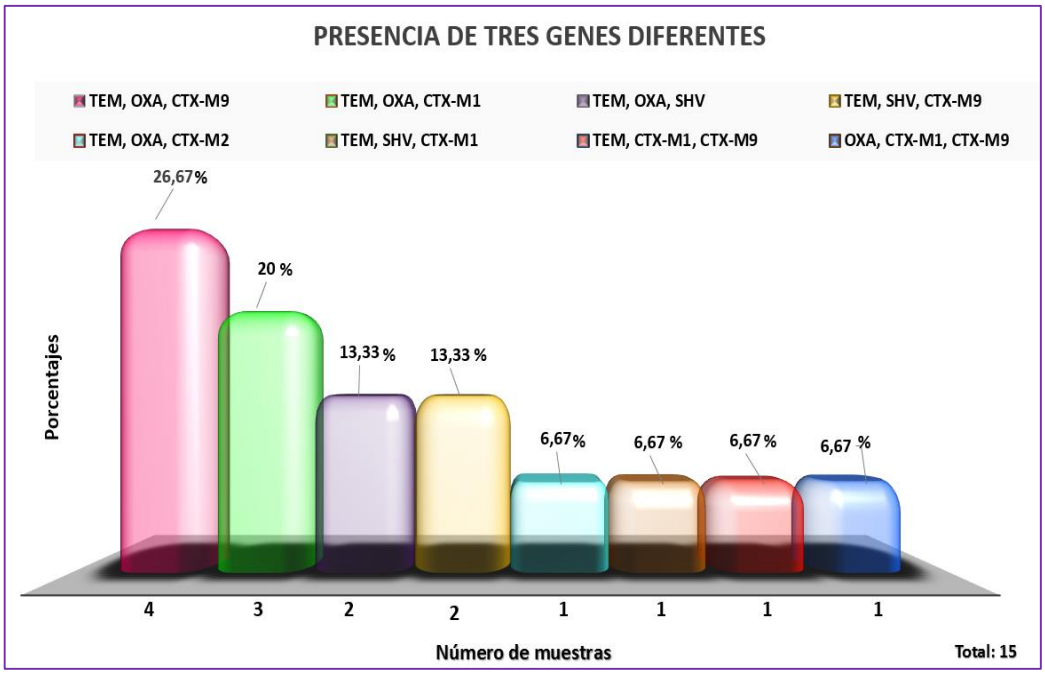

Gráfico 7: Frecuencia de tres tipos de genes por muestra
Fuente: La autora.

Tabla 9: Frecuencia de tres tipos de genes por cepa bacteriana

Frecuencia de tres tipos de genes por cepa bacteriana								
Tipos de genes	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
TEM, OXA, CTX-M9	3	7.69	0	0	1	7.69	0	0
TEM, OXA, CTX-M1	3	7.69	0	0	0	0	0	0
TEM, SHV, CTX-M9	1	2.56	1	6.25	0	0	0	0
TEM, OXA, SHV	0	0	2	12.50	0	0	0	0
TEM, OXA, CTX-M2	0	0	0	0	1	7.69	0	0
TEM, SHV, CTX-M1	0	0	1	6.25	0	0	0	0
TEM, CTX-M1, CTX-M9	0	0	1	6.25	0	0	0	0
OXA, CTX-M1, CTX-M9	1	2.56	0	0	0	0	0	0

Fuente: La autora.

Un estudio realizado en Perú por Arce (2014) se identificó la presencia de la combinación de genes: TEM, SHV, CTX-M con una frecuencia del 14.3% en pacientes de cuidados intensivos y con el 3.7% en el área de urología, enfatizando de esta forma la resistencia ante penicilinas, cefalosporinas y cefotaximas gracias a la resistencia otorgada por los genes anteriormente mencionados.

En el presente estudio ciertas combinaciones de tres diferentes genes codificantes a betalactamasas resultan ser datos nuevos, en donde se destaca la mayor incidencia de

resistencias ante: penicilinas (TEM) + oxacilinas (OXA) + cefotaximas (CTX-M) en cepas de *E. coli* y *Enterobacter spp,* además de penicilinas (TEM) + oxacilinas (OXA) + ampicilinas o cefosporinas (SHV) en cepas de *Klebsiella spp.;* dichos antibióticos son comúnmente utilizados para la mayoría de infecciones comunitarios y nosocomiales.

Asimismo se determinó cepas con combinaciones de cuatro y cinco genes diferentes constituyendo un total de 18 cepas bacterianas con esta característica, siendo la más habitual la combinación de genes tipo TEM, OXA, SHV, CTX-M1 con el 50%; seguido por el grupo génico TEM, OXA, CTX-M1, CTX-M9 con el 27.78%, mientras que para la agrupación TEM, OXA, CTX-M1, CIT y la combinación cinco genes TEM, OXA, SHV, CTX-M1, CTX-M9 corresponden al 11.11% respectivamente (Gráfico 8).

Además se logró identificar que en cepas de *E. coli* existe una frecuencia del 12.82% de la combinación génica TEM, OXA, CTX-M1, CTX-M9; mientras que en *Klebsiella spp.* se presentó una frecuencia del 13.25% del grupo génico TEM, OXA, SHV, CTX-M1; en *Enterobacter spp.* se identificó una proporción del 16.67% tanto de la agrupación TEM, OXA, SHV, CTX-M1 como TEM, OXA, CTX-M1, CIT. De la misma forma se presentó la combinación de cinco tipos de genes: TEM, OXA, SHV, CTX-M1, CTX-M9 en cepas de *E. coli* con el 2.56% y en *Enterobacter spp.* con 7.69% (Tabla 10).

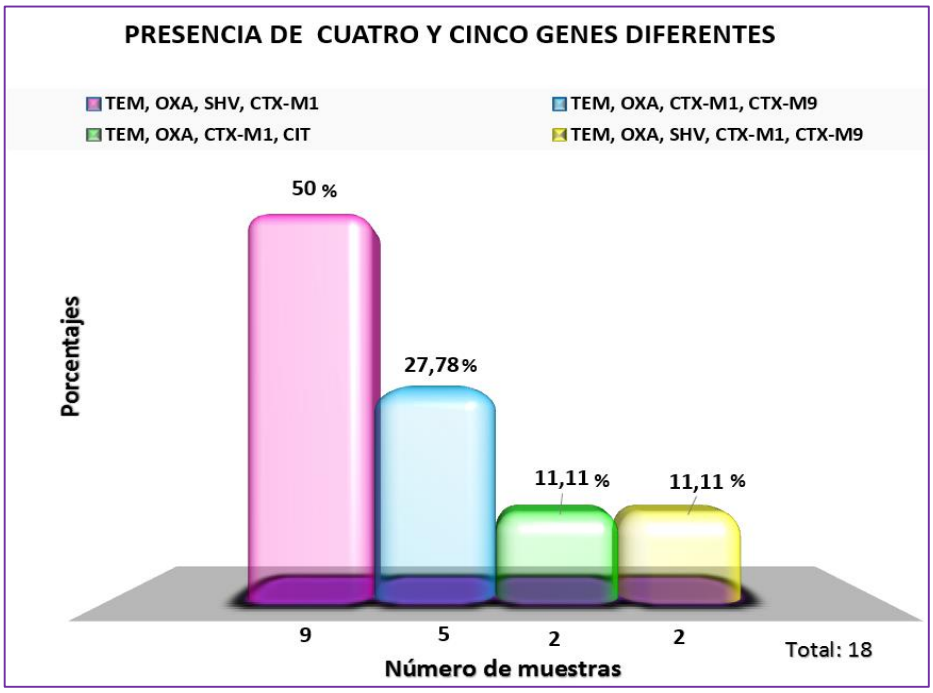

Gráfico 8: Frecuencia de cuatro y cinco tipos de genes por muestra.
Fuente: La autora

Tabla 10: Frecuencia de cuatro y cinco tipos de genes por cepa bacteriana

Frecuencia de cuatro y cinco tipos de genes por cepa bacteriana								
Tipos de genes	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
TEM, OXA, SHV, CTX-M1	0	0	5	31.25	2	15.39	2	16.67
TEM, OXA, CTX-M1, CTX-M9	5	12.82	0	0	0	0	0	0
TEM, OXA, CTX-M1, CIT	0	0	0	0	0	0	2	16.67
TEM, OXA, SHV, CTX-M1, CTX-M9	1	2.56	0	0	1	7.69	0	0

Fuente: La autora.

Los datos encontrados en el presente estudio, no se pudieron comparar con bibliografía ya que no hay información disponible que coincida con las combinaciones de cuatro y cinco genes de resistencia presentes en las cepas bacterianas estudiadas, probablemente debido a la falta de estudios multicéntricos, por lo que no se descarta la existencia de dichas combinaciones génicas a nivel mundial. Estas combinaciones se dan gracias a que las bacterias captan dichos genes capaces de diseminarse e intercambiarse provocando así la multirresistencia antibiótica y ante ello la gravedad y persistencia de la patología.

4.4. Determinación de variantes de genes BLEE por Secuenciación.

4.4.1. Identificación de Variantes TEM.

Dentro de las 25 muestras positivas para el gen TEM, se logró identificar dos tipos de variantes: TEM-1 con el 98.08% y TEM-2 con el 1.92% (Gráfico 9). Tomando en cuenta el tipo de cepa bacteriana, la variante TEM-1 predomina en cepas de *Klebsiella spp.* con el 75%, en *E. coli* con el 64.10%, *Enterobacter spp.* con el 69.23% y en “otras bacterias” con el 50%. Cabe recalcar que la variante TEM-2 se presentó en *Klebsiella spp.* con una baja frecuencia del 6.25% (Tabla 11).

Gráfico 9: Frecuencia de tipos de variantes TEM.
Fuente: La autora

Tabla 11: Frecuencia de tipos de variantes TEM por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes TEM por cepa bacteriana								
Tipos de variantes TEM	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
TEM-1	25	64.10	11	75	9	69.23	6	50
TEM-2	0	0	1	6.25	0	0	0	0

Elaboración: La autora

Los datos obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado en Colombia por Espinal et al. (2004), que determinó la mayor prevalencia de TEM-1 con el 73.3% con respecto a los otros genes estudiados y en consecuencia la alta resistencia a penicilinas.

4.4.2. Identificación de Variantes OXA.

De las 34 cepas bacterianas positivas a genes OXA se logró identificar la variante OXA-1 constituyendo una frecuencia del 100% (Gráfico 10). Considerando el tipo de cepa bacteriana,

esta variante se encontró dominante en: *E. coli* con una frecuencia del 48.72%, *Klebsiella spp.* en un 43.75%, *Enterobacter spp.* con el 38.46% y en “otras bacterias” con un 25% (Tabla 12).

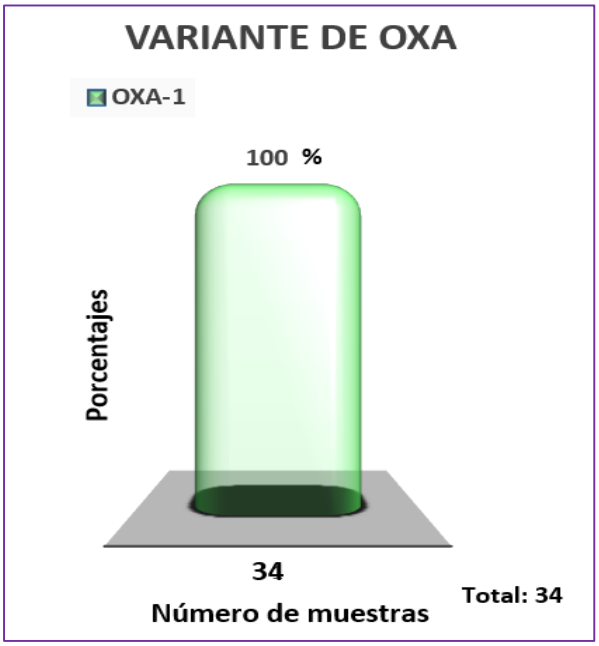

Gráfico 10. Frecuencia de tipos de variantes OXA.
Fuente: La autora

Tabla 12: Frecuencia de tipos de variantes OXA por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes OXA por cepa bacteriana								
Tipo de variante OXA	Cepas bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
OXA-1	19	48.72	7	43.75	5	38.46	3	25

Elaboración: La autora

De acuerdo a Walsh et al. (1995) en Estados Unidos se identificó la variante OXA-1 en un 36.6% en cepas de *E. coli* y en *Klebsiella pneumoniae* con el 42.2%, dichas frecuencias concuerdan con los hallazgos del presente trabajo debido a que esta variante es común entre las cepas de tipo *Enterobacteriaceae,* proporcionando así la resistencia ante la actividad de cefepime.

4.4.3. Identificación de Variantes SHV.

De las 21 cepas bacterianas con presencia de SHV, se identificó la variante SHV-11 cuya frecuencia fue del 47.62%, seguida por las variantes SHV-1 y SHV-2 con el 19.05% cada una, continuando con SHV no específico con un 9.52% y SHV-12 en un 4.76% de (Gráfico 11). Cabe mencionar que la denominación SHV no específico se debe a que su secuencia no se encontró registrada en la base de datos del programa en línea BLAST por la que no se pudo determinar el tipo de variante.

En cepas de K*lebsiella spp.* predomina la variante SHV-11 con una proporción del 31.25%, mientras que en *E. coli* se presentó las variantes SHV-11 y SHV-2 con el 2.52% cada una, en *Enterobacter spp.* prevalece la variante SHV-2 con 16.67% y en "otras bacterias" la variante SHV-11 se identificó con el 33.33% (Tabla 13).

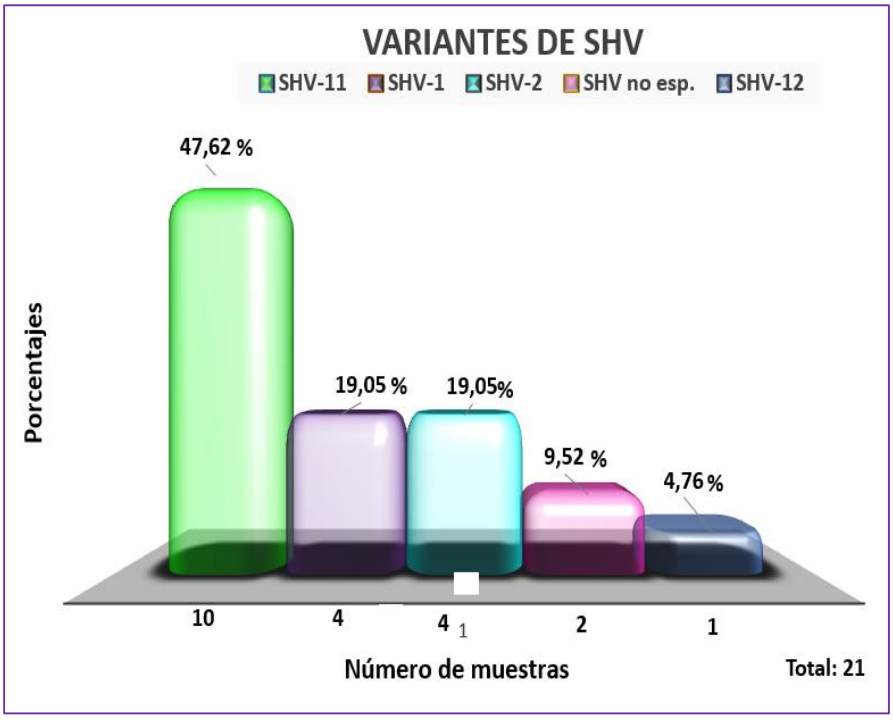

Gráfico 11: Frecuencia de tipos de variantes SHV.
Fuente: La autora

Tabla 13: Frecuencia de tipos de variantes SHV por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes SHV por cepa bacteriana								
Tipos de variantes SHV	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
SHV-11	1	2.56	5	31.25	0	0	4	33.33
SHV-1	0	0	3	18.75	1	7.69	0	0
SHV-2	1	2.56	1	6.25	2	16.67	0	0
SHV no esp.	0	0	2	12.5	0	0	0	0
SHV-12	0	0	0	0	1	7.69	0	0

Elaboración: La autora

Pulido et al. (2013) en Colombia encontró frecuencias elevadas de SHV-12 causante de la resistencia a ceftazidimas con respecto a SHV-1, SHV-2 y SHV-11 los mismos que provocan resistencia a penicilinas y a cefalosporinas. En cambio en Logroño-España, Alonso et al. (2008) identificó una frecuencia del 6.7% de variante SHV-12. Dichos datos nos demuestran junto a los obtenidos en el presente trabajo la proporción variable de diseminación de los diferentes tipos de SHV a nivel mundial.

4.4.4. Identificación de Variantes CTX-M1.

Se llegó a identificar variantes del grupo génico CTX-M1, siendo la variante CTX-M15 la más frecuente con un valor del 60.42%, continuando CTX-M3 con un 12.50%, seguido de CTX-M1 y CTX-M12 en un 10.42% cada uno, CTX-M55 con el 4.17% y el 2.08% de CTX-M no específico, cuya secuencia no se encontró registrada en la base de datos BLAST (Gráfico 12).

Considerando el tipo de cepa bacteriana, se encontró con mayor frecuencia la variante CTX-M15 en cepas de *E. coli* con el 41.03%, en *Klebsiella spp.* con un 37.70%, *Enterobacter spp.* con 30.77% y en “otras bacterias” con el 33.33% respectivamente (Tabla 14).

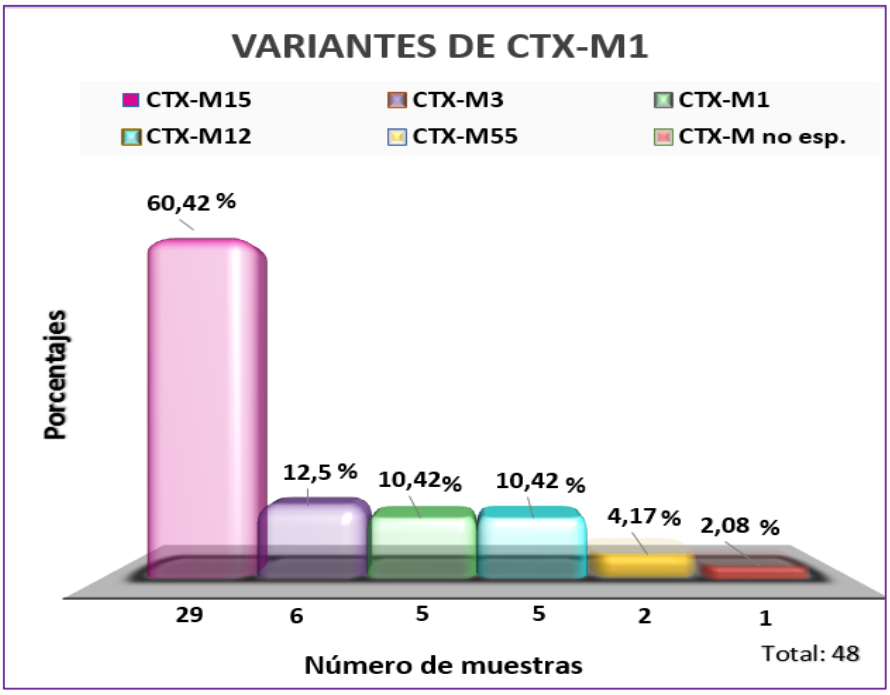

Gráfico 12: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M1.
Fuente: La autora

Tabla 14: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M1 por cepa bacteriana.

Frecuencia de tipos de variantes CTX-M1 por cepa bacteriana								
Tipo de variante CTX-M1	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
CTX-M15	15	41.03	6	37.70	4	30.77	4	33.33
CTX-M3	4	10.26	1	6.25	1	7.69	0	0
CTX-M1	1	2.56	0	0	3	23.08	1	8.33
CTX-M12	3	7.69	1	6.25	1	7.69	0	0
CTX-M55	2	5.13	0	0	0	0	0	0
CTX-M no esp.	0	0	1	6.25	0	0	0	0

Elaboración: La autora

Conforme al estudio realizado en Venezuela por Hernández et al. (2014) se encontró una alta frecuencia del 76.2% de CTX-M15, en cambio en China, Xia et al. (2014) determinó la presencia escasa de la variante CTX-M-55 con el 4.8%, cifras que coinciden con lo obtenido en el presente trabajo.

En el Ecuador en la ciudad de Quito, León (2014) identificó variantes como: CTX-M12 en cepas de *E. coli* con el 4.8%, en *K. pneumoniae* con un 2,4% y en otras enterobacterias con

el 0,8, y de CTX-M1 con una incidencia del 64.5% en cepas de *E. coli*, el 13.6% en *K. pneumoniae* y 3.6% en otras enterobacterias, resultados que difieren de los encontrados en este estudio, pero sugieren un aumento de frecuencias de dichas variantes en nuestro país.

Estos datos indican la propagación casi uniforme de las variantes del grupo génico CTX-M1 a nivel mundial, sin descartar que en nuestro país la diseminación de estas va aumentando al pasar de los años gracias a la capacidad de transmisión de genes de resistencia entre las bacterias.

4.4.5. Identificación de Variantes de CTX-M2

Dentro de las 4 cepas positivas para el grupo génico CTX-M2, en el presente estudio se llegó a identificar variantes como: CTX-M2 con el 66.67% siendo la más frecuente y con el 33.33% para CTX-M3 y CTX-M no específico (Gráfico 13). Tomando en consideración el tipo de cepa bacteriana se encontró : en *E. coli* prevalece la variante CTX-M2 con el 5.13% y mientras que en *Enterobacter spp.* se identificó el 7.69% de CTX-M no específica (Tabla 15).

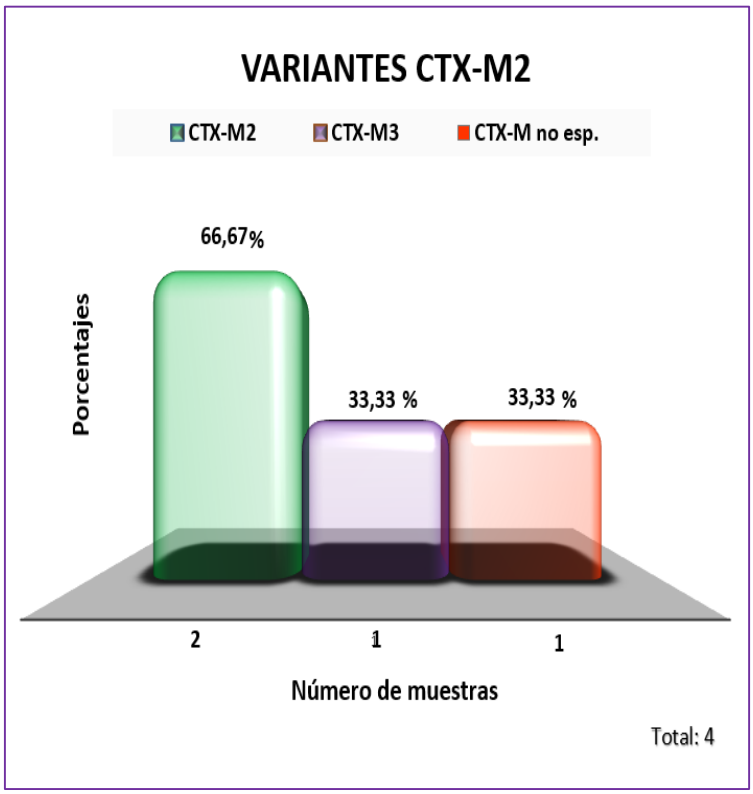

Gráfico 13: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M2.
Fuente: La autora

Tabla 15: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M2 por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes CTX-M2 por cepa bacteriana								
Tipos de variantes CTX-M2	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
CTX-M2	2	5.13	0	0	0	0	0	0
CTX-M3	1	2.56	0	0	0	0	0	0
CTX-M no esp.	0	0	0	0	1	7.69	0	0

Elaboración: La autora

León (2014) en la ciudad de Quito, halló la presencia de CTX-M2 con el 13.6% entre los 110 aislados reportados como productores de BLEE en su estudio. Mientras que Azam et al. (2016) en la India observó un 7.5% de CTX-M3 siendo ésta la menos frecuente de sus aislados. Los datos bibliográficos encajan con los porcentajes de la presente investigación, destacando la presencia de CTX-M2 entre las otras variantes BLEE y junto a esto la resistencia a antibióticos como cefotaxima o ceftriaxona.

4.4.6. Identificación de Variantes de CTX-M9.

Entre las 20 muestras positivas para CTX-M9, se encontró una prevalencia del 80% de la variante CTX-M14 y un 20% de CTX-M65 (Gráfico 14). Considerando el tipo de bacteria se llegó a identificar una frecuencia del 28.21% y 25% de CTX-M14 en cepas de *E. coli* y en *Klebsiella spp.* respectivamente, mientras que en *Enterobacter spp.* se encontró el 7.69% de CTX-M14 y CTX-M65 por variante (Tabla 16).

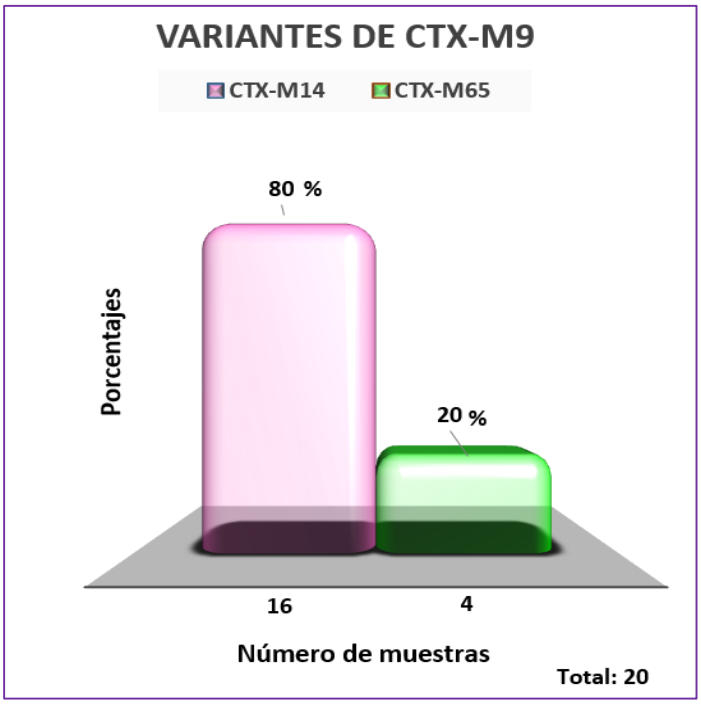

Gráfico 14: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M9.
Fuente: La autora

Tabla 16: Frecuencia de tipos de variantes CTX-M9 por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes CTX-M9 por cepa bacteriana								
Tipos de variantes CTX-M9	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
CTX-M14	11	28.21	4	25	1	7.69	0	0
CTX-M65	3	7.69	0	0	1	7.69	0	0

Elaboración: La autora

Nair (2012) en Nueva Zelanda identificó una nueva variante denominada CTX-M65 con una frecuencia del 1.8%, la misma que junto a CTX-M14 conceden la capacidad de hidrolizar ceftazidima. León, (2014) en la ciudad de Quito determinó una frecuencia del 6.4% de CTX-M14 en cepas de *E. coli.*

No obstante se concuerda con los estudios de referencia sobre la baja frecuencia de CTX-M14 comparada con las variantes de otros grupos génicos BLEE, pero asimismo esta prevalece dentro del grupo CTX-M9.

4.5. Determinación de Variantes AmpC.

4.5.1. Variantes DHA

En el presente estudio, dentro de las 4 cepas con DHA encontradas, se identificó la variante DHA-1 con el 75% y la variante DHA no específico con el 25% (Gráfico 15). Considerando el tipo de cepa bacteriana, se identificó el 2.56% de DHA-1 en cepas de *E. coli*, mientras que en "otras bacterias" se encontró la misma variante con una frecuencia del 16.67% y DHA no específico con 8.33% (Tabla 17). Enfatizando de ésta forma la resistencia predominante hacia las cefalosporinas de tercera generación inducida por DHA-1.

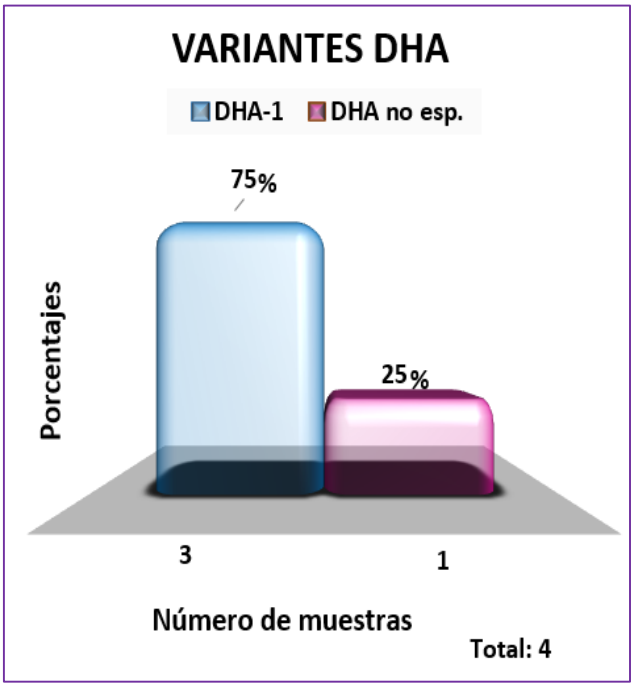

Gráfico 15: Frecuencia de tipos de variantes DHA.
Fuente: La autora

Tabla 17: Frecuencia de tipos de variantes DHA por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes DHA por cepa bacteriana								
Tipos de variantes DHA	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
DHA-1	1	2.56	0	0	0	0	2	16.67
DHA no esp.	0	0	0	0	0	0	1	8.33

Elaboración: La autora

Un estudio realizado por Song et al. (2006) en hospitales de Seúl identificó una frecuencia del 0.8% de la variante DHA-1 en aislados bacterianos de *P. mirabilis*. Sin embargo Porres (2015), en Logroño-España determinó una frecuencia del 33.33% de la misma variante en cepas de *Klebsiella*. Los datos de referencia junto a los resultados de este trabajo no coinciden, demostrando una distribución no homogénea de la variante DHA-1 en ciertas cepas bacterianas a nivel global.

4.5.2. Variantes CIT.

En el presente estudio dentro de las dos cepas bacterianas que manifestaron genes CIT, se presentó la variante CMY-75 en un 100% (Gráfico 16). Por otra parte tomando en consideración el tipo de cepa bacteriana, esta variante solamente se halló presente en "otras bacterias" con una frecuencia del 16.67% (Tabla 18).

Gráfico 16: Frecuencia de variantes CIT.
Fuente: La autora

Tabla 18: Frecuencia de tipos de variantes CIT por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes CIT por cepa bacteriana								
Tipo de variante CIT	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
CMY-75	0	0	0	0	0	0	2	16.67

Elaboración: La autora

De acuerdo al registro en GenBank, la variante CMY-75 es común en *Citrobacter freundii* y *Proteus mirabilis*, las mismas que se encuentran dentro de nuestra agrupación "otras bacterias", explicando de esta forma la presencia de la variante CMY-75 en nuestro estudio y constituyendo un nuevo dato debido a que la información de su incidencia no se encuentra disponible.

4.5.3. Variante MOX.

De la única muestra positiva a MOX en nuestro estudio, se identificó la variante MOX no específica (Gráfico 17), el cual dentro de las 13 cepas de *Enterobacter spp.* constituyó el 7.69% de prevalencia (Tabla 19).

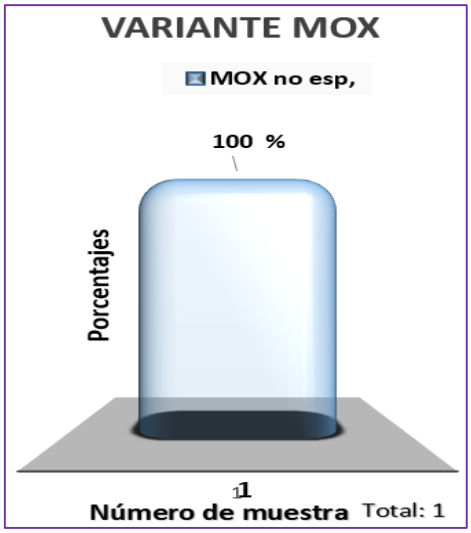

Gráfico 17: Frecuencia de variantes MOX.
Fuente: La autora

Tabla 19: Frecuencia de tipos de variantes MOX por cepa bacteriana

Frecuencia de tipos de variantes MOX por cepa bacteriana								
Tipo de variantes MOX	Cepa bacteriana							
	Escherichia coli (39 cepas)		*Klebsiella spp.* (16 cepas)		*Enterobacter spp.* (13 cepas)		Otras bacterias (12 cepas)	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
MOX no esp.	0	0	0	0	1	7.69	0	0

Elaboración: La autora

En el presente estudio no se pudo determinar el tipo de variante MOX, debido a que su secuencia no se encontró registrada en el programa en línea BLAST, pero según Helmy and Wasfi (2014) estas variantes se encuentran en pequeñas frecuencias en cepas de *Klebsiella, Proteus y* en otras enterobacterias razón por la cual en el presente estudio se logró identificar un caso dentro de grupo bacteriano “otras bacterias”.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Al culminar el estudio realizado mediante PCR multiplex y secuenciación en los 80 stocks de cepas bacterianas diagnosticadas microbiológicamente como productoras de BLEE y AmpC, se puede concluir lo siguiente:

- Los genes que manifestaron mayor frecuencia en las cepas bacterianas estudiadas fueron los de tipo BLEE, entre los cuales se llegó a identificar diferentes grupos génicos como: TEM, OXA, SHV, CTX-M1, CTX-M2 y CTX-M9; llegando a destacar entre estas el grupo TEM, la misma que se asocia a la resistencia bacteriana a penicilinas. Asimismo con una baja frecuencia se manifestaron los genes tipo AmpC, en donde se llegó a determinar tres grupos: DHA, CIT y MOX; cuyo gen dominante entre ellos fue DHA el mismo que proporciona resistencia a cefamicinas.
- Las cepas analizadas se evidenciaron como multirresistentes debido a que eran portadoras de más de un gen de resistencia cuyo número de genes y combinaciones se constituyeron como datos nuevos; sin embargo también se observó la prevalencia de cepas portadoras de un solo gen, en donde predominó la presencia de CTX-M1 responsable de la resistencia a cefotaximas.
- Dentro de las cepas multirresistentes se observó combinaciones de dos genes cuya dominancia entre ellas fue la combinación TEM, CTX-M1; recalcando así la resistencia a penicilina + cefotaxima. Entre las combinaciones de tres genes distintos predominó TEM, OXA, CTX-M9; asociadas a la resistencia de penicilina + oxacilina+ cefotaxima. Y por último la combinación más frecuente entre cuatro y cinco genes diferentes fue TEM, OXA, SHV, CTX-M1; relacionada con la resistencia a penicilina + oxacilina + ampicilina o cefalosporina + cefotaxima. Todas estas condiciones génicas se encontraron dominantes en cepas de *E. coli, Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*
- Cada grupo de genes BLEE presentaron diferentes variantes destacando por grupo génico las variantes TEM-1 responsable a la resistencia a penicilinas, OXA-1 que induce resistencia a cefepime, SHV-11 relacionada a la resistencia a penicilinas y cefalosporinas, asimismo la variante CTX-M2 que provoca resistencia a cefotaxima o ceftriaxona, y las variantes CTX-M14 y CTX-M15 responsables de la resistencia a ceftazidima. Las variantes mencionadas se manifestaron en cepas de *E. coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp.* y en el grupo “otras bacterias”
- En los grupos génicos de tipo AmpC predominaron las variantes como DHA-1 que estimula la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, CMY-75 que impulsa a la resistencia de cefamicinas y la variante MOX no específica cuya determinación no se pudo realizar por la ausencia de su secuencia en los datos BLAST. Estas variantes se encontraron en cepas de *Enterobacter spp.* y en el grupo “otras bacterias” dentro

del cual se constituye cepas de *Citrobacter freundii, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa.*

- Los resultados obtenidos revela la distribución extendida de los genes de resistencia a betalactámicos en bacterias de distintas familias, promoviendo a la multirresistencia antibiótica y con ello al aumento de la virulencia patogénica.
- Los datos conseguidos en el presente estudio, establecen un fuerte indicativo para restringir de forma estricta los tratamientos con antibióticos sin previo análisis completo, para dar paso a terapias antibióticas específicas; ya que sin aquellas se promueve a la propagación y surgimiento de nuevas cepas bacterianas inmunes a la profilaxis con diferentes familias de antibióticos, conllevando en un futuro al fracaso de múltiples opciones terapéuticas con estos fármacos y al incremento de la mortalidad causada por patologías bacterianas que en la actualidad se tratan sin dificultad.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio para determinar por secuenciación las variantes: SHV, CTX-M (del grupo CTX-M1 y CTX-M2), DHA y MOX que en el presente estudio se presentaron como no específicas, tomando en cuenta que se debe usar cepas con menor tiempo de criopreservación, con la finalidad de evitar algún tipo de daño celular o material génico del mismo.
- Para estimar la situación clínica con respecto a resistencia bacteriana, se debería ampliar el estudio en donde abarquen más instituciones hospitalarias a nivel provincial para obtener datos seguros y actualizados. Además se considera la necesidad de tomar medidas de concientización a través de campañas de vinculación a la sociedad sobre el uso incorrecto de los antibióticos y el implemento de análisis moleculares en los hospitales, tomando como referencia el presente proyecto para la identificación específica de resistencia bacteriana y con ello la terapia antibiótica adecuada, con el fin de frenar aumento y surgimientos de nuevas bacterias multirresistentes.

BIBLIOGRAFIA

- Alcocer, I. Barba, P. Iñiguez, D. Mora, M. Ortega, D. y Zurita, J. (2012). Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo KPC-2: primer reporte en el Ecuador. *Rv. Científica Médica de Quito. 27(1-2),* 39-41.
- Alvarez, J. (1991). *Mapa bacteriológico de bacilos gram negativos.* Tesis doctoral . Universidad Complutense, Madrid.
- Alonso, M., Chanoine, N. Blanco, Dahbi, M. G. Mora, A. Blanco, J.E. López, C. Leflon, V. Puentes, V. Herrera, A. Coira, M. García F. Pita, J. y Blanco, J. (2008). Serotipos, genes de virulencia, grupos filogenéticos y tipado molecular por pfge de aislados clínicos de escherichia coli productores de betalactamasas de espectro extendido (blees) ctx-m14 y ctx-m-15, *Enfermedades infeccionsas y Microbiología clínica. 26,* 1-221
- Azam, M. Jan, A. y Rizwanul, Q. blaCTX-M-152, a novel variant of CTX-M-group-25, identified in a study performed on the prevalence of multidrug resistance among natural inhabitants of river Yamuna, India. (2016). *Front. Microbiol*. 7,176. doi: 10.3389.
- Applied, b. (s.f.). Fecha de consulta 25 de Diciembre del 2015. www.products.appliedbiosystems.com. Obtenido de https://products. appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=608664&tab= Overview
- Antimicrobial Resistance Surveillance Nework . (2012). *Antimicrobial resistance surveillance in Europa.* Recuperado de http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf
- Avellaneda, J. M. y Pacheco, E. (2001). *Estudio de la resistencia a los antibacterianos en el Centro Médico Naval de Enero a Diciembre del 2000.* Tesis de Químico Farmacéutico . Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Arce, Z. Llontop, J. Alarcón, E. y López, E. (2014). *Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de Escherichia coli β-lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo- Perú. Revista cuerpo médico HNAA, 7(3).* 27-30
- Azrak, M., Agustini, M., Fernández, Z., Peruffo, M. y Malvaso, R. (2009). Absceso cerebral por *Citrobacter koseri* en lactantes, presentación de un caso clínico y revisión de la bibliografía. *Arch Argent Pediatr*,*107(6),* 553-556.
- Bauernfeind, A., Chong, Y. y Schweighart, S. (1989). Extended broad spectrum beta-lactamase in Klebsiella pnemoniae including resistance to cephamycins. *Infection, 17,* 316-21.

- Barrera, M. (2005). *Determinación de perfil de resistencia antibiótica de Escherichia coli, Klebsiella oxytoca y Klebsiella pneumoneae en el sanatorio privado "Nuestra Señora del Pilar"* .Tesis de Químico Biologo . Universidad de San Carlos Guatemala. Guatemala.
- Blasquez, J. Morosini, M. Gonsalez, M. y Baquero, F. (1995). Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother, 39 (1),* 145.
- BLAST. (s.f.). *www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/*. Fecha de consulta : 23 de Diciembre del 2015. Obtenido de http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- Cantón R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L. , Baquero, F. and Coque, T. (2008). "Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe." Clin Microbiol Infect 14 Suppl 1: 144-53.
- Casabonne, C. Pérez, J. Balagué, C. y Fernández, L. (2012). Diversidad de β lactamasas en aislamientos clínicos de enterobacterias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 46(3)*. 405-12
- Casellas, J. (2011). *Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología*. Rev Panam Salud Publica. 30(6), 519–28.
- Costa, A. y Botta, G. (1984). Resuption of cell division of filaments induced in Escherichia coli by betalactam antibiotics possessing affinity for PBP3. *Drug. Exp. Clinical Microbiology Rev., 10,* 775-780.
- Coronell, W. Perez, C. Guerrero, C y Bustamante, H. (2009). Sepsis Neonatal. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría, 90,* 57-68.
- Chanawong, A. M'Zali, F. Heritage, J. Lulitanonnd, A. y Hawkey, P. (2000). Characterisation of extended-spectrum ß-lactamases of the SHV family using a combination of PCRsingle strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett, 184*, 85-89.
- Datta, N. y Kontomichalon, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infecticus R-facters in Enterobacteriaeeae. *Nature 208*, 239-241
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *65,* 490-495.
- Diestra, K . Coque, T. Moró, E. Oteo, J. Nicolau, C. Campos, J. Moyá, B. Pérez, M. Cantón, R, Oliver, y Navarro, F. (2008). Caracterización y epidemiología molecular de

betalactamasas de espectro extendido en Escherichia coli y Klebsiella pneumoneae en once hospitales españoles (2004*).Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica, 27. doi: 10.1157/13125636*

- Ewing, W. y Davis, B. (1972).Biochemical characterization of Citrobacter diversus (Burkey) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain. Int J Syst Bacteriol . *International Association of Microbiological Societies* ,*22,* 12-18
- Espinal, P. Mantilla, J. Saavedra, C. Leal, A. Alpuche, C. y Valenzuela, E. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por Klebsiella pneumoniae productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica. 24(3).*
- Fica, A. (2015). Resistencia antibiótica en bacilos grama negativos, cocáceas gram positivas y anaerobios implicaciones terapéuticas. *Revista Médica Clínica Condes. 25(3),* 432-444
- Forbes, B. Sahm, D. Weissfeld, A. y Trevino, E. (2007). *Diagnóstico microbioógico.* Buenos Aires, Bogotá: Editorial Médica Panamericana.
- García, S.Kock, R. Mellmann, A. Frenzel, J. Friedrich, W. and Rosen, J. (2015). Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β-Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. *PLoS One,* 10(7)
- García, J., Fresnadillo, M., Arce, J., García, E. y López, R. (1999). *Antimicribianos en la medicina, antibióticos betalactámicos.* Barcelona: Editorial Prous Science.
- Guamán, J. Guamán, M. y Lima, M. (2015). *Resistencia bacteriana por producción de b lactamasas de espectro extendido en enterobacterias en pacientes del Hospital Vicente Corral Moscoso enero-diciembre 2013*. Universidad de Cuenca. Tesis de Medicina. Cuenca, Ecuador.
- Guzmán, M. Rodríguez, E. Antón, K. Silva, S. Navarro, J. Lastra, L. Salazar E. y Alonso, G. (2013). Genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Investigación Clínica. 54 (3).*
- Gude M, Seral C, Arias A, Cebollada R, González M, Salvo S, et al. (2010). Prevalencia de AmpC plasmídicas en enterobacterias de origen clínico. En: XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clinica*; 508.
- Hart, M. y Espinoza, F. (2008). Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli. *Revista Cubana de Medicina, 47(4)*
- Helmy, M. y Wasfi, R. (2014). Phenotypic and Molecular Characterization of Plasmid Mediated AmpC β-Lactamases among Escherichia coli, Klebsiella spp., and Proteus

mirabilis Isolated from Urinary Tract Infections in Egyptian Hospitals. *BioMed Research International. 2014,* 1- 8.

- Hernando, M. (2013). *Resistencia a betalactámicos y fluoroquinolonas en Salmonella entérica Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica.* Tesis doctoral. Universidad de la Rioja. Logroño-España
- Hernández, E. Araque, M. Millán, Y. Millán, B. and Vielma, S. (2014). Prevalencia de [beta]-lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de Escherichia coli uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Investigación clínica, 55 (1).* 32 – 43
- Hijazi, S. Fawzi, M. Ali, F. and Abd, K. (2016). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae in healthy children and associated risk factors. *Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials, 15 (3).* 1-9.
- Iañez, E. (1998). *Curso de Microbiología general*, *Resistencia bacteriana a los antibióticos.* Recuperado de http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm#mutant
- Ingraham, J. y Ingraham, C. (1998). *Introducción a la Microbiología.* México: Editorial Reverté, S.A.
- Jacoby, G. y Muñoz-Price, L. (2005). "The new beta-lactamases". *N Engl J Med 352(4)*: 380-91.
- Jacoby, C. y Matthew, M. (1979) The distributien of β-lactamase genes en piasmids feund in Pseudomonas. *Plasmid*, *2*, 41-47.
- Jarlier, V. Nicolas, M. Fournier, G. y Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infectius Diseases 10*(4), 867-878.
- Jones, C. Tuckman, M. Keeney, D.Ruzin, A. and Bradford, P. (2009). Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Encoding Genes from Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis Isolates Collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials. *Antimicrobial agents and Chemotherapy. 53 (2),* 465-475.
- Jones, R. (1985). Review of the in vitro spectrum of activity of imipenem. *American Journal of Medicene, 78(6A),* 22-32
- Knothe, H. Shah, P. Krcmery, V. Antal, M. y Mitsuhashi, S. (1983). "Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. Infection, 11(6),* 315-317.

- Larrondo, M. (2010). Infección por bacilos gram-negativos no fermentadores, problemática en las unidades de cuidados intensivos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas, 9(5),* 680-687.
- León, L. (2014). *Determinación de variantes genéticas de enzimas betalactamasas procedentes de cepas bacterianas aisladas de Centros Hospitalarios en Quito.*Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito
- León, C. y Pacheco, M. (2010). *Epidemiología de las infecciones por microorganismos productores de BLEE en el Hospital Vozandes Quito entre los años 2005-2009.* Tesis de Medicina. Universidad del Azuay. Cuenca, Ecuador.
- Levesque P. y Jacoby, C. (1988). Molecular structure and interrelatienships of multiresistance betalactamase transpesons*. Plasmid, 19*, 21-29.
- Livermore, D. y Brown. (2001). Detection of β-lactamase-mediated resistance. *Journal Antimicrobial Chemotherapy ,48(S1),*59-64.
- Lilliam, J. Machado, L. y Hamilton, L. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Revistas Médicas Cubanas. 8(1),* 13-27
- Ling. M. Alba, J. Chang, F. Ishiguro, M. Yamaguchi, K. Siu, L. y Ishii, Y. (2005). Novel SHV-derived extended-spectrum betalactamase, SHV-57, that confers resistance to ceftazidime but not cefazolin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy 49(2),* 600-605.
- Livermore, D. (1991). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis. 78,* 7-16
- Livermore, D. Canton, R. Gniadkowski, M. Nordmann, P. Rossolini, G. Arlet, G. Ayala, J. Coque, T. Kern-Zdanowicz, I. Luzzaro, F. y Poirel, L. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59(2),*165-174.
- Martínez, F., Gómez, S., Rodriguez, P., Páez, J., Urbina, G., y Ortiz, B. (2005).*Klebsiella pneumoneae y Klebsiella oxytoca* aisladas de niños con diarrea: adherencia y citoxicidad en líneas celulares. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 25(2).*
- Mabilat, C. and Courvalin, P. (1990). Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents Chemotheraphy*, *34(11)*. 2210–2216.
- MACROGEN. (s.f.). *http://www.macrogen.com/ar.* Fecha de consulta: 28 de diciembre del 2015.Obtenido en línea de http://www.macrogenlatam .com.ar/servicios.html.
- Malla, Y. (2014). Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el periodo octubre –noviembre 2013.(Tesis de grado). Universdad Técnica Particular de Loja, Loja.

- Mar, M. y Francesc, G. (2003). Enfermedades infecciosas microbiológicas clínicas. *Elsevier, 21(1),* 42-55.
- Marcano, D. De Jesús, A. Hernández, L. y Torres, L. (2011). Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias Caracas – Venezuela. *Revista Panamericana de la Salud Publica, :30(6):529–34.*
- Martinez, J. (1992). *Resistencia a antibióticos betalactámicos en Enterobacteriaceae y Pseudomona aeruginosa.* Tesis doctoral no publicad*.* Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Mandell, G. Bennett, J. y Dolin, R. (2005). *Principles and practice of infectious diseases*. United States: Editorial Copyrighted Material.
- Medeiros, A y Jacoby, G. (1986). Beta- Lactam Antibiotics for Clinical. *PubMed. 207(1)*. 69-74
- Mesa, J. García, E. Vila, y Vila, J. (2003). Macrólidos, estólidos y estreptograminas. *Enferm. Microbiol, Clin, 21,* 200-8
- Merino, L. (2013). *Material de estudio de cátedra: Estructura bacteriana*. Universidad Nacional del Nordeste. Recuperado de: http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Morfologia%20bacteriana.pdf
- Nair, R. (2012). Comparative epidemiology of CTX-M-14 and CTX-M-15 producing Escherichia coli: Association with distinct demographic groups in the community in New Zealand. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 31(8), 2057-2060.
- Nakano, R., Okamoto, R., Nakano, Y., Kaneko, K., Okitsu, N., y Hosaka, Y. (2004). CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from Citrobacter freundii. *Antimicrobial Agents Chemotherapy, 48,* 1151-8.
- Nastro, M., Montoto, L. Saposnik, E. García, S. Barberis, C. Vay, C. Rodríguez, A. (2012). Resistencia a cefalosporinas de espectro extendido en enterobacterias sin AmpC inducible. *Revista argentina de microbiología. 44,* 30-35
- Natthew, M., Hedqes, M. y Smith. (1979). Types of beta-lactamase deLermined by plasmids in gram negative bacteria*. Journal of Bacteriology,138,* 657-662.
- Organizacion Mundial de la Salud. (2014). *Primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone en manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo*. Recuperado de http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/

- Organizacion Mundial de la Salud. (2001). *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a antimicrobianos.* Ginebra, Zuisa. Recuperado de http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf
- Paterson, D. y Bonomo, R. (2005). Extended spectrum beta-lactamases: clinical update. *Clin Microbiol Rev. 18(4),* 65-86.
- Philippon, A. Arlet, G. y Jacoby G. (2002). Plasmid determinated AmpC-type betalactameses . *Antimicrobials Agents Chemotherapy, 46,* 1-11.
- Pinilla, G. Muñoz, L. Navarrete, J.y Arévalo, A, (2012). El ataque de las bacterias: cómo prevenirlo sin morir en el intento. *Nova, 10(*18).
- Poirel, L., Naas, T. Thomas, I. Karim, A. Bingen, E. y Nordmann, P. (2001). CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrobial Agents Chemotherapy 45(12),* 3355-61.
- Porres, N. (2015). *Detección y bases genéticas de Beta-lactamasas AmpC y Carbapenemasas en aislados clínicos y comensales de enterobacterias.* Tesis doctoral. Universidad de la Rioja. Logroño
- Prinarakis,E. Tzelepi, E. Gazouli, M. Mentis, A. y Tzouvelekis. (1996). Characterization of a novel SHV betalactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme. *FEMS Microbiol Lett 139(2-3),* 229-34.
- Quizhpe, A. Encalada, L. Socoto, A. Andrade, D. y Muñoz, G. (2014). *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana.* Edit. ReAct Latinoamérica. Cuenca-Ecuador.
- Pulido, I. Mantilla, J. Venezuela, E. Reguero, M. y Gonzalez, E. (2013). Distribución de genes codificadores de β-lactamasas de espectro extendido en aislamientos de Klebsiella pneumoniae de hospitales de Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica.* 31, 15-20

- Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana Ecuador. (2008). *Reporte de resistencias bacterianas para el año 2008.* Recuperado de www.rednarbec. Org.
- Rosen, D., Hooton, T., Stamm, W., Humphrey, P. y Hultgren, S. (2007). Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *Plos Medicine, 4(12).* E329. doi: 10.1371/0040329
- Ryan, K. y Ray, G. (2010). *Serris Microbiología Médica.* México: Editorial Mac Graw Hill.
- Sandra L. Gaitán C., Paula A. Espinal M. y Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana. (2009). *Caracterización molecular de Escherichia coliy Klebsiella*

pneumoniae productores de β-lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. Revista chilena de infectología. *26 (3),* 239-246

- Seral, C., Gude, M. y Castillo, J. (2012). Emergencia de betalactamasas AmpC plamídicas (AmpC o cefamicidasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev. Española de quimioterapia, 25(2),* 89-99.
- Shinagawa, K., Kanehira, M., Omoe, K., Matsuda, I., Widiasih, D., Sugii, S., (2000). Frequency of Shiga toxin-producing Escherichia coli in cattle at a breeding farm and at a slaughterhouse in Japan. *Vet. Microbiol*. *76*, 305-309.
- Solórzano, A. (2004). *Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio: Aportaciones científicas.* Tesis doctoral no publicada. Universidad de Granada, Puerto Granada.
- Song W, Kim JS, Kim HS, Yong D, Jeong SH, Park MJ, (2006). Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004.*Diagn Microbiol Infect*. 55: 219-24
- Suarez, J., Kattan, J., Guzmán, A. y Villegas, M. (2006). Mecanismos de resistencias cabapeném en *P. aeruginosa, Acinobacter y Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *CIDEIM, 10(2),* 85-93.
- Suarez, C. y Francesc, G. (2009). Enfermedades infeccionas y microbiológicas. *Elsevier Doyma. 27(2),* 116-129
- Torres, L. Gagliotta, V. Torres, O. Benitez, M. Dominguez, M. y Pedroza, R. (2006). β-Lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 26,* 80-88.
- Torres, L. Benítez, M. Domínguez, M. Torres, O. Gagliotta,V. Calvo, A. Rodríguez, N. Ardila, J, y Pedroza, R. (2005). Detección de integrones clase I en cepas de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro expandido tipo SHV y CTX-M grupo-2. *VITAE Academia Biomédica Digital, 25.*
- Torres, C. (2012*). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming*. Academia de Farmacia "Reino de Aragón. Zaragoza.
- Tafur, J. Torres, J. y Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *CIDEIM. 2(3),* 217-226.
- Vicente, M. (2011). Electroforesis: poniendo ADN y proteínas a correr. *BiotechSpain.*
- Vila, J., Marti, S. y Sanchez, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistence in Acinetobacter baumannii. *J. Antimicrob Chemother. 59(6),* 1210-1215. doi: 10.1093
- Walsh, T.R., Hall, L., MacGowan, A.P., and Bennett, P.M. . (1995). *Sequence analysis of two chromosomally mediated inducible beta-lactamases from Aeromonas sobria,*

strain 163a, one a class D penicillinase, the other an AmpC cephalosporinase. Journal Antimicrobial Chemotherapy. 36(1), 41-52.

- Xia, S. Fan, X. Huang, Z. Xia, L. Xiao, M. Chen, R. Xu, Y. y Zhuo, Ch. (2014). Dominance of CTX-M-Type Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli Isolated from Patients with Community-Onset and Hospital-Onset Infection in China. *PLoS ONE*, 9(7). doi:10.1371/journal.pone.0100707
- Yamannto T, Tanaka, M. Nohara, C Fukunaga, Y. Yaaagishi, S. (1981). Transposition of the oxacillinhydrolyzing penicillinase gene. *Journal Bacteriology,145,* 808-813.
- Yao, J. y Moellering, R. (1999). *Antibacterial Agents en Manual of Clinical Microbiology*. Patrick Murray y col. American Society for Microbiology.
- Yin, J. Liu, J. Hu, G. Pan, Y. Liu, Z. Mo, J. & Wei, Y. (2009). Molecular characterization of extended-spectrum b-lactamase-producing Escherichia coli isolates from chickens in Henan Province*,* China*. J Med Microbiol,* 58, 1449–1453.

ANEXOS

J Antimicrob Chemother 2010; 65: 490–495
doi:10.1093/jac/dkp498 Advance publication 12 January 2010

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in Enterobacteriaceae

Caroline Dallenne[1], Anaelle Da Costa[2], Dominique Decré[1,2], Christine Favier[3] and Guillaume Arlet[1,4]*

[1]Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Département de Bactériologie, Paris, France; [2]Assistance-Publique, Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service de Microbiologie, Paris, France; [3]Bio-Rad laboratories Inc., Marnes-la-Coquette, France; [4]Assistance-Publique, Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Service de Bactériologie, Paris, France

*Corresponding author. Service de Bactériologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75970 Paris cedex 20, France. Tel: +33-1-56-01-70-18; Fax: +33-1-56-01-61-08; E-mail: guillaume.arlet@tnn.aphp.fr

Received 17 August 2009; returned 29 September 2009; revised 29 November 2009; accepted 19 December 2009

Objectives: To develop a rapid and reliable tool to detect by multiplex PCR assays the most frequently widespread β-lactamase genes encoding the OXA-1-like broad-spectrum β-lactamases, extended-spectrum β-lactamases (ESBLs), plasmid-mediated AmpC β-lactamases and class A, B and D carbapenemases.

Methods: Following the design of a specific group of primers and optimization using control strains, a set of six multiplex PCRs and one simplex PCR was created. An evaluation of the set was performed using a collection of 31 Enterobacteriaceae strains isolated from clinical specimens showing a resistance phenotype towards broad-spectrum cephalosporins and/or cephamycins and/or carbapenems. Direct sequencing from PCR products was subsequently carried out to identify β-lactamase genes.

Results: Under optimized conditions, all positive controls confirmed the specificity of group-specific PCR primers. Except for the detection of carbapenemase genes, multiplex and simplex PCR assays were carried out using the same PCR conditions, allowing assays to be performed in a single run. Out of 31 isolates selected, 22 strains produced an ESBL, mostly CTX-M-15 but also CTX-M-1 and CTX-M-9, SHV-12, SHV-5, SHV-2, TEM-21, TEM-52 and a VEB-type ESBL, 6 strains produced a plasmid-mediated AmpC β-lactamase (five DHA-1 and one CMY-2) and 3 strains produced both an ESBL (two SHV-12, one CTX-M-15) and a plasmid-mediated AmpC β-lactamase (DHA-1).

Conclusions: We report here the development of a useful method composed of a set of six multiplex PCRs and one simplex PCR for the rapid screening of the most frequently encountered β-lactamases. This method allowed direct sequencing from the PCR products.

Keywords: OXA-1-like β-lactamases, ESBLs, plasmid-mediated AmpC β-lactamases, carbapenemases, molecular epidemiology

Introduction

Resistance to β-lactam antibiotics is an increasing problem and β-lactamase production is the most common mechanism of drug resistance, especially in Gram-negative bacilli. β-Lactamases are remarkably diversified due to their continuous mutation.

Among them, extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) are of great concern. ESBLs have been reported worldwide, most frequently in Enterobacteriaceae, but they have also been found in *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter baumannii*.[1,2] During the 1990s, TEM-type ESBLs and SHV-type ESBLs were dominant. During the past decade, rapid and massive spread of CTX-M-type ESBLs has been described. These enzymes are now the most prevalent ESBLs in Enterobacteriaceae in Europe and in other areas of the world.[3] Other ESBLs, less prevalent, have also been described as minor ESBLs; some of them, such as GES-type, PER-type and VEB-type β-lactamases, have now been isolated on several continents. Moreover, some GES variants also hydrolyse carbapenems.[4]

Although the plasmid-mediated AmpC β-lactamases are less common than ESBLs, they have been found in several areas of the world. Among them, the β-lactamase CMY-2 has the broadest geographical spread.[5]

Other β-lactamases conferring resistance to carbapenems, such as metallo-β-lactamases (MBLs) and KPC carbapenemases, but also some class D β-lactamases (e.g. OXA-48 in Enterobacteriaceae), have emerged more recently.[6,7]

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

J Antimicrob Chemother 2010; 65: 490–495
doi:10.1093/jac/dkp498 Advance publication 12 January 2010

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in Enterobacteriaceae

Caroline Dallenne[1], Anaelle Da Costa[2], Dominique Decré[1,2], Christine Favier[3] and Guillaume Arlet[4,1*]

[1]Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Département de Bactériologie, Paris, France; [2]Assistance-Publique, Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service de Microbiologie, Paris, France; [3]Bio-Rad laboratories Inc., Marnes-la-Coquette, France; [4]Assistance-Publique, Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Service de Bactériologie, Paris, France

*Corresponding author. Service de Bactériologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75970 Paris cedex 20, France. Tel: +33-1-56-01-70-18; Fax: +33-1-56-01-61-08; E-mail: guillaume.arlet@tnr.aphp.fr

Received 17 August 2009; returned 29 September 2009; revised 29 November 2009; accepted 19 December 2009

Objectives: To develop a rapid and reliable tool to detect by multiplex PCR assays the most frequently widespread β-lactamase genes encoding the OXA-1-like broad-spectrum β-lactamases, extended-spectrum β-lactamases (ESBLs), plasmid-mediated AmpC β-lactamases and class A, B and D carbapenemases.

Methods: Following the design of a specific group of primers and optimization using control strains, a set of six multiplex PCRs and one simplex PCR was created. An evaluation of the set was performed using a collection of 31 Enterobacteriaceae strains isolated from clinical specimens showing a resistance phenotype towards broad-spectrum cephalosporins and/or cephamycins and/or carbapenems. Direct sequencing from PCR products was subsequently carried out to identify β-lactamase genes.

Results: Under optimized conditions, all positive controls confirmed the specificity of group-specific PCR primers. Except for the detection of carbapenemase genes, multiplex and simplex PCR assays were carried out using the same PCR conditions, allowing assays to be performed in a single run. Out of 31 isolates selected, 22 strains produced an ESBL, mostly CTX-M-15 but also CTX-M-1 and CTX-M-9, SHV-12, SHV-5, SHV-2, TEM-21, TEM-52 and a VEB-type ESBL, 6 strains produced a plasmid-mediated AmpC β-lactamase (five DHA-1 and one CMY-2) and 3 strains produced both an ESBL (two SHV-12, one CTX-M-15) and a plasmid-mediated AmpC β-lactamase (DHA-1).

Conclusions: We report here the development of a useful method composed of a set of six multiplex PCRs and one simplex PCR for the rapid screening of the most frequently encountered β-lactamases. This method allowed direct sequencing from the PCR products.

Keywords: OXA-1-like β-lactamases, ESBLs, plasmid-mediated AmpC β-lactamases, carbapenemases, molecular epidemiology

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 26, 2014

Introduction

Resistance to β-lactam antibiotics is an increasing problem and β-lactamase production is the most common mechanism of drug resistance, especially in Gram-negative bacilli. β-Lactamases are remarkably diversified due to their continuous mutation.

Among them, extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) are of great concern. ESBLs have been reported worldwide, most frequently in Enterobacteriaceae, but they have also been found in *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter baumannii*.[1,2] During the 1990s, TEM-type ESBLs and SHV-type ESBLs were dominant. During the past decade, rapid and massive spread of CTX-M-type ESBLs has been described. These enzymes are now the most prevalent ESBLs in Enterobacteriaceae in Europe and in other areas of the world.[3] Other ESBLs, less prevalent, have also been described as minor ESBLs; some of them, such as GES-type, PER-type and VEB-type β-lactamases, have now been isolated on several continents. Moreover, some GES variants also hydrolyse carbapenems.[4]

Although the plasmid-mediated AmpC β-lactamases are less common than ESBLs, they have been found in several areas of the world. Among them, the β-lactamase CMY-2 has the broadest geographical spread.[5]

Other β-lactamases conferring resistance to carbapenems, such as metallo-β-lactamases (MBLs) and KPC carbapenemases, but also some class D β-lactamases (e.g. OXA-48 in Enterobacteriaceae), have emerged more recently.[6,7]

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

Table 1. Continued

PCR name	β-Lactamase(s) targeted	Primer name	Sequence (5′–3′)	Length (bases)	Annealing position[a]	Amplicon size (bp)	Primer concentration (pmol/μL)
Multiplex III ACC, FOX, MOX, DHA, CIT and EBC	ACC-1 and ACC-2	MultiCoreACC_for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	20	744–763	346	0.3
		MultiCoreACC_rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC	20	1089–1070		0.3
	FOX-1 to FOX-5	MultiCoreFOX_for	CTACAGTGCGGGTGGTTT	18	396–413	162	0.5
		MultiCoreFOX_rev	CTATTGCGGCCAGGTGA	18	557–540		0.5
	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11 and CMY-19	MultiCoreMOX_for	GCAACAAGACATCCATCCT	21	3–23	896	0.3
		MultiCoreMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	22	900–879		0.3
	DHA-1 and DHA-2	MultiCoreDHA_for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	21	113–133	997	0.5
		MultiCoreDHA_rev	GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	22	1109–1088		0.5
	LAT-1 to LAT-3, BIL-1, CMY-2 to CMY-7, CMY-12 to CMY-18 and CMY-21 to CMY-23	MultiCoreCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	20	570–589	518	0.3
		MultiCoreCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY[b]	20	1107–1088		0.3
	ACT-1 and MIR-1	MultiCoreEBC_for	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	19	189–207	683	0.3
		MultiCoreEBC_rev	AGCCTNACCCCTGATACA	18	871–854		0.3
Multiplex IV VEB, PER and GES	GES-1 to GES-9 and GES-11	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	19	463–481	399	0.3
		MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	18	861–844		0.3
	PER-1 and PER-2	MultiPER_for	GCTCCGATAATGAAAGCGT	19	325–343	520	0.3
		MultiPER_rev	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	19	844–826		0.3
	VEB-1 to VEB-6	MultiVEB_for	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	20	187–206	648	0.3
		MultiVEB_rev	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	20	834–815		0.3
Multiplex V GES and OXA-48-like	GES-1 to GES-9 and GES-11	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	19	463–481	399	0.4
		MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	18	861–844		0.4
	OXA-48-like	MultiOXA-48_for	GCTTGATCGCCCTCGATT	18	230–247	281	0.4
		MultiOXA-48_rev	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	20	490–510		0.4
Multiplex VI IMP, VIM and KPC	IMP variants except IMP-9, IMP-16, IMP-18, IMP-22 and IMP-25	MultiIMP_for	TTGACACTCCATTTACDG[c]	18	194–211	139	0.5
		MultiIMP_rev	GATVGAGAATTAAGCCACYCT[c]	21	332–313		0.5
	VIM variants including VIM-1 and VIM-2	MultiVIM_for[c]	GATGGTGTTTGGTCGCATA	19	151–169	390	0.5
		MultiVIM_rev[c]	CGAATGCGCAGCACCAG	17	540–524		0.5
	KPC-1 to KPC-5	MultiKPC_for	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC	22	209–230	538	0.3
		MultiKPC_rev	ACGACGGCATAGTCATTTGC	20	746–727		0.3

[a]Annealing position within the corresponding open reading frame (from the base A of start codon ATG).
[b]Y = T or C; R = A or G; S = G or C; D = A or G or T.
[c]This primer pair was previously described by Ellington et al.[18]

Downloaded from www.jacn.org/cgi/pdf/ by guest on September 26, 2014

for 1 h on a 2% agarose gel containing ethidium bromide. A 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used as a size marker.

Sequencing analysis of multiplex PCR products

To identify the β-lactamase genes detected in the multiplex PCR assays, DNA sequence analyses of the amplicons were performed. Amplified PCR products were purified using the ExoSap purification kit (ExoSap-It, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and bidirectional sequencing was performed. Each sequence was then compared with already known β-lactamase gene sequences by multiple-sequence alignment using the BLAST program.

Nucleotide sequence accession numbers

The GenBank nucleotide sequence accession numbers for the sequences studied in this study are detailed in Table S2 [available as Supplementary data at JAC Online (http://jac.oxfordjournals.org/)].

Results and discussion

Analysis of the set of multiplex PCRs and simplex PCR

After optimizing the amplification conditions for each assay, amplicons of the expected sizes were obtained from all control strains used separately or mixed (Table S1) confirming the group specificity of the primers (Figure 1). For example, every template of the SHV family resulted in a 713 bp amplicon (Figure 1a).

The evaluation of chromosomal cross-hybridization was then performed with probable interfering species according to the set studied. An amplicon was observed with the species *Kluyvera ascorbata* and *Kluyvera georgiana*, respectively, when specific primers of bla_{CTX-M} group 2 and groups 8/25 were used (Table S1). In the same way, amplicons of the ACC, EBC and DHA groups were observed, respectively, when the DNAs from *Hafnia alvei*, *Enterobacter asburiae* or *Morganella morganii* were used as template. No amplification product was observed from any other tested strains harbouring an AmpC gene, in contrast to the method of Pérez-Pérez and Hanson,[8] where an AmpC gene from *C. freundii* and *E. cloacae* was amplified.

Eventually, chromosomal class A genes from *K. pneumoniae* belonging to the phylogenetic group Kpi were amplified with the group-specific primers of the SHV family.

Evaluation of direct sequencing from PCR products

Direct sequencing from amplicons was shown to be possible. Most amplicons contained major substitutions allowing the identification of a high number of β-lactamases. To a lesser extent, the identification of clusters of β-lactamases (each cluster containing a unique well-known enzyme) can be performed by this technique.

In the bla_{TEM}/bla_{SHV}/bla_{OXA-1}-like multiplex PCR, OXA-1-like β-lactamases cannot be distinguished by direct sequencing. However, due to the method, most of the TEM-type ESBL variants can be differentiated. In the same way, discrimination between ESBLs and TEM-type broad-spectrum β-lactamases became feasible, such as the distinction between SHV ESBL derivatives and SHV broad-spectrum β-lactamase variants. Another example can be found with the bla_{CTX-M} multiplex PCR; the main β-lactamases belonging to phylogenetic group 1 can be discriminated. Thus, CTX-M-3 can be distinguished from CTX-M-1, and both can be differentiated from the CTX-M-15 β-lactamase. However, the common β-lactamases CTX-M-15 and CTX-M-28 cannot be separated.

For them and for other β-lactamases for whom direct sequencing is not sufficiently discriminating, further analysis may be necessary to identify the corresponding bla gene.

Evaluation of the six multiplex PCRs and the simplex PCR with clinical strains

In order to confirm the specificity of the set, simplex and multiplex PCR assays were performed on the 31 clinical strains selected according to their susceptibility profiles. All PCR products were submitted to direct sequencing.

ESBLs were detected in 22 isolates (71%), plasmid-mediated AmpC β-lactamases were observed in 6 isolates (19%) and 3 isolates (10%) produced both an ESBL and a plasmid-mediated AmpC β-lactamase. Isolates often carried two, occasionally three, different types of broad-spectrum β-lactamase (SHV-1, SHV-11, OXA-1 or TEM-1).

Major ESBL-producing isolates were CTX-M type, including 15 from phylogenetic group 1 (14 CTX-M-15 and 1 CTX-M-1) and 2 belonging to phylogenetic group 9 (CTX-M-9). TEM-type ESBLs (two TEM-21 and one TEM-52), SHV-type ESBLs (two SHV-12, one SHV-2 and one SHV-5) and one VEB-type ESBL were also detected. For the latter, no discrimination was possible by direct sequencing between the VEB-4, VEB-5 and VEB-6 β-lactamases.

DHA-1 enzymes were the most frequently observed plasmid-mediated AmpC β-lactamases (found in eight isolates); only one AmpC β-lactamase belonged to the CMY-2 group. Among the three isolates producing both an ESBL and a plasmid-mediated AmpC β-lactamase, two strains were found to co-produce DHA-1 and SHV-12, and the third strain was found to co-produce DHA-1 and CTX-M-15. None of the carbapenemase genes targeted was found in this study. Reduced susceptibility to imipenem found in one *K. pneumoniae* isolate was probably due to a decrease in permeability of the outer membrane. A complete description of the β-lactamases characterized in the 31 enterobacterial isolates is available in Table S3 [available as Supplementary data at JAC Online (http://jac.oxfordjournals.org/)].

Conclusions

In summary, we report here the development of six multiplex PCRs and one simplex PCR that are able to detect prevalent β-lactamases. This PCR method is a fast, low-cost and reliable tool for the screening of frequently encountered β-lactamases. It will assist in monitoring their emergence and their spread, and it could be used in epidemiological surveys. To conclude, our study showed the high prevalence of CTX-M-type ESBLs belonging to phylogenetic group 1 among our panel of ESBL-producing Enterobacteriaceae strains, and the absence of detection of carbapenemases.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 26, 2014

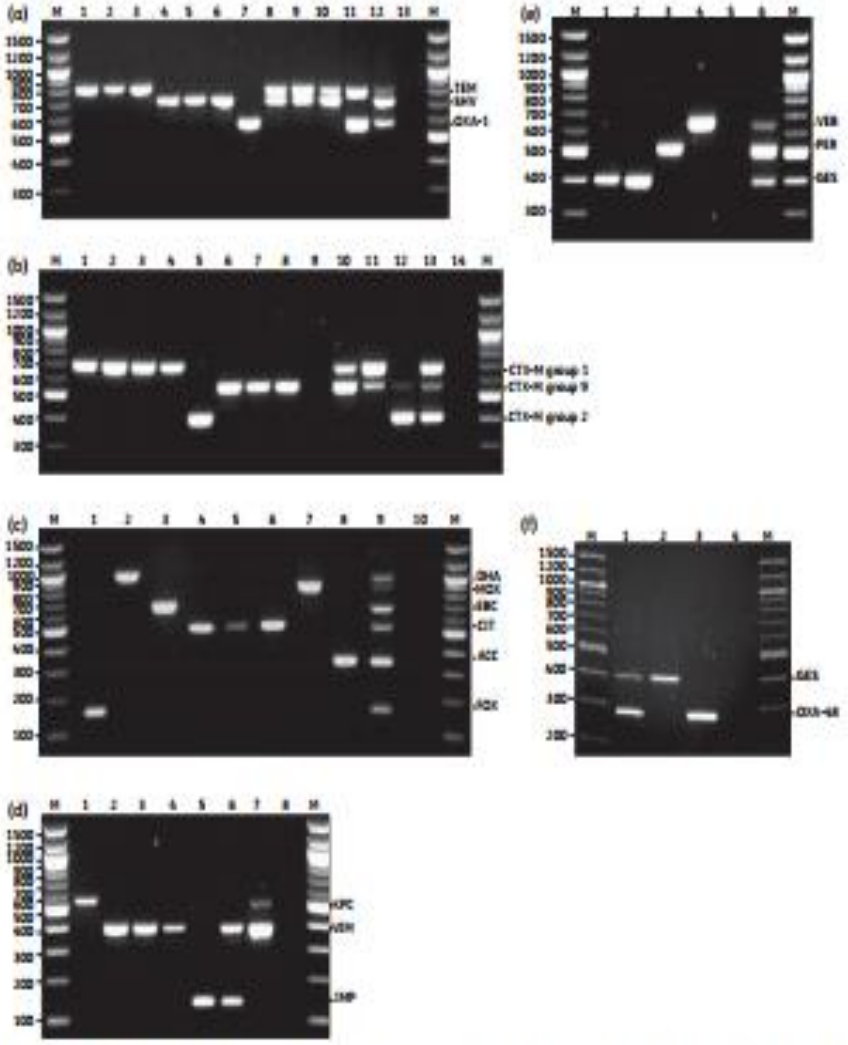

Figure 1. Multiplex PCR assays. (a) Multiplex PCR assay for the bla_{TEM}/bla_{SHV}/bla_{OXA}-like genes, amplification from control strains. Multiplex PCR products were separated in a 2% agarose gel. Lanes: 1, *E. coli* TN13; 2, *E. cloacae* 4861; 3, *K. oxytoca* 1376; 4, *K. pneumoniae* 169; 5, *K. pneumoniae* SLKM; 6, *K. pneumoniae* FLO; 7, *Salmonella* spp. RGN238; 8, *K. pneumoniae* SLK54; 9, *K. pneumoniae* BHR; 10, *K. pneumoniae* KOL; 11, *K. oxytoca* 1376+*Salmonella* spp. RGN238; 12, *K. pneumoniae* KOL+*Salmonella* spp. RGN238; 13, negative control; M, molecular size marker (in bp). (b) Multiplex PCR assay for the bla_{CTX-M} genes including phylogenetic group 1, group 2 and group 9, amplification from control strains. Multiplex PCR products were separated in a 2% agarose gel. Lanes: 1, *E. coli* TN16; 2, *E. coli* TN03; 3, *K. pneumoniae* BHR; 4, *K. pneumoniae* L7; 5, *E. coli* TN19; 6, *E. coli* TN13; 7, *E. coli* TN07; 8, *E. coli* TN05; 9, *K. pneumoniae* H610; 10, *E. coli* C7; 11, *E. coli* TN05+*E. coli* TN03; 12, *E. coli* TN05+*E. coli* TN19; 13, *E. coli* TN05+*E. coli* TN03+*E. coli* TN19; 14, negative control; M, molecular size marker (in bp). (c) Multiplex PCR assay for the plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes, amplification from control strains. Multiplex PCR products were separated in a 2% agarose gel. Lanes: 1, *K. pneumoniae* 1734; 2, *K. pneumoniae* 760; 3, *E. coli* C600 pMG231; 4, *E. coli* B5; 5, *K. pneumoniae* 169; 6, *P. mirabilis* 34955; 7, *K. pneumoniae* KOL; 8, *K. pneumoniae* SLK54; 9, *K. pneumoniae* SLK54+*K. pneumoniae* 1734+*K. pneumoniae* 760+*E. coli* C600 pMG231+*P. mirabilis* 34955+*K. pneumoniae* KOL; 10, negative control; M, molecular size marker (in bp). (d) Multiplex PCR assay for the bla_{VIM}/bla_{IMP}/bla_{KPC} genes, amplification from control strains. Multiplex PCR products were separated in a 2% agarose gel. Lanes: 1, *E. cloacae* 4861; 2, *K. pneumoniae* BHR; 3, *K. pneumoniae* FLO; 4, *P. aeruginosa* 73257; 5, *A. baumannii* 2318; 6, *K. pneumoniae* FLO+*A. baumannii* 2318; 7, *E. cloacae* 4861+*K. pneumoniae* FLO; 8, negative control; M, molecular size marker (in bp). (e) Multiplex PCR assay for the bla_{VEB}/bla_{GES}/bla_{PER} genes, amplification from control strains. Multiplex PCR products were separated in a 2% agarose gel. Lanes: 1, *K. pneumoniae* ORI-1; 2, *E. coli* 14R519(pHT9); 3, *Providencia stuartii* P45; 4, *E. coli* 394; 5, negative control; 6, *K. pneumoniae* ORI-1+*P. stuartii* P45+*E. coli* 394; M, molecular size marker (in bp). (f) Multiplex PCR assay for the bla_{GES}/bla_{OXA-48}-like genes, amplification from control strains. Multiplex PCR products were separated in a 2% agarose gel. Lanes: 1, *K. pneumoniae* ORI-1+*K. pneumoniae* 11978; 2, *K. pneumoniae* ORI-1; 3, *K. pneumoniae* 11978; 4, negative control; M, molecular size marker (in bp).

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 26, 2014

Acknowledgements

For very kindly providing some control strains used in the development of this work, we are grateful to E. Tzelepi, R. Bonnet, P. Nordmann and their teams as well as Bio-Rad Laboratories Inc. We are also grateful to Michelli Amalmi for technical assistance.

Funding

This work was supported by a subvention from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, France (convention industrielle de formation par la recherche no. 1058/2006) and by financial support from Bio-Rad Laboratories Inc.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1, S2 and S3 are available as Supplementary data at JAC Online (http://jac.oxfordjournals.org/).

References

1 Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933–51.

2 Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 657–86.

3 Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Euro Surveill 2008; 13: pii=19044.

4 Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14 Suppl 1: 42–52.

5 Jacoby GA. AmpC β-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 161–82.

6 Cuzon G, Naas T, Bogaerts P et al. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing β-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible Klebsiella pneumoniae strain from Belgium. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 3463–4.

7 Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S et al. Emergence of clonally related Klebsiella pneumoniae isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 654–8.

8 Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 2153–62.

9 Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β-lactamases. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 154–5.

10 Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 321–2.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org/ by guest on September 26, 2014