



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

"IDENTIFICACIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO
EXTENDIDO EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE DOS
HOSPITALES DEL ESTADO DE GUERRERO, MÉXICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

MARIO SALVADOR MUÑOZ CASTILLO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NATIVIDAD CASTRO ALARCÓN

Chilpancingo, Gro., diciembre de 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 2 días del mes de octubre de dos mil siete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Identificación de β -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de dos hospitales del estado de Guerrero**”, presentada por el alumno Mario Salvador Muñoz Castillo, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

M en C. Natividad Castro Atarcón
Dirección de tesis

M en C. Adolfo Román Román



Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas dependiente de la Universidad Autónoma de Guerrero, México.

Bajo la dirección de

Dra. Natividad Castro Alarcón

y la asesoría de

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Pável Sierra Martínez

M en C. Adolfo Román Román

Esta investigación se desarrolló en parte, con el financiamiento del PIFI: C/PIFI 2004-13-04

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Mario Salvador Muñoz Castillo, recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros del Comité Tutoral por sus valiosas aportaciones en la revisión de esta tesis:

Dra. Natividad Castro Alarcón

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Pável Sierra Martínez

M en C. Adolfo Román Román

A la QFB Amparo Calderón Navarro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital General de Acapulco, Guerrero y a la QBP Rosalba Noriega de la O del Laboratorio de Bacteriología del Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón” de Chilpancingo Guerrero, por haber proporcionado los aislamientos bacterianos utilizados en el estudio.

A los doctores Jesús Silva y Ulises Garza del CISEI (INSP), por proporcionar la cepa de *E. coli* portadora de la enzima CTX-M-15. A la QBP Etzel Carreón del Laboratorio de Investigación en Microbiología por su valiosa colaboración.

A mi esposa QBP Aida Barrios Casarrubias por sus valiosos comentarios en la elaboración del manuscrito de la tesis.

INDICE

1. Resumen	ii
2. Abstract	iii
3. Introducción	1
4. Material y Métodos	5
5. Resultados	9
6. Discusión y conclusiones	19
7. Referencias	25

RESUMEN

Introducción. Las enterobacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos y que son productoras de diferentes tipos de β-lactamasas de espectro extendido, constituyen un problema de salud pública en el mundo, sobre todo en las unidades de cuidado intensivo hospitalario. **Objetivo:** en este estudio se determinó la resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y así se detectó la producción y tipos de β-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias. **Metodología:** 111 aislamientos de enterobacterias de dos hospitales del Estado de Guerrero, México, se evaluaron en cuanto a susceptibilidad con 18 antimicrobianos y se realizó un tamiz para seleccionar cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido, con la reacción en cadena de la polimerasa y mediante secuenciación se identificaron tipos de β-lactamasas de espectro extendido. **Resultados:** se encontró un 68% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (57% multiresistentes) y 28% a la cefepima. El 56% de los aislamientos fueron productores de β-lactamasas de espectro extendido, de estos un 79% amplificaron genes *bla*_{TEM}, el 69% *bla*_{CTX-M}, y en 58% *bla*_{SHV}. En tres aislamientos de *E. cloacae* se identificaron los genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-5} y *bla*_{CTX-M-15}. **Conclusiones:** la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a múltiples antibióticos encontrada en los aislamientos de enterobacterias se asoció estrechamente con la producción de β-lactamasas de espectro extendido, y la detección de genes *bla* en conjunto con la identificación de *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-5} y *bla*_{CTX-M-15} en 3 cepas de *E. cloacae* del Hospital General de Acapulco, Guerrero, puede indicar que el principal mecanismo de resistencia fue la producción de β-lactamasas de espectro extendido.

Palabras clave: Enterobacteria, β-lactamasas de espectro extendido, resistencia a cefalosporinas.

ABSTRACT

Introduction: the resistant pathogenic enterobacteria to wide range of antibiotics and that these produce different types extended-spectrum β-lactamasas, constitute a public health problem in the world, over all in the hospital intensive care units. **Objective:** in this study, it was to determined the resistance to cephalosporins of third and fourth generations and thus to detect the production and types of extended-spectrum β-lactamasas in enterobacteria. **Methodology:** 111 isolations of enterobacteria from two hospitals from Guerrero State, Mexico, it was evaluated with respect to susceptibility to 18 antimicrobial agents and a screening was performed to select extended-spectrum β-lactamasas producing strains, with the polymerase chain reaction and through the sequencing, were used to identify extended-spectrum β-lactamasas types. **Results:** 68% of resistance to cephalosporins of third generation (57%resistant to multidrug) and 28% to cefepima were found. The 56% to isolations produced extended-spectrum β-lactamasas, of these a 79% amplified *bla*_{TEM}, 69% *bla*_{CTX-M}, and in 58% *bla*_{SHV} genes. From three *E. cloacae* isolations the *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-5} and *bla*_{CTX-M-15} genes were identified. **Conclusions:** the resistance to cephalosporins of third generations and to wide range of antibiotics found in the isolations were associated closely with the production of extended-spectrum β-lactamasas, and the detection of *bla* genes along with the identification of *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-5} and *bla*_{CTX-M-15} in three *E. cloacae* strains from General Hospital from Acapulco, Guerrero, can indicate that the main mechanism of resistance was the production of extended-spectrum β-lactamasas.

Key words: Enterobacteria, extended-spectrum β-lactamasas, resistance to cephalosporins.

INTRODUCCIÓN

Las enterobacterias responsables de infecciones en unidades de cuidados intensivos (UCI), productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), son patógenos resistentes a antibióticos β-lactámicos y en una alta proporción son resistentes a múltiples antimicrobianos, con frecuencia infectan a pacientes críticamente enfermos y se encuentran entre las principales causas del aumento de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados^{1, 24}; Asimismo, estos microorganismos están relacionados con las infecciones de las vías urinarias (IVUs), infecciones sanguíneas y neumonías²¹, como es el caso de *Escherichia coli* que es común en las IVUs, mientras que *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp son las causas frecuentes de neumonía²².

En México se reportó una prevalencia de 9.8% de infecciones nosocomiales en niños y *K. pneumoniae* fue el microorganismo aislado de hemocultivo²⁸. A pesar de que existen sistemas de vigilancia epidemiológica en hospitales de salud pública mexicanos a nivel estatal y nacional, en el Estado de Guerrero hace falta estudiar mecanismos de resistencia como la producción de BLEEs en las enterobacterias nosocomiales. El conocimiento de mecanismos de resistencia bacteriana evita la prescripción de antibióticos inapropiados y la selección o inducción de resistencia, también alerta el uso de antibióticos que en el laboratorio se detectan como sensibles y fallan en la práctica médica, además ayuda a reconocer antibiogramas inusuales que pueden presentar nuevas enzimas o nuevos mecanismos de resistencia¹⁹.

La emergencia y diseminación de la resistencia en las enterobacterias complica los tratamientos de las infecciones nosocomiales y constituye una amenaza porque se originan especies resistentes a todos los antibióticos disponibles²²; el hecho de que la resistencia a β-lactámicos cefalosporínicos de espectro extendido, esté codificada en genes plasmídicos transferibles constituye un problema, ya que aumenta la

dispersión de estos genes, lo cual se potencia por su presencia en transposones e integrones¹¹. Daikos y col (2007)⁶ detectaron una mayor prevalencia de integrones entre enterobacterias causantes de infecciones sanguíneas intrahospitalarias como factor de riesgo para la diseminación de la resistencia.

Los microorganismos Gram negativos como las enterobacterias tienen como principal mecanismo de resistencia la producción de enzimas β-lactamasas para contrarrestar la acción de los antibióticos β-lactámicos, de las cuales, las BLEEs hidrolizan las cefalosporinas de primera a tercera generación y al aztreonam^{11, 22}; sin embargo, también se ha observado la presencia de carbapenemasas en combinación con una disminución de permeabilidad de la membrana externa por la pérdida de porinas³⁵.

Las β-lactamasas hidrolizan el anillo β-lactámico del antimicrobiano originando el derivado ácido inactivo²¹. A las primeras β-lactamasas aisladas se les denominó β-lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1), a partir de las cuales y por una sustitución de 1 a 4 aminoácidos derivan las β-lactamasas de espectro extendido, por haber ampliado su espectro de acción sobre los antibióticos β-lactámicos de última generación. También pertenecen a este grupo las enzimas tipo CTX-M diferentes de TEM y SHV, son característicamente más activas a cefotaxima que a ceftazidima, se conocen más de 40 tipos²¹. Diversas β-lactamasas tipo TEM se han caracterizado en especies de enterobacterias de varios países^{1, 23, 29, 30, 37}. Las BLEEs más comunes son las enzimas CTX-M, de éstas la CTX-M-2, CTX-M-3 y CTX-M-14 se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo¹¹.

El estudio de las enterobacterias productoras BLEEs es importante porque algunas aparentan susceptibilidad a las cefalosporinas de última generación al usar puntos de corte convencionales. El Instituto para Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)^{4, 39}, ha recomendado métodos para la detección de BLEEs como las de tamizaje por

difusión con discos de los antibióticos cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam cefotaxima o ceftriaxona y la susceptibilidad por dilución del antimicrobiano; así también para confirmar los fenotipos de producción de BLEEs con discos de cefotaxima o ceftazidima con o sin clavulanato (30/10 µg) y la microdilución en caldo con ceftazidima (0.25 a 128 µg/ml), cefotaxima (0.25 a 64 µg/ml) ambos con o sin ácido clavulánico (4 µg/ml). Otros métodos usados son por ejemplo, la prueba Etest, la sinergia de difusión en doble disco y las tarjetas Vitek y Microscan. La PCR es de uso común para la detección de BLEEs y la secuenciación es el estándar de oro para su identificación, muchos investigadores usan la electroforesis en gel de campos pulsados que es la técnica más usada de genotipificación del DNA cromosómico, para establecer las relaciones clonales de organismos productores de BLEEs de infecciones nosocomiales²¹.

Se han reportado porcentajes variados de enterobacterias productoras de BLEEs desde diferentes regiones geográficas como los reportados por Jacoby y Muñoz-Price (2005)¹¹, donde señalan que en un estudio de más de 4700 aislamientos de *K. pneumoniae*, América Latina presentó el 45.4% de aislamientos con BLEEs, el Pacífico Occidental 24.6%, Europa el 22.6%, Estados Unidos y Canadá 3.3% y 4.2%, respectivamente. Otros investigadores como Edelstein y col (2003)⁴, encontraron una frecuencia fenotípica de BLEEs en 15.8% de aislamientos de *E. coli* y 60.8% en *K. pneumoniae*, los genes detectados fueron bla_{CTX-M} en 35.9% *E. coli* y 34.9% *K. pneumoniae*, la susceptibilidad a amoxicilina-clavulanato fue de 14.1% en *E. coli* y 19% en *K. pneumoniae*, la resistencia a gentamicina fue de 80.8% en *E. coli* y 85.1% en *K. pneumoniae*, así también la sensibilidad a amikacina fue de 89.7% en *E. coli* y 85.1% en *K. pneumoniae* y a ciprofloxacina fue de 39.7% en *E. coli* y 21.8% en *K. pneumoniae*. Manchanda y col (2005)¹⁶, encontraron que todos los aislamientos estudiados fueron susceptibles a imipenem y presentaron multiresistencia en un 94%, de las cuales el 59% fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación (3GC) y al aztreonam. Ndugulile y col (2005)²⁰, encontraron en

una unidad de cuidados intensivos 11 (28%) aislamientos productores de BLEEs e identificaron los genes que codifican las enzimas SHV-12, SHV-28 y CTX-M-15 a partir de 39 aislamientos de bacterias Gram negativas de pacientes sospechosos de infección nosocomial. En México, Silva y col (2000)³³, identificaron la enzima TLA-1 de un aislamiento de *E. coli* a partir de IVUs de un paciente en un hospital de la ciudad de México; en el 2001³⁴ el mismo autor caracterizó la enzima SHV-5 en un brote de *K. pneumoniae* del hospital general de Cuernavaca, México; en el año 2004¹⁸ publicó el hallazgo de la misma enzima (SHV-5) de *K. pneumoniae* en una unidad de cuidados intensivos del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

En este estudio se determinó la frecuencia de la producción de BLEEs en aislamientos de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, utilizando diversas pruebas como las de tamizaje por difusión en disco, dilución de antibióticos y confirmatorias de fenotipos de BLEEs recomendadas por el CLSI; así como también se detectaron los tipos de BLEEs con la técnica de isoelectroenfoque y PCR, los genes *bla* se identificaron por secuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos. Se incluyeron en este estudio 111 aislamientos clínicos de enterobacterias colectados durante el periodo 2004 a 2006, provenientes de infecciones nosocomiales de dos hospitales de la Secretaría de Salud del Estado de Guerrero, México: el Hospital General de Acapulco Guerrero y el Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón” de Chilpancingo, Guerrero. La identificación inicial se hizo en el hospital y la confirmación se realizó en el laboratorio de investigación en Microbiología de la Universidad Autónoma de Guerrero con el sistema API 20E. Todas las cepas fueron congeladas en glicerol al 30% a -70 °C, para su estudio posterior.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Se utilizó el método estándar de difusión en disco, recomendado por el Instituto para Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)^{4, 5}. Se incluyeron 18 antibióticos Oxoid (Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Ants, RG24 8PW, UK) los cuales fueron ampicilina (AMP), amoxicilina-clavulanato (AMC), cefalotina (KF), cefuroxima (CXM), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepima (FEP), cefoxitina (FOX), cefpodoxima (CPD), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AK), gentamicina (CN), ciprofloxacina (CIP), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), cloranfenicol (C) y tetraciclina (TE). Para realizar esta técnica, se preparó una suspensión bacteriana utilizando el estándar de 0.5 de McFarland con el nefelómetro BD CristalSpec. La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó por la técnica de dilución en placa, utilizando concentraciones crecientes (0.031 a 256 µg/ml) de los antibióticos CAZ y CTX. Se inocularon con 1 a 3 µl de las suspensiones bacterianas estandarizadas con ayuda del replicador de Steers. Para evaluar la susceptibilidad se utilizaron los valores de corte establecidos por el CLSI⁵. En el control de calidad se emplearon las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Detección de aislamientos productores de BLEEs. Se realizó un tamiz a partir de las pruebas de sensibilidad con los discos de CTX, CAZ, CPD y ATM; se clasificaron como potenciales productores de BLEEs a aquellos aislamientos que presentaron resistencia cuando menos al disco de CTX, CAZ o CPD, con base en los criterios del CLSI. Para detectar aislamientos con fenotipos confirmatorios de producción de BLEE, se empleó la prueba sinérgica estándar de doble disco (DDST), modificada por Tzelepi y col (2000)³⁶, para tal efecto se emplearon los discos de CAZ, CTX y FEP (para detectar BLEEs en *E. cloacae* productor de AmpC, por su sensibilidad a este antibiótico) a una distancia de 20 mm centro a centro de un disco de AMC que contenía 20/10 µg de amoxicilina/clavulanato y la prueba se interpretó como positiva si el halo de inhibición en el cultivo bacteriano en agar de Muller-Hinton, sufría una distorsión o ensanchamiento hacia el disco de AMC⁶. También se utilizó la prueba de doble disco combinado (DDCT), con los discos de CTX y CAZ solos y combinados con clavulanato de potasio, recomendado por el CLSI para las enterobacterias *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli* y *Proteus mirabilis*, por lo que a esta prueba se le adicionó el disco de FEP para determinar la producción de BLEE en las cepas de *E. cloacae*¹⁶. Los aislamientos que presentaron un incremento ≥ 5 mm en el diámetro del halo de inhibición en al menos en uno de los discos impregnados con clavulanato, se consideraron productores de BLEE. Para ambas pruebas se emplearon las cepas control de *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Determinación del punto isoelectrico de las β-lactamasas. Se obtuvieron extractos crudos de β-lactamasas a partir de cultivos bacterianos por ruptura mecánica, y se analizaron por isoelectroenfoque (IEF) utilizando geles de poli(acrilamida) PhastGel IEF con rangos de pH 3 a 9, en un equipo PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las β-lactamasas se detectaron por la presencia de bandas de color rojo intenso debido a la hidrólisis enzimática de la nitrocefina. Los valores de los puntos isoelectricos (pI) de las β-lactamasas, se determinaron de acuerdo con el método descrito por Matthew y col¹⁷, usando controles de β-

lactamasas con punto isoeléctrico conocido (TEM-1 con pI de 5.4, SHV3 con pI de 7, SHV2 con pI de 7.6, SHV4 con pI de 7.8, SHV5 con pI de 8.2 y CTX-M con pI >8.2). Las bandas con pI de 5.4 a 6.5 se consideraron como BLEE de tipo TEM, las de pI de 7 a 8.2 de tipo SHV y las de 7.6 a >8.2 de tipo CTX-M³².

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El DNA molde se obtuvo por choque térmico. La concentración del DNA se determinó en un biofotómetro eppendorf a partir de una dilución 1:100 y se ajustaron las concentraciones entre 100 y 125 ng/μl. De igual manera se obtuvo el DNA de los controles positivos *E. coli* (TEM-1), *E. coli* (SHV-5) y *E. coli* (CTX-M-15). Las PCR para amplificar los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHAV} y *bla*_{CTX-M}, se llevaron a cabo en un volumen de 50 μl y la composición de las mezclas de reacción fueron buffer 1X, dNTPs 0.15 mM, iniciadores 0.4 μM, Taq DNA polimerasa 1.25 U (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil) y 200 ng de DNA molde. La concentración de MgCl₂ fue 1, 0.6 y 1.25 mM respectivamente y las reacciones se desarrollaron en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster, USA). Los iniciadores específicos para *bla*_{TEM} fueron (diseñados en este estudio) TEM-F 5'-GTTTTTGCTCACCCAGAAACG y TEM-R 5'-AATGATACCGCGAGACCCACGCTC, para *bla*_{SHV}⁸ SHV-1 5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG y SHV-2 5'-GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG y para *bla*_{CTX-M}⁷ CTX-M/F 5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA y CTX-M/R 5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA. Las condiciones de reacción fueron para *bla*_{TEM}, disociación inicial del DNA a 94 °C por 5 minutos y 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, alineación a 58 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto; para *bla*_{SHV}, 94 °C por 7 minutos y 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, alineación a 48 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto y para *bla*_{CTX-M}, 94 °C por 5 minutos y 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, alineación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto. Se dio una extensión final a 72 °C por 10 minutos y la reacción se detuvo a 4 °C. La separación de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 83 V, las bandas de los fragmentos teñidos con bromuro

de etidio se visualizaron en un transluminador de luz ultravioleta y se fotodocumentaron con una cámara EasyShare DX 6490, Kodak. Se comparó el tamaño en pb del fragmento de DNA amplificado utilizando el marcador ΦX174 RF DNA/HaeIII.

Secuenciación de los productos de la PCR. Para identificar el tipo de BLEE, se seleccionaron los productos de PCR de los aislamientos de *E. cloacae* 122, 516 y 1018 que tuvieron un pl de 5.4, >8.2 y 8.2 y amplificaron los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} *bla*_{SHV} respectivamente. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit PureLink (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil) siguiendo el procedimiento especificado por el fabricante. La secuencia de bases se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM, siguiendo un método automático con el equipo ABI Prism 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystem, Foster City, California, EUA. Las secuencias obtenidas se analizaron con el Software Chromaspro y Clustalw, utilizando secuencias de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} reportados en la base de datos del GenBank.

Análisis estadístico. Para el análisis de los resultados se usaron los programas estadísticos para windows SPSS 13.0 y STATA 9.0. Se determinaron las frecuencias de aislamientos resistentes a los antibióticos empleados, de los productores de BLEEs, de los resistentes a 3GC y a cefalosporinas de cuarta generación (4GC), de la amplificación de los genes *bla* y por medio de la prueba de chi cuadrada se estableció la relación entre las frecuencias de resistencia a 3GC y a 4GC con la frecuencia de la producción de BLEEs y con la frecuencia de la amplificación de los genes de resistencia *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} detectados.

RESULTADOS

Susceptibilidad antimicrobiana. La resistencia de los aislamientos a las 3GC fue para CTX 44%, CAZ 54% y CPD 68%; para FEP (4GC) 28%, para el ATM fue de 59%. Los aislamientos de *E. coli* mostraron una mayor resistencia a CTX que a CAZ y también tuvieron una mayor resistencia a la cefepima (52%); por el contrario, los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* presentaron una resistencia mayor a CAZ que a CTX. Los aislamientos de *E. cloacae* fueron los de mayor resistencia al disco de FOX (75%), solo dos aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a este disco. Todos los aislamientos fueron sensibles al meropenem, pero el 27% resultaron resistentes al imipenem, de los cuales 11 aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a este antibiótico (tabla 1)

TABLA 1. Frecuencia de resistencia a antibióticos β-lactámicos en las enterobacterias

ANTIBIOTICOS	ESPECIES				TOTAL
	<i>E. coli</i> N = 31 (%)	<i>K. Pneumoniae</i> N = 18 (%)	<i>E. cloacae</i> N = 52 (%)	*Otras N = 10 (%)	111 (%)
AMP	30(97)	18(100)	45(87)	8(80)	101(91)
AMC	21(68)	7(39)	38(73)	8(80)	74(67)
KF	25(81)	10(56)	49(94)	8(80)	92(83)
CXM	20(65)	8(44)	33(63)	7(70)	68(61)
CTX	17(55)	6(33)	22(42)	4(40)	49(44)
CAZ	13(42)	9(50)	31(60)	7(70)	60(54)
CPD	20(65)	10(56)	37(71)	9(90)	76(68)
FEP	16(52)	3(17)	11(21)	1(10)	31(28)
FOX	2(6)	0(0)	39(75)	6(60)	47(42)
ATM	16(52)	9(50)	33(63)	7(70)	65(59)
MEM	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
IPM	11(35)	1(6)	13(25)	5(50)	30(27)

AMP ampicilina, AMC amoxicilina-clavulanato, KF Cefalotina, CXM Cefuroxima, CTX cefotaxima, CAZ ceftazidima, CPD cefpodoxima, FEP cefepima, FOX cefoxitina, ATM aztreonam, MEM meropenem e IPM imipenem.

* Se incluyen las cepas: 1 *Klebsiella oxytoca*, 5 *Enterobacter sakazakii*, 2 *Proteus mirabilis*, 1 *Morganella morganii* y 1 *Serratia marcescens*

El 57% (43/76) de los aislamientos resistentes a 3GC presentaron multiresistencia, incluyéndose resistencia combinada con antimicrobianos no β-lactámicos, como es el caso de los 54 (49%) aislamientos resistentes al aminoglucósido CN, 38 (34%) resistentes a la fluoroquinolona CIP y en diversa proporción para los otros antibióticos. Los aislamientos de *E. coli* fueron más sensibles a AK y C mientras que los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* fueron más sensibles a CIP (**tabla 2**)

TABLA 2. Frecuencia de resistencia a antibióticos no β-lactámicos en enterobacterias

	ESPECIES				TOTAL
	<i>E. coli</i>	<i>K. Pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	Otras	
	N = 31	N = 18	N =52	N =10	111
ANTIBIOTICOS	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
AK	3(10)	7(39)	21(40)	6(60)	37(33)
CN	13(42)	8(44)	26(50)	7(70)	54(49)
CIP	22(71)	5(28)	8(16)	3(80)	38(34)
SXT	27(87)	9(50)	24(46)	7(70)	67(60)
C	7(23)	8(44)	23(44)	5(50)	43(39)
TE	27(87)	7(39)	18(35)	6(60)	58(52)

AK amikacina, CN gentamicina, CIP ciprofloxacina, SXT sulfametoxazol-trimetoprima, C cloranfenicol y TE tetraciclina.

* Se incluyen las cepas: 1 *K. oxytoca*, 5 *E. sakazakii*, 2 *P. mirabilis*, 1 *M. morgani* y 1 *S. marcescens*.

La frecuencia de enterobacterias resistentes a 3GC y al ATM fue alta en los dos hospitales, encontrando en el hospital general de Acapulco Guerrero un 68% (61/90) de resistencia y en el hospital General de Chilpancingo, Guerrero un 71% (15/21), (**tabla 3**)

TABLA 3. Frecuencia de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación en los dos hospitales

Especies	TOTAL	Hospital General Acapulco		Hospital General Chilpancingo	
		Cepas N	Resistentes (%)	Cepas N	Resistentes (%)
<i>E. coli</i>	31	18	10 (55)	13	10 (78)
<i>K. pneumoniae</i>	18	14	8 (57)	4	2 (50)
<i>E. cloacae</i>	52	51	36 (71)	1	1 (100)
*Otras	10	7	7 (100)	3	2 (67)
Total	111	90	61 (68)	21	15 (71)

* Se incluyen las cepas: 1 *K. oxytoca*, 5 *E. sakazakii*, 2 *P. mirabilis*, 1 *M. morgani* y 1 *S. marcescens*.

La resistencia obtenida por el valor de la MIC de CTX y CAZ, para los aislamientos de *E. coli* fue idéntica al resultado de la difusión en disco, 55 y 42% (17/31 y 13/31) respectivamente, pero en los aislamientos de *K. pneumoniae* y de *E. cloacae* hubo diferencias, la resistencia detectada por la MIC de CTX fue de 47 y 52 % y con CAZ de 35% y 54% respectivamente; en contraste, la resistencia obtenida por difusión en disco con las mismas cepas para CTX fue de 33% y 42%, y con CAZ fue de 50 y 60% respectivamente. Con la MIC se detectó una resistencia de 51% a CTX y 47% a CAZ en comparación con el método de sensibilidad en disco que detectó 44 y 54% respectivamente. En *E. coli* y *K. pneumoniae* los rangos de la MIC de CTX fueron mayores que los de CAZ, en *E. cloacae* no hubo diferencias. Los aislamientos de *E. coli* presentaron una elevada MIC₅₀ de CTX (128 µg/ml) y *E. cloacae* presentó una MIC₅₀ de CAZ más elevada (**tabla 4**)

TABLA 4. Concentración Inhibitoria Mínima a cefotaxima y ceftazidima en enterobacterias

Especies	TOTAL	Rango de MIC µg/ml		Resistencia (%)		MIC ₅₀ µg/ml		MIC ₉₀ µg/ml	
		CTX	CAZ	CTX	CAZ	CTX	CAZ	CTX	CAZ
<i>E. coli</i>	18	0.031->256	0.125-64	17 (55)	13 (42)	128	8	>256	32
<i>K. pneumoniae</i>	31	0.062->256	0.031-256	8 (47)	6 (35)	16	8	256	128
<i>E. cloacae</i>	52	0.031->256	0.031->256	26 (52)	27 (54)	64	32	>256	>256
*Otras	10	0.031->256	0.031->256	5 (50)	6 (60)	16	64	>256	>256
Total	111			56 (51)	52 (47)				

* MIC₅₀ y MIC₉₀, indica la MIC a la cual el 50% y 90 % de los aislamientos son inhibidos por CTX o CAZ.

* Se incluyen las cepas: 1 *K. oxytoca*, 5 *E. sakazakii*, 2 *P. mirabilis*, 1 *M. morgani* y 1 *S. marcescens*.

Aislamientos Productores de β-lactamasas de espectro extendido. Los aislamientos productores de BLEEs detectados con la prueba de difusión de doble disco combinado (DDCT) fueron un 44% y con la prueba de sinergia de doble disco (DDST) un 55%. La DDST detectó un mayor número de aislamientos BLEE positivos y se obtuvo con las dos pruebas un 56% de aislamientos con BLEEs (**tabla 5**)

TABLA 5. Enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido

Especies	TOTAL	No. Cepas	%
<i>E. coli</i>	31	19	61
<i>K. pneumoniae</i>	18	10	56
<i>E. cloacae</i>	52	27	52
*Otras	10	6	60
TOTAL	111	62	56

* Se incluyen las cepas: 1 *K. oxytoca*, 5 *E. sakazakii*, 2 *P. mirabilis*, 1 *M. morgani* y 1 *S. marcescens*.

Caracterización de las β-lactamasas. Por medio de la PCR se identificaron los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}. La figura 1 muestra el electroferograma de los productos de PCR de 544 pb para la identificación del gen *bla*_{CTX-M} en los

aislamientos de *E. coli* 513, 109 y 508, se utilizó como control positivo una cepa de *E. coli* productora de CTX-M-15 y como control negativo agua, las bandas correspondientes se identificaron como *bla*_{CTX-M} al comparar su posición con la banda de 603 pb del marcador ΦX174 RF DNA/HaeIII. De igual forma la figura 2 muestra la identificación del gen *bla*_{SHV} en los aislamientos de *K. pneumoniae* 519 y 647B 1208 y *E. cloacae* 597 a partir de productos de PCR de 862 pb y la figura 3 muestra la identificación del gen *bla*_{TEM} de los aislamientos de *E. cloacae* 118, 524 824, 513 707, 579, 572 y de *E coli* 3254 a partir del productos de PCR de 672 pb.

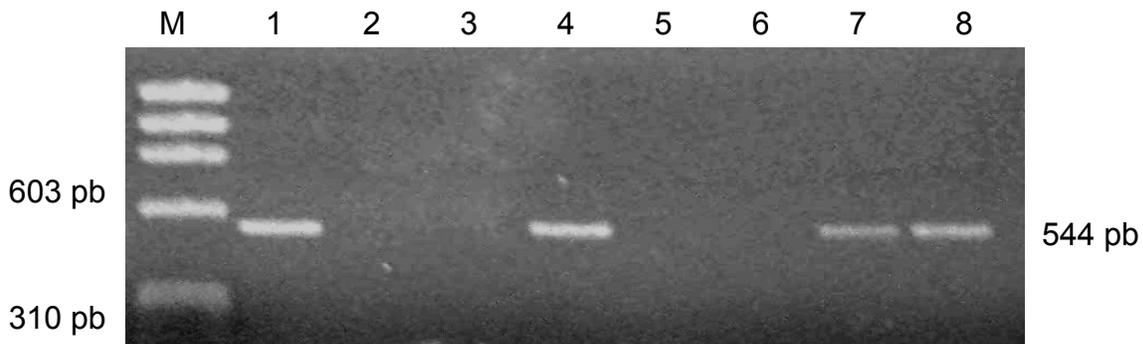


Figura 1. Electroferograma del gen *bla*_{CTX-M}. M, marcador ΦX174 RF DNA/HaeIII; carriles 1, control positivo *E. coli* productora de CTX-M-15; 2, control negativo agua; 4, 7 y 8 aislamientos de *E. coli* 513, 109, 508 *bla*_{CTX-M} positivos y 3, 5 y 6 negativos a *bla*_{CTX-M}.

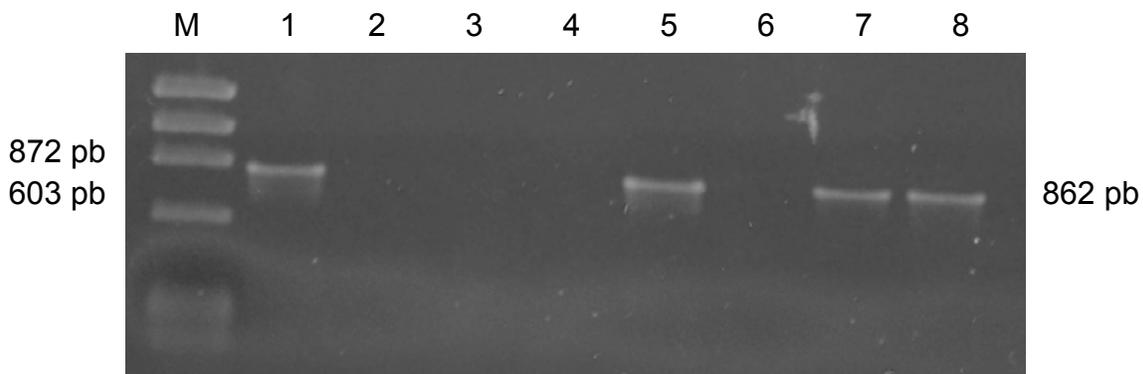


Figura 2. Electroferograma del gen *bla*_{SHV}. M, marcador ΦX174 RF DNA/HaeIII; carriles 1, control positivo *E. coli* 058; 2, control negativo agua; 5, 8 *K. pneumoniae* 519, 647B 1208 *bla*_{SHV} positivos; 8, *E. cloacae* 597 *bla*_{SHV} positivo y 2, 3, 4, 6 negativos *bla*_{SHV}.

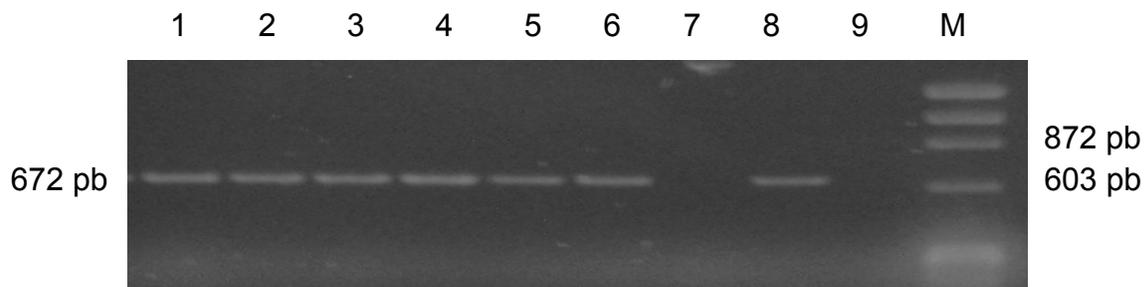


Figura 3. Electroferograma del gen bla_{TEM} . M, marcador $\Phi X174$ RF DNA/HaeIII; carriles 1, 3, 4, 5, 8 *E. cloacae* 118, 524 824, 513 707, 579, 122 bla_{TEM} positivos respectivamente; 2, *E. coli* 3254 bla_{TEM} positivo; 7, negativo a bla_{TEM} ; 8, control positivo *E. coli* 017 y 9, control negativo agua.

Los pl de las BLEEs de los aislamientos de *E. coli* presentaron diversos perfiles, once de ellos con un perfil de pl de 5.4, 7 y >8.2, de los cuales en diez se amplificaron los genes bla_{TEM} y bla_{CTX-M} y en un aislamiento se amplificó bla_{TEM} , bla_{CTX-M} y bla_{SHV} ; tres aislamientos con pl de 5.4, 6.5, 7, y >8.2 amplificaron bla_{TEM} y bla_{CTX-M} ; otros tres aislamientos con pl de 7 y >8.2, amplificaron bla_{CTX-M} y dos más con pl de 5.4 y >8.2 de los cuales uno amplificó bla_{TEM} y bla_{CTX-M} y el otro bla_{CTX-M} . En estos aislamientos se detectaron las enzimas CTX-M, la TEM en 15 aislamientos y la SHV en solo un aislamiento, (**tabla 6**)

TABLA 6. Caracterización de genes *bla* y *pl* de β-lactamasas en enterobacterias

Especies		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>pl</i>
10	<i>E. coli</i>	+	+	-	5.4, 7, >8.2
1	<i>E. coli</i>	+	+	+	5.4, 7, >8.2
3	<i>E. coli</i>	+	+	-	5.4, 6.5, 7, >8.2
3	<i>E. coli</i>	-	+	-	7, >8.2
1	<i>E. coli</i>	+	+	-	5.4, >8.2
1	<i>E. coli</i>	-	+	-	5.4, >8.2
2	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	5.4, 7.6, 8.2, >8.2
1	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	7, 7.6, >8.2
1	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	7.6
1	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	>8.2
1	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	5.4, 8.2
1	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	5.4, 7, 8.2
1	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	5.4, 7.6, >8.2
1	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	5.4, 7.6
1	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	5.4, 8.2, >8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	-	5.4, 8.2, >8.2
3	<i>E. cloacae</i>	+	+	+	5.4, 8.2, >8.2
5	<i>E. cloacae</i>	+	+	-	5.4, 8.2, >8.2
4	<i>E. cloacae</i>	+	-	+	5.4, 8.2, >8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	-	5.4, 8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	+	5.4, 8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	+	-	5.4, 8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	+	5.4, 7.6, 7.8, 8.2
1	<i>E. cloacae</i>	-	+	-	7.6, >8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	+	-	5.4, 7.6, >8.2
1	<i>E. cloacae</i>	-	-	+	8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	-	6.5
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	+	5.4, 7.8
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	+	5.4, 7, 7.6, 7.8
1	<i>E. cloacae</i>	+	+	+	5.4, 7, >8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	+	5.4, >8.2
1	<i>E. cloacae</i>	+	-	-	Nitro -
1	<i>E. cloacae</i>	-	-	-	Nitro -
1	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	Nitro -
1	<i>E. sakazakii</i>	+	-	-	5.4, 8.2, >8.2
1	<i>E. sakazakii</i>	+	-	-	6.4
1	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	5.4, 8.2
1	<i>E. sakazakii</i>	+	-	+	5.4, >8.2
1	<i>Serratia marcescens</i>	+	-	-	5.4, 8.2, >8.2

Las bandas observadas en el límite del gel, se consideraron *pl* >8.2. Nitro -, nitrocefina negativa con *pl* negativo.

Los aislamientos de *K. pneumoniae* presentaron perfiles de pl aun más diversos, solo dos tuvieron un perfil de 5.4, 7.6, 8.2 y >8.2 que amplificaron los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV}. Todos amplificaron *bla*_{SHV}, 6 amplificaron *bla*_{CTX-M} y 4 *bla*_{TEM}. En trece aislamientos de *E. cloacae* se encontró un perfil de pl de 5.4, 8.2 y >8.2, de los cuales uno amplificó *bla*_{TEM}, tres amplificaron *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV}, cuatro amplificaron *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y cinco *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}, los aislamientos restantes presentaron perfiles de pl variables. Las BLEEs detectadas fueron la TEM, seguida de CTX-M y SHV, (**tabla 6**)

En los aislamientos resistentes a 3GC se detectó el 95 % de BLEEs y de 93 a 95 % de genes *bla*. La PCR detectó en 74 % (46/62) de los aislamientos con BLEEs al gen *bla*_{TEM}, en 40 % (25/62) al gen *bla*_{SHV} y en 61 % (38/62) al gen *bla*_{CTX-M}. También se encontró que la frecuencia de resistencia a 3GC y a 4GC se asoció directamente con la producción de BLEEs, tal como se esperaba en los aislamientos BLEE positivos de los dos hospitales. Esta estrecha relación se confirmó con la amplificación de los genes de resistencia detectados en casi todos los aislamientos BLEE positivos y en el caso de la resistencia a FEP (4GC), esta no se asoció con la amplificación del gen *bla*_{SHV}, (**tabla 7**)

TABLA 7. Asociación de la resistencia con la producción de β-lactamasas y amplificación de genes *bla*

<i>Cefalosporina de tercera generación</i>	TOTAL	<i>β-lactamasas de espectro extendido</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>
Resistentes	76 (68 %)	59 (95 %)	46 (94 %)	25 (93 %)	38 (95 %)
Sensibles	35 (32 %)	3 (5 %)	3 (6 %)	2 (7 %)	2 (5 %)
Total	111 (100 %)	62 (100 %)	49 (100 %)	27 (100 %)	40 (100 %)
<i>P</i>		0.000	0.000	0.002	0.000
<i>Cefalosporinas de cuarta generación</i>					
Resistentes	31 (28 %)	27 (44 %)	21 (43 %)	8 (30 %)	23 (57.5 %)
Sensibles	80 (72 %)	35 (56 %)	28 (57 %)	19 (70 %)	17 (42.5 %)
Total	111 (100 %)	62 (100 %)	49 (100 %)	27 (100 %)	40 (100 %)
<i>P</i>		0.000	0.002	0.821	0.000

Identificación de β-lactamasas. El análisis de las secuencias identificó en *E. cloacae* 516 al gen *bla_{CTX-M-15}*, en *E. cloacae* 122 al gen *bla_{TEM-1}* y en *E. cloacae* 1018 al gen *bla_{SHV-5}*. Estas cepas corresponden a las aisladas en el hospital de Acapulco, Guerrero. Las secuencias nucleotídicas de los genes *bla* identificados por la realización del BLAST con el programa Chromaspro y las secuencias de los genes correspondientes obtenidas de la base de datos del GenBank, con los cuales tienen una similitud de 100% se tradujeron a sus secuencias de aminoácidos, encontrando que las secuencias coinciden totalmente con la región de la secuencia de aminoácidos de la enzima identificada. La secuencia nucleotídica de *bla_{TEM}* de *E. cloacae* 122 correspondió a un 83% de la secuencia del gene *bla_{TEM-1}*, para *bla_{SHV}* de *E. cloacae* 1018 fue de 94% y para *bla_{CTX-M}* de *E. cloacae* 516 fue de 63%, (**tabla 8**)

TABLA 8. Comparación entre las secuencias de aminoácidos de las enzimas identificadas y las secuencias de las enzimas reportadas

TEM-1	MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMM
<i>E. cloacae</i> 122	*****DQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMM
TEM-1	STFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIRHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAAN
<i>E. cloacae</i> 122	STFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIRHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAAN
TEM-1	LLLTITGGPKELTAFLNMGDGHVTRLDRWEPPELNEAIPNDERDTPAAMATTLRKLTTGELLTLAS
<i>E. cloacae</i> 122	LLLTITGGPKELTAFLNMGDGHVTRLDRWEPPELNEAIPNDERDTPAAMATTLRKLTTGELLTLAS
TEM-1	RQQLIDWMEADKVGPLLRSLAPAGWF IADKSGAGERGSRGI I AALGPDGKPSRIVVYIYTTGSQATM
<i>E. cloacae</i> 122	RQQLIDWMEADKVGPLLRSLAPAGWF*****
TEM-1	DERNRQIAEIGASLIKHW*
<i>E. cloacae</i> 122	*****
	Identidad = 83%
SHV-5	MLYIRLCIISLLATLPLAVHASQPPELQIKLSEQLSGRVGMIEMDLASGRTLTAWRADERFPMMST
<i>E. cloacae</i> 1018	*****LAVHASQPPELQIKLSEQLSGRVGMIEMDLASGRTLTAWRADERFPMMST
SHV-5	FKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHYRQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNAAANLL
<i>E. cloacae</i> 1018	FKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHYRQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNAAANLL
SHV-5	LATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQR
<i>E. cloacae</i> 1018	LATVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQR
SHV-5	QLLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGASKRGARGIVALGPNKAERIVVIYLRDTPASMAE
<i>E. cloacae</i> 1018	QLLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGASKRGARGIVALGPNKAERIVVIYLRDTPASMAE
SHV-5	RNQQIAGIGAALIEHWQR*
<i>E. cloacae</i> 1018	RNQQ*****
	Identidad = 94 %
CTX-M-15	MVKKSLRQFTLMATATVTLTLLGSVPLYAQTADVQQKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQILYRADE
<i>E. cloacae</i> 516	*****
CTX-M-15	RFAMCSTSKVMAAAVALKKESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTMSLAELSAAALQYSD
<i>E. cloacae</i> 516	*****PNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTMSLAELSAAALQYSD
CTX-M-15	NVAMNKLIAHVGGPASVTFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPRDTPRMAQTLRNLTLGKA
<i>E. cloacae</i> 516	NVAMNKLIAHVGGPASVTFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPRDTPRMAQTLRNLTLGKA
CTX-M-15	LGDSQRAQLVTWKGNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTGSGGYGTNDIAVIWPKDRAPLILVYFTQ
<i>E. cloacae</i> 516	LGDSQRAQLVTWKGNTTGAASIQAGLPAS*****
CTX-M-15	PQPKAESRRDVLASAAKIVTNGL*
<i>E. cloacae</i> 516	*****
	Identidad = 63 %

TEM-1, SHV-5 Y CTX-M-15, secuencias de aminoácidos de las enzimas del GenBank. *E. cloacae* 122, 1018 y 516, son los aislamientos de los cuales se identificaron las enzimas TEM-1, SHV-5 y CTX-M-15; la similitud entre las secuencias se presenta en “negritas”

DISCUSIÓN

Las enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido detectadas en los dos hospitales del Estado de Guerrero, representan una seria amenaza para la salud de los pacientes de ambos hospitales. La resistencia a antibióticos beta-lactámicos en enterobacterias se debe principalmente a que han adquirido genes que codifican para la producción de β-lactamasas de espectro extendido; aunque con frecuencia se presenta en combinación con la disminución de la expresión de porinas de membrana externa^{19, 21, 23, 35}; en nuestro estudio, los hallazgos de una alta frecuencia de aislamientos resistentes a los antibióticos de tercera generación CAZ, CTX, CPD y una resistencia moderada a FEP, estuvieron relacionados con la producción de BLEEs, estos resultados coinciden con los reportados por Manchanda y col (2005)¹⁶. La alta resistencia (68%) a cefalosporinas de tercera generación podría estar relacionada con el uso prolongado en los tratamientos profilácticos y terapéuticos que se prescriben en ambos hospitales, como lo han señalado otros investigadores^{15, 20, 22, 24}.

Las diferencias detectadas en la susceptibilidad a los antibióticos CTX y CAZ por las técnicas de difusión en disco y por dilución en placa, pueden deberse a la sensibilidad de cada método, como lo señalan Paterson y Bonomo (2005)²¹ en una revisión sobre las BLEEs. El valor elevado de la MIC₅₀ para CTX de los aislamientos de *E. coli* y la MIC₅₀ de CAZ más elevada para los aislamientos de *E. cloacae*, están en relación con el mecanismo de resistencia, así como el tipo de β-lactamasas producidas.

La resistencia a FOX de los aislamientos de *E. cloacae*, esta mediada por la producción de β-lactamasa inducible AmpC que está codificada cromosómicamente, de la cual por un mecanismo de transformación han derivado especies con genes AmpC transportados por plásmidos, los cuales se han movilizado y emergido en

otros géneros y especies, lo que ha permitido la dispersión hacia otros microorganismos^{35, 11}. Las enzimas AmpC son similares en actividad a las BLEEs, por lo que son muy activas contra las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam^{22, 35}. El hecho de que el 6 % de los aislamientos de *E. coli* también resultaran resistentes a FOX, indica que estas enzimas se están dispersando a otras especies²⁵. A futuro será importante determinar la diseminación horizontal de elementos genéticos transferibles en los aislamientos productores de BLEEs e identificar la posible presencia de clones multirresistentes que se están diseminando en los dos hospitales.

Como era de esperarse, todos los aislamientos resultaron sensibles al meropenem, puesto que este antibiótico no es de uso común en los dos hospitales, sin embargo debido al uso de imipenem, se encontraron 30 aislamientos resistentes, de los cuales *E. coli* representó la mayor proporción y solo se encontró en un aislamiento de *K. pneumoniae*. La resistencia a carbapenemes en enterobacterias es un resultado poco frecuente; sin embargo, existen reportes en los cuales se ha encontrado aislamientos de *E. cloacae* resistentes al imipenem^{10, 21, 27}, esta resistencia esta también relacionada con la adquisición de otros mecanismos de resistencia como la disminución de la expresión de las porinas³². Hossain y col (2004)¹⁰, encontraron una reducción de la sensibilidad al imipenem en *E. cloacae* debido a la carbapenemasa KPC-2. Paterson y Bonomo (2005)²¹, en la revisión sobre las BLEEs, señalan varias investigaciones que han encontrado *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes debido a la combinación de porinas y β-lactamasas AmpC codificada en plásmidos, señalan además a dos tipos de carbapenemasas responsables de la resistencia: metalo-β-lactamasas y KPC, y un mecanismo relacionado con la afinidad de las proteínas de unión a penicilina por los carbapenemes. Puesto que los antibióticos carbapenémicos y la cefepima están indicados para el tratamiento de infecciones nosocomiales difíciles causadas por enterobacterias productoras de BLEEs^{10, 13} este tipo de medicamentos deben ser de uso reservado para infecciones de pacientes

hospitalizados y dado que la resistencia a los antibióticos no β-lactámicos es baja, como la amikacina para los aislamientos de *E. coli* y ciprofloxacina para *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, estos antibióticos pueden ser una alternativa que permita disminuir la selección de clones multirresistentes. En base a estos resultados es importante implementar la vigilancia a antibióticos carbapenémicos, así como estudiar a nivel molecular cuales son los mecanismos de resistencia para estos antibióticos.

La resistencia combinada a 3GC y antibióticos no β-lactámicos como la gentamicina y ciprofloxacina es la causa de la resistencia a múltiples antibióticos, por el hecho de que los genes que los codifican, con frecuencia se agrupan en integrones o en plásmidos transferibles^{11, 22}. Daikos y col (2007)⁶, encontraron que las enterobacterias portadoras de integrones presentaron resistencia a tres o más clases de antibióticos. La multiresistencia encontrada en los aislamientos de *E. coli* a 3GC con resistencia a ciprofloxacina (71%) coincide con otros autores, que reportan este tipo de resistencia codificada en integrones, por lo que la presencia de elementos genéticos transferible deben ser investigados, ya que pueden actuar como factores de riesgo para la diseminación.

Se han reportado porcentajes diversos de aislamientos de enterobacterias productoras de BLEEs, lo cual se ha relacionado con los tipos de BLEEs estudiadas con una metodología en particular y con el área geográfica donde los aislamientos son prevalentes¹⁶. Nuestro resultado de 56 % de cepas productoras de BLEEs, es similar con los resultados publicados en otras partes del mundo^{2, 13, 14, 30, 31, 38, 39}. Prácticamente todos los aislamientos productores de BLEEs originaron bandas con puntos isoeléctricos que sugieren la presencia de al menos una o más β-lactamasas, sin embargo, cabe señalar que las β-lactamasas detectadas presentaron un perfil de pI que frecuentemente se traslapa, de tal manera que un mismo punto isoeléctrico pudiera corresponder a diferentes β-lactamasas. Eldestein y col (2003)⁷, detectaron

*bla*_{CTX-M} por medio de la PCR con iniciadores consenso y no consideraron la detección por IEF por la sobreposición de los pI para diferentes β-lactamasas. Por otra parte, en la mayoría de los aislamientos de *E. coli* se presentó un perfil de pI de 5.4, 7 y >8.2 y junto con otros perfiles sugirieron la presencia enzimas tipos CTX-M y TEM; sin embargo, la detección de una banda de pI de 7 en la mayoría de los aislamientos que indicó la presencia de la enzima SHV, con la amplificación del gen *bla*_{SHV} solo se detectó en el aislamiento de *E. coli* 3231. Schwaber y col (2004)³², reportaron la detección de varios puntos isoeléctricos de extractos de enterobacterias productoras de BLEEs, los cuales no presentaron amplificación de los genes *bla* TEM, SHV, OXA, CTX-M, atribuyéndolo a la presencia de otras β-lactamasas. Por el contrario, algunos aislamientos amplificaron genes *bla*, aunque no presentaron un pI relacionado, es probable que se deba a que hubo una mínima expresión de estas enzimas y no pudieron observarse en el gel del IEF, tal como lo señala Essack y col (2001)⁸, que no encontraron un pI de 5.2 esperado para enzima TEM. La mayoría de los perfiles de pI de los aislamientos de *K pneumoniae* sugieren la presencia de las BLEEs tipos SHV y CTX-M y en los aislamientos de *E. cloacae* las enzimas SHV, TEM y CTX-M.

Con base en nuestro hallazgo de genes *bla*, se puede inferir que los mecanismos de resistencia en los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* fueron las enzimas SHV y CTX-M, y en los aislamientos de *E. coli* fue por la CTX-M, aunque también se detectó TEM en un 79 % de los aislamientos BLEE positivos. Del análisis de comparación de las frecuencias de los aislamientos resistentes a 3GC en relación con la frecuencia de la producción de BLEEs, se observa que hay una asociación directa. El hallazgo de 93 a 95 % de aislamientos resistentes a 3GC que amplificaron genes de resistencia de las enzimas BLEEs, tienen concordancia con los encontrados por Quinteros y col (2003)²⁶ que fue 95 % de BLEEs como principal mecanismo de resistencia en las enterobacterias. Con base al patrón de resistencia a β-lactámicos que presentaron los aislamientos, podría inferirse que el mecanismo de

resistencia ocasionado por la producción de BLEEs, no fue el único responsable en los aislamientos, sino que pueden estar implicadas otras enzimas como la producción de carbapenemasas, esto con base a la resistencia al imipenem en los aislamientos de *E. coli* y en *E. cloacae*, así como también a la alta resistencia a cefoxitina encontrada en *E. cloacae*, que pudiera indicar la hiperproducción de la enzima AmpC cromosomal que proporciona características de resistencia similares a las BLEEs; además estos mecanismos, pueden estar combinados con una disminución de la permeabilidad de la membrana externa bacteriana debido a la pérdida de porinas. Suárez y col (2006)³⁵, en una revisión sobre mecanismos de resistencia a carbapenemes indicaron que por muchos años las enterobacterias de origen nosocomial no mostraron resistencia a carbapenemes; sin embargo, esto se modificó en los últimos años, como es el caso en Colombia en 2005, en que se reportó la primera cepa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes debido a la enzima KPC-2; anteriormente Bornet y col (2000)³, habían encontrado nueve aislamientos de *Enterobacter aerogenes* resistentes a IMP, productores de BLEEs y carentes de porinas.

La identificación de los genes que codifican las enzimas SHV-5, TEM-1 y CTX-M-15 en tres aislamientos de *E. cloacae* del Hospital General de Acapulco, Guerrero permitió por un lado, confirmar la detección de las BLEEs y también observar la correspondencia entre las β-lactamasas detectadas con el perfil de pl, esto último también fue encontrado en China por Wang y col (2003)³⁹ que reportaron los pl de extractos de enterobacterias con las correspondientes enzimas TEM, SHV y CTX-M detectadas. La secuenciación los genes *bla* detectados en tres cepas de *E. cloacae* permitió identificar tres tipos β-lactamasas presentes en aislamientos de enterobacterias de origen hospitalario, siendo este es el primer reporte en el que se define el tipo de β-lactamasas seleccionadas in vivo en enterobacterias aisladas en el Estado de Guerrero, así mismo, es el primer reporte que identifica β-lactamasas de tipo CTX-M en México. Una limitante en este estudio, es que no se amplificaron otros

tipos de genes *bla*, como el caso de las β-lactamasas producidas por *E. coli* con pl de 7.0. Por otra parte no se secuenció para identificar otros tipos de β-lactamasas que pudieran estar presentes.

CONCLUSIONES. En los hospitales estudiados la frecuencia de la resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en aislamientos de enterobacterias causantes de infecciones nosocomiales es muy alta, con una elevada proporción de resistencia a múltiples antibióticos, la cual está estrechamente relacionada con la producción de β-lactamasas de espectro extendido, siendo este el principal mecanismo de resistencia a antibióticos beta-lactámicos. Las β-lactamasas tipo TEM y CTX-M son las enzimas predominantes en los aislamientos de enterobacterias, mientras que las beta-lactamasas tipo SHV se detectaron en *E. cloacae* y *K. pneumoniae*. Finalmente es necesario tomar medidas de control en los hospitales para evitar la diseminación de estas cepas, así como tener un control estricto sobre el uso de antibióticos, principalmente reducir el uso de carbapenemas, ya que es el antibiótico de última línea para este tipo de microorganismos.

REFERENCIAS

1. **Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, et al.** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47(11)**:3506-3514.
2. **Blomberg BR, Jureen K, Manji B, Tamim D, Mwakagile W, Urassa M, et al.** High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by Gram negative bacteria with extended spectrum β -lactamasas in Dar Es Salaam, Tanzania. *J Clin Microbiol* 2005; **43(2)**:745-749.
3. **Bornet Ch, Davin-Regli A, Bosi C, Pages J M, and C. Bollet.** Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol* 2000; **38(3)**:1048-1052.
4. **Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI/NCCLS).** 2005 Performance standars for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. 8th edition. M02-A8. CLSI, Wayne, Pa.
5. **Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI/NCCLS).** 2005. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, Pa.
6. **Daikos GL, Kosmidis C, Tassious PT, Petrikkos G, Vasilakopoulou A, Psychogiou A, et al.** *Enterobacteriaceae* bloodstream infections: Presence of integrones, risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2007. **51(7)**:2366-2372.
7. **Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I and Stratchounski L.** Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47(12)**:3724-3732.
8. **Essack SY, Hall LM, Pillay DG, Mcfadyen ML and Livermore DM.** Complexity and diversity of *Klebsiella pneumonia* strains with extended spectrum β -lactamasas isolated in 1994 y 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45(1)**:88-95.
9. **Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Ficola F, Radice M, et al.** Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev Argen de Microbiol* 2005; **37**:57-66.
10. **Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB, Moland ES, Lockhart TJ, et al.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme PKC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48(11)**:4438-4440.
11. **Jacoby G and Muñoz-Price LS.** The New β -Lactamasas. *N Eng J Med* 2005; **352(4)**:380-391.
12. **Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, et al.** Outbreak of Infection Caused by *Enterobacter cloacae* Producing the Novel VEB-3 Beta-Lactamase in China. *J Clin Microbiol* 2005; **43(2)**:826-831.
13. **Kang CI, Kim SH, Park W, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al.** Bloodstream Infections Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella*

- pneumoniae*: Risk Factors for Mortality and Treatment Outcome, with Special Emphasis on Antimicrobial Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48(12)**:4574-4581.
14. **Kim J, Lim Y, Jeong Y and Seo S.** Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 y CTX-M-9 extended spectrum β -lactamasas in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49(4)**:1572-1575.
 15. **Luzzaro F, Doquier JD, Colinon C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, et al.** Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48(2)**:648-650.
 16. **Manchanda V, Singh NP, Goyal R, Kumar A and Thukral SS.** Phenotypic characteristics of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* & evaluation of available phenotypic techniques for detection of extended spectrum beta-lactamasas. *Indian J Med Res* 2005; **122**:330-337.
 17. **Mattew M, Harris AM, Marshall MJ and Ross GW.** The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of betalactamasas. *J Gen Microbiol* 1975; **88(1)**: 169-78.
 18. **Miranda G, Castro N, Leaños B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, et al.** Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended spectrum β -lactamase in a Mexican Pediatric Hospital. *J Clin Microbiol* 2004; **42(1)**:30-35.
 19. **Moolman GJ, Jankowitz CE, Bzuidenhout S and Pitout JD.** Beta-lactamasas in *Enterobacteriaceae* - an ever - present threat. *SA Med J* 2006; **96(4)**:331-334.
 20. **Ndugulile F, Jureen R, Harthung S, Urassa W and Langeland N.** Extended Spectrum β -Lactamasas among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an Intensive Care Unit of a tertiary health facility in Tanzania. *BMC Infect Dis* 2005; **5**:86.
 21. **Paterson DL, and Bonomo RA.** Extended-Spectrum β -Lactamasas: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18(4)**:657-686.
 22. **Paterson DL.** Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med* 2006; **119(6A)**:520-528.
 23. **Perilli M, Mugnaioli C, Luzzaro F, Fiore M, Stefani S, Rossolini G et al.** Novel TEM-Type Extended-Spectrum β -Lactamase, TEM-134, in a *Citrobacter koseri* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49(4)**:1564-1566.
 24. **Pinto P, Phillips M, Ramlal H, Teemul K and Prabhakar P.** Third generation cephalosporin use in a tertiary hospital in Porto Spain, Trinidad: need for an antibiotic policy. *BMC Infect Dis* 2004; **4**:59.
 25. **Pitout JD, Gregson D, Church D, Elsayed S and Laupland K.** Community wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 β -lactamase producing *Escherichia coli* strains in the Calgary Health region. *J Clin Microbiol* 2005; **43(6)**:2844-2849.
 26. **Quinteros M, Radice M, Rodríguez M, Costa N, Korbenfeld D, Couto E, et al.** Extended spectrum β -lactamasas in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47(9)**:2864-2867.

27. **Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, et al.** First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48(3)**:1068-1069.
28. **Reporte de la encuesta “Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños de 21 hospitales en México”** 1999. *S Públ Méx* 41 (1).
29. **Rodríguez-Baño J, Navarro M, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain M, Perea E, et al.** Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 2004; **42(3)**:1089-1094.
30. **Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Cicaglione D, Romano L, Fiori B, et al.** Characterization of Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix Extended-Spectrum β-Lactamase Detection Method. *J Clin Microbiol* 2003; **41(4)**:1463-1468.
31. **Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold H. M, et al.** Extended spectrum β-lactamases among *Enterobacter* isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob. Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49(3)**:1150-1156.
32. **Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE et al.** Utility of NCCLS guidelines for identifying Extended-Spectrum β-lactamasas in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae* *J Clin Microbiol* 2004; **42(1)**:294-298.
33. **Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, et al.** TLA-1: a new Plasmid-Mediated Extended-Espectrum β-Lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44(4)**:997-2003.
34. **Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velázquez M, et al.** Outbreak of infection with extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. *J Clin Microbiol* 2001; **39(9)**:3193-3196.
35. **Suarez CJ, Kattán JN, Guzmán AM and Villegas MV.** Mecanismos de Resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio* 2006; **10(2)**:85-93.
36. **Tzelepi E, Giakkopi P, Sfianou D, Loukova V, Kemeroglou A and Tsakris A.** Detection of expanded spectrum β-lactamase in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000; **38(2)**:542-546.
37. **Valverde A, Coque T, Sánchez-Moreno M, Rollán A, Baquero F and Cantón R.** Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of Extended spectrum β-lactamase producing *Enterobacteriaceae* during Nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004; **42(10)**:4769-4775.
38. **Vignoli R, Varela G, Mota M, Cordeiro N, Power P, Ingold E, et al.** Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended spectrum β-lactamasas isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol* 2005; **43(6)**:2940-2943.

39. **Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M and Quinn J.** Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum β-lactamasas: Prevalence of CTX-M-3 at a Hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47(2)**:790-793.