

# Detección y caracterización genotípica de betalactamasas de *Escherichia coli* uropatógenas del Hospital Belén de Trujillo durante enero-abril de 2015

## Detection and genotypic characterization of beta-lactamases in uropathogenic *Escherichia coli* of the Hospital Belen of Trujillo during January-April of 2015

Carlos Abanto Díaz<sup>1</sup>, José Gonzales Cabeza<sup>2</sup>, Elio Avila Verau<sup>3</sup>,  
Jhony Teran Rojas<sup>4</sup> y Kelly Mabel Castillo Diestra<sup>5</sup>

Recibido: 17 de mayo de 2017  
Aceptado: 24 de mayo de 2017

### Resumen

*E. coli*, como principal responsable de las infecciones urinarias, ha desarrollado mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos como la producción de enzimas betalactamasas. El presente trabajo pretende detectar la existencia y caracterizar los tipos de genes que codifican la síntesis de BLEE en *E. coli* uropatógenas del hospital Belén de Trujillo, durante enero-abril del 2015. Se trabajó 138 cepas de *E. coli*. La confirmación fenotípica de cepas productoras de BLEE se realizó mediante prueba de sinergia doble disco. Posteriormente se utilizó PCR para la detección de los tipos de genes BLEES. Se encontró

que un 30.43% del total de cultivos fueron productores de BLEES, los genes BLEE caracterizados fueron CTX-M, TEM y SHV, de los cuales 88% fueron CTX-M 54.7% de tipo TEM y 38% SHV. Asimismo se encontró que en 52.3% se cepas de *E. coli* coexistieron genes de tipo TEM y CTX-M. Se concluye que la frecuencia de *E. coli* productores de BLEES fue de 30.43%, siendo el gen tipo bla CTX-M el más frecuente.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, betalactamasas de espectro extendido, genes bla, PCR.

### Abstract

The *E. coli*, as principal responsible for urinary tract infections, has developed mechanisms of resistance to beta-lactamases antibiotics as well as the production of beta-lactamases enzymes. In the present work the aim is to detect and characterize the types of genes which codify the synthesis of BLEE in strains of uropathogenic *E. coli* of the Hospital Belen of Trujillo, during January-April of 2015. We worked with 138 strains of *E. coli*. The phenotypic confirmation of ESBL-producing strains was performed using the test of double disc synergy. Subsequently, we used PCR for the detection of ESBL genes types. We found that

30,43% of the crops were ESBL producers, the characterized ESBL genes were CTX-M, TEM and SHV, from which 88% were CTX-M 54.7% of the TEM type and 38% were SHV. Likewise, we found that in 52.3% the strains of *E. coli* genes type TEM and CTX-M. coexisted. We concluded that the frequency of *E. coli* ESBL producers were 30,43%, being the gene type bla CTX-M the most frequent.

**Keywords:** *Escherichia coli*, beta-lactamases from spread spectrum, genes bla, PCR.

<sup>1</sup> Microbiólogo, maestro en ciencias, Docente Universidad Privada Antenor Orrego.

<sup>2</sup> Biólogo, doctor en Biotecnología, Docente Universidad Privada Antenor Orrego.

<sup>3</sup> Microbiólogo, Docente Universidad Privada Antenor Orrego.

<sup>4</sup> Técnico en laboratorio Administrativo Universidad Privada Antenor Orrego.

<sup>5</sup> Microbióloga, Kelly Mabel Castillo Diestra. Jefa del Área de Microbiología del hospital Belen de Trujillo.

## I. INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) se caracteriza por la presencia de microorganismos en el tracto urinario a cualquier nivel, englobando diferentes entidades clínicas, por lo que se requiere su catalogación mediante la correlación clínica-laboratorio. Son de gran importancia y prevalencia dentro de las infecciones bacterianas, lo cual junto a su morbilidad, mortalidad y las resistencias bacterianas de los uropatógenos más frecuentes (1) representan un importante reto a la hora de establecer su diagnóstico y tratamiento. (2) Los patógenos más frecuentemente implicados en las ITU pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y dentro de este grupo, *Escherichia coli* es el más frecuente (3). Esta bacteria ha desarrollado una serie de mecanismos de resistencia antimicrobiana (4), principalmente a antibióticos betalactámicos presentes en los esquemas terapéuticos de las ITU.(5)

La resistencia a betalactámicos se puede producir por varios mecanismos, el más común es la hidrólisis enzimática por producción de  $\beta$ -lactamasas (6), un grupo numeroso y complejo de enzimas que inactivan penicilinas y cefalosporinas hidrolizando los enlaces amidas, del anillo betalactámico (7) y se distribuyen en bacterias Gram negativas y Gram positivas (8). Estas enzimas han sido clasificadas según la clasificación de Bush *et al.* (1995), el grupo 2b de esta clasificación incluye a las enzimas TEM-1, TEM-2 contenidas en plásmidos y SHV-1 que es tanto de tipo cromosómica como plasmídica. TEM hace referencia a Temoniera, nombre de la paciente de la cual se aisló por primera vez una cepa *E. coli* productora de esta enzima, y SHV "sulphydril variable" describe las propiedades bioquímicas de la enzima (9). Las BLEE presentes generalmente en bacilos Gram negativos han presentado de 1 a 4 sustituciones de aminoácidos, que han provocado cambios alrededor del sitio activo de la enzima, aumentando el espectro de su actividad hidrolítica dando origen a las denominadas Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), las de mayor relevancia clínica que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera e inclusive cuarta generación y a los monobactámicos como el aztreonam, pero no a cefamicinas ni carbapenémicos y son susceptibles de inhibición por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (10).

Actualmente las BLEE TEM y SHV comprenden más de 200 y 160 variedades respectivamente y tienen una distribución mundial. (11) La evolución de las betalactamasas por mutación no se ha limitado a las familias TEM y SHV, nuevas enzimas de clase A con actividad BLEE que han sido identificadas como Betalactamasas tipo CTX-M, la cual presenta origen diferentes y una escasa relación con las TEM y SHV (12) detectado por primera vez a finales de 1980 en los aislados clínicos de la familia *Enterobacteriaceae* en Alemania, Francia y Argentina. (13). El nombre CTX-M refleja la potente

actividad hidrolítica de esta enzima frente a la cefotaxima y ceftriaxona, se reconocen alrededor de 100 tipos de CTX-M. y junto con las variantes de BLEE tipo TEM y SHV son los más importantes y frecuentes BLEE adquiridos en la propagación de enterobacterias 13. El aislamiento de cepas *E. coli* con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se ha convertido en un problema creciente, ha creado una alarma epidemiológica y ha complejizado el tratamiento de algunas infecciones como las ITU (14)

Los genes que codifican estas enzimas pueden ser cromosómicos, aparecen por mutación o son adquiridos a través de plásmidos o transposones, los cuales pueden ser autotransferibles y diseminarse entre bacterias incluso de diferentes especies (15), siendo los responsables de la diseminación de la mayor parte de las betalactamasas. (16)

En el 2009, un estudio realizado en 34 hospitales de España demostró un aumento del 4, 04% en el porcentaje de producción de BLEE en *E. coli* 2. Asimismo estudios realizados en Israel informan de una prevalencia de un 1,25% de cepas portadoras de BLEE en bacilos gram-negativos de muestras de orina (17). En Latinoamérica las cepas de Enterobacterias productoras de BLEE son muy frecuentes y estudios recientes indican la prevalencia más alta en el mundo con un 8.5-18.1% para *E. coli* (18).

En el Perú, Laboratorio de Análisis Clínicos "Loayza", de Cajamarca, en el año 2008 encontró un 21.6% de *E.coli* aislados de ITU productores de BLEES (19). Rivera(2008) evaluó 45 cultivos de Enterobacterias, de los cuales cuatro *E.coli* presentaron BLEE. García (2011) reveló que el aislamiento de cepas productoras de BLEE en *E.coli* se sitúa en torno al 10% (20). Varios investigadores, entre el 2007 y el 2010, realizaron detecciones de los genes blaTEM-1 y SHV, encontrando aproximadamente 30-68 % de genes blaTEM y 38-70% de genes blaSHV en cepas de *E. coli*, en diferentes hospitales (21). Otros estudios reportaron que de 59 aislamientos productores de  $\beta$ -lactamasas tipo SHV-2, el 3% eran cepas de *Escherichia coli* 22. En 2002 en España se detectó CTX-M- en 7 pacientes con ITU (21).

En el Perú, muy pocas investigaciones han evaluado e integrado estudios sobre el fenotipo BLEE con genotipo específico. (22). No existe en la ciudad de Trujillo un reporte referente a los tipos de genes de resistencia antimicrobiana que estén circulando y que sean los de mayor presencia entre las bacterias patógenas en este medio. Por eso el presente trabajo tiene como objetivo detectar y caracterizar genotípicamente  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en cultivos de *Escherichia coli* aislados de pacientes con infecciones del tracto urinario atendidos en el hospital Belén de Trujillo durante enero-abril del 2015.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

**Población en estudio:** Representada por todos los cultivos de *Escherichia coli* aislados e identificados a partir de muestras de orina que se recibieron en el Hospital Belén de Trujillo entre el periodo enero hasta abril de 2015.

**Muestra:** Constituida por cultivos de *Escherichia coli* detectados como productores de Betalactamasas de espectro extendido provenientes de los urocultivos positivos

**Unidad de análisis:** Cultivo de *E. coli* productor de betalactamasas de espectro extendido

### MÉTODO

**Tipo de Estudio:** Descriptivo

**Diseño de Investigación:** Investigación descriptiva.

**Variables y operacionalización de variables:** Gen que codifica la síntesis de betalactamasas de espectro extendido encontrado en el genoma de cultivos de *Escherichia coli*.

**Instrumentos de recolección de datos:** Muestras de orina.

### Procedimiento

Obtención y reactivación de cultivos de *Escherichia coli* proporcionados por el hospital.

Los cultivos identificados como *E. coli* a través del sistema automatizado Microscan proporcionados por el Laboratorio Central del Hospital Belén de Trujillo fueron sembrados en Agar Nutritivo y llevados al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del departamento de ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego para su posterior reactivación en caldo BHI y en Agar MacConkey.

### Identificación bioquímica diferencial de especies de *Escherichia coli*

Los cultivos reactivados fueron sembrados en los medios diferenciales como TSI, CITRATO, SIM, LIA para su confirmación como cultivos de *E. coli*.

**Técnica de la sinergia del doble disco para la detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEES) en los cultivos de *Escherichia coli* causantes de ITU**  
**Método de Jarlier (Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología) (23).**

A partir de un cultivo puro de *Escherichia coli* de 12 h. se preparó una suspensión bacteriana ajustada al tubo No 0,5 de la escala de MacFarland y se sembró por duplicado en placas con Agar Mueller Hinton. En el centro de estas placas se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y alrededor de éste a 25 mm de distancia, discos de CAZ, CTX-M, FEP, ATM y CXM. Se llevó a cabo una placa control sin amoxicilina/ácido clavulánico, la cual permitió conocer los porcentajes de cultivos de *E. coli* resistentes a las cefalosporinas o al aztreonam. Después de incubar a 37 °C por 16-20 h se procedió a detectar la presencia de bacterias productoras BLEE manifestada por el efecto sinérgico comprendido entre el inhibidor y algunos de los discos de cefalosporinas o del aztreonam.

### Detección por PCR y caracterización de genes TEM, CTX-M y SHV en cultivos de *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de espectro extendido

**Extracción de DNA:** La extracción de DNA se realizó por el método de ebullición según lo describen Zhang y col. con algunas modificaciones (24).

**Reacción en cadena de la polimerasa:** Para la amplificación de 3 genes respectivos se emplearon los primers: CTX-M-1(5'-TTTGGCGATGTGCAGTAC-CAGTAA3') y CTX-M-2 (5CGATATCGTTGGTGGT-GCCAT 3) TEM-1 (5' ATAAAATTCTTGAAGACGAA3) TEM-2(5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC3) SHV-1(5-TGGTTATGCGTTATATTCGCC3), SHV-2(5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGC3) diseñados por Biosearch Technologies®, USA. La mezcla de reacción de PCR trabajada para cada uno de los genes fue ajustada según las condiciones de ThermoFisher Científic. Las PCR fueron realizadas en un termociclador Verite Thermal Cycler, bajo las condiciones siguientes: Para el caso del gen CTX-M: 1 ciclo de 4 min de predesnaturalización a 95 °C; 30 s de hibridación a 57 °C, 30 segundos de extensión a 72 °C y 30 s de desnaturalización a 95 °C, repetidos en 35 ciclos y un ciclo de extensión final 5 min a 72 °C y un tiempo infinito a 4°C. Para el caso del gen TEM: 1 ciclo de 5 min de predesnaturalización a 95 °C; 60 s de hibridación a 52 °C, 1.10 min de extensión a 72 °C y 30 s de desnaturalización a 94 °C, repetidos en 35 ciclos y un ciclo de extensión final 7 min a 72 °C y un tiempo infinito a 4°C. Para el caso del gen SHV: 1 ciclo de 5 min de predesnaturalización a 94 °C; 30 s de hibridación a 56 °C, 1 min de extensión a 72 °C y 30 s de desnaturalización a 95 °C, repetidos en 35 ciclos y un ciclo de extensión final 7 min a 72 °C y un tiempo infinito a 4°C. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (Invitrogen). La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 V por 40 minutos. El gel teñido con bromuro de etidio (0.5ug/1mL) fue examinado a través de un transiluminador de luz ultravioleta (UV), donde se verificó el tamaño de las bandas de ADN amplificadas, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. como referencia. Se obtuvieron bandas del tamaño de 1078

pb, para el gen TEM; 870 pb para el gen SHV y de 544 pb para los genes bla CTX-M, respectivamente, los cuales fueron finalmente fotografiados y analizados.

### III. RESULTADOS

Tabla 1. Porcentaje de cultivos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) obtenido del total aislados de urocultivos positivos del Hospital Belén de Trujillo durante enero-abril del 2015.

ASPECTO	CANTIDAD
Cultivos de <i>Escherichia coli</i> aislados e identificados a partir de muestras de orina (Urocultivos positivos)	138
Cultivos de <i>Escherichia coli</i> provenientes de los urocultivos positivos productores de Betalactamasas de espectro extendido (BLEES positivo)	42
Porcentaje (%) de <i>E.coli</i> BLEE obtenido	30.4%

Tabla 2. Porcentaje de *Escherichia coli* resistentes para cada uno de los antibióticos usados en la prueba de la sinergia doble disco.

ANTIBIOTICOS USADOS EN LA PRUEBA DE SINERGIA DOBLE DISCO						
TOTAL	BLEE	CTX	CAZ	ATM	CXM	FEP
DE						
AISLAMIENTOS	No %	No %	No %	No %	No %	No %
138	42 30.4	36 85.7	30 71.4	21 50	17 40.4	29 69

BLEE= Betalactamasas de espectro extendido

ATM= aztreonam

CTX= cefotaxima 3era (CTX-M)

CXM= cefuroxima 2da (CTX-M)

CAZ= ceftazidima 3era

FEP= cefepime 4ta (CTX-M)

Tabla 3. Porcentaje y tipos de genes que codifican betalactamasas de espectro extendido detectadas y caracterizadas mediante PCR en los 42 cultivos de *Escherichia coli* BLEE.

Tipo de gen bla	No de cultivos de <i>E. coli</i> detectados	%
Gen bla CTX-M	37	88.0
Gen bla TEM	23	54.7
Gen bla SHV	16	38.0

Tabla 4. Porcentajes de *E. coli* BLEE detectados con más de un gen *bla* de los 42 aislados.

Combinación de gen <i>bla</i>	No de cultivos de <i>E. coli</i> encontrados	%
Gen <i>bla</i> CTX-M y TEM	22	52.3
Gen <i>bla</i> TEM y SHV	9	21.4
Gen <i>bla</i> CTX-M y SHV	15	35.7
Gen <i>bla</i> CTX-M TEM y SHV	8	19.0
Presencia de un solo tipo de Gen CTX-M	12	28.5

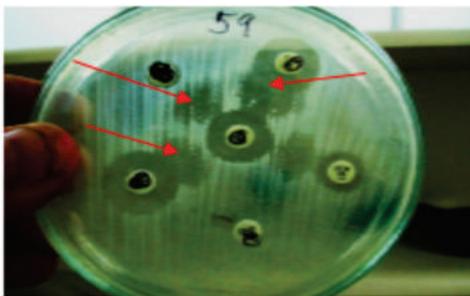
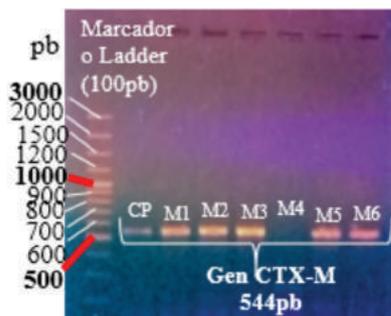
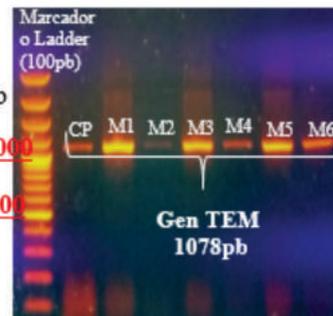


Figura No 01: Detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en los cultivos de *E. coli* causantes de ITU evidenciado por el efecto sinérgico (distorsión de los halos de inhibición-efecto de huevo) entre el disco inhibidor (en el centro) y los discos de cefalosporinas

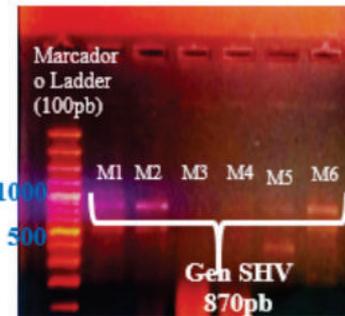
**Geles mostrando bandas de genes que codifican betalactamasas de espectro extendido encontradas por amplificación en PCR de cepas de *E. coli* BLEE aislados de ITU**



**Figura No 02:**  
Bandas amplificadas del gen CTX-M  
CP= control positivo  
M= muestras (1,2,3,5,6)positivas para el gen CTX-M;  
M4= negativa para el gen CTX-M



**Figura No 03:**  
Bandas amplificadas del gen TEM  
CP= control positivo  
M= muestras (1-6)positivas para el gen TEM



**Figura No 04:**  
Bandas amplificadas del gen SHV  
M= muestras (1,2,6)positivas para el gen SHV  
M3,M4,M5= negativas para SHV

## IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo son importantes debido a que representan una primera fuente de conocimientos para caracterizar los principales tipos de genes productores de BLEES en *E. coli* en Trujillo. Esto permitirá empezar a construir un perfil epidemiológico de la presencia de genes de resistencia antimicrobiana que están actualmente presentándose entre las bacterias de mayor relevancia clínica, dar a los médicos un primer reporte sobre el grado de presencia de estos genes y poder determinar alternativas terapéuticas y dosificaciones para el tratamiento en pacientes con esta patología.

La tabla 1 muestra de manera alarmante que un poco más del 30% del total de *E. coli* aisladas son productoras de BLEE, lo cual confirma que estas bacterias se han ido incrementando de manera importante a partir del siglo XXI como lo demuestran también los datos colectados en Europa, América y Asia que mostraron un incremento de *E. coli* BLEE de 2 a 13.5%.<sup>25</sup> Otros resultados cercanos a nivel mundial son los de El Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Monterrey, México, que reportó de 2006 a 2009 como microorganismos productoras de betalactamasas de espectro extendido, 30% de *Escherichia coli* 26. En países como Turquía y en Europa se han reportado entre 25-50% de estas cepas<sup>27</sup>. En el Perú, Arce Z y col en el 2011 reportaron un 36.3% de *E. coli* uropatógenas productoras de BLEES del Hospital Regional Docente "Las Mercedes" en Chiclayo,<sup>27</sup> Flores et al. (2008), en pacientes con (ITU) en Lima se encontró una frecuencia de *E. coli* de 37,71%. (28).

Estos resultados difieren, sin embargo, de los encontrados en España donde hasta el 2012 la frecuencia de cepas *E. coli* BLEE era del 5-10%,<sup>14</sup>. En el Hospital de Guadalajara, entre octubre de 2010 y 2011, cepas de *E. coli* BLEE tuvieron una prevalencia de 16% (29). El Hospital Regional de Ica en el 2015 presentó un 57% de *E. coli* BLEE aislados de urocultivos. Estas diferencias encontradas se deben a varios factores: la región donde se llevó a cabo el estudio, el tipo de paciente, factores de riesgo, brotes epidémicos, si el estudio se realizó dentro del hospital o en la comunidad (30) pueden existir diferencias cuantitativas en la actividad hidrolítica de determinadas cepas BLEE sobre los sustratos. Esto origina que determinadas cepas BLEE resistentes puedan parecer sensibles *in vitro* a los betalactámicos (31), de igual manera ciertas betalactamasas pueden no detectarse si el inóculo es muy elevado, si existe una disminución de la permeabilidad de la membrana al paso del antibiótico o si la producción de betalactamasa se asocia con otro mecanismo de resistencia, como la hiperproducción de cefalosporinasa de Bush tipo 1, AmpC, lo cual no hará que se produzca inhibición por ácido clavulánico (32).

En la tabla 2 el mayor porcentaje de *E. coli* productoras de BLEE fue resistente a cefotaxima, lo que concuerda con el mayor número de genes tipo CTX-M encontrados. Según la literatura en un antibiograma, aquellas cepas que muestran resistencia a la cefotaxima y sensibilidad a otras cefalosporinas son sospechosas de ser una CTX-M y en aquellos que sea al revés es posible pensar en cepas de otro tipo de BLEE (33). Esto es debido a que la BLEE tipo CTX-M tiene principalmente actividad sobre la cefotaxima y no sobre la ceftazidima; aunque en los últimos años la emergencia de variantes de CTX-M está mejorando su actividad frente a ceftazidima. (15). También se obtuvo una alta proporción de cepas productoras de BLEE con actividad ceftazidimasa, compatibles con las familias SHV y/o TEM. Bonnet (2004) señala que las enzimas BLEE tipo TEM y SHV pueden ser tipo ceftazidimasas, ya que hidrolizan con mayor eficacia ceftazidima (34), aunque es común entre las bacterias productoras de CTX-M exhibir diferentes fenotipos de resistencia (35).

Los porcentajes de resistencia mostrados en la tabla 2 son más elevados que los encontrados en el Instituto Nacional de Salud en el año 2008, cuando se realizó vigilancia de resistencia antimicrobiana en 5 hospitales de Lima donde se reportó resistencia de *E. coli* en un 36% para cefalosporinas de tercera generación, 37,9% para cefepime y 39,9% para aztreonam<sup>36</sup>. Esto refleja el aumento en la producción y la mayor variedad de subtipos de BLEES surgido en *E. coli* en los últimos años.

En la tabla 3 se observa que el tipo de gen mayormente encontrado en el genoma de las *E. coli* es el CTX-M, lo cual concuerda con lo publicado actualmente en la literatura donde se manifiesta que, en los últimos años, la gran mayoría de los aislados productoras de BLEE son cepas de *E. coli* con CTX-M que proceden de pacientes de la comunidad y principalmente causantes de infecciones del tracto urinario. En los últimos 10 años las enzimas cefotaximasas casi han desplazado a otras enzimas betalactamasas, incluyendo a las variantes SHV y TEM. Su rápida diseminación ha permitido encontrarlas en aislados hospitalarios y comunitarios tanto de *E. coli* como de otras bacterias que principalmente están implicadas en ITU<sup>50</sup>. En la actualidad son las enzimas más prevalentes a nivel mundial (38).

En relación a los otros dos genes BLEE (TEM y SHV), en cuanto a la frecuencia de hallazgo en los genomas de *E. coli*, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Galvan F. y col en el 2012, quien reportó a CTX-M como el más frecuente con 54.7% seguido de TEM con 13.2% y como el menos encontrado a SHV con 5.7%. Igualmente Hernández describió en el 2010 una distribución de los tipos de BLEE según procedencia: a nivel hospitalario fueron de 54,1%, 34,7% y

11,1% para *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV, respectivamente, mientras que a nivel comunitario los porcentajes fueron de 54,7%, 27,7% y 17,5%. En este estudio, al igual que en nuestros resultados, la frecuencia del gen *bla*CTX-M supera a los otros tipos de genes bla. 2. Por otro lado, difieren de lo reportado por Castro et al., quienes en un estudio realizado con *E. coli* productores de BLEE aislados de urocultivos de pacientes de la comunidad de Chilpancingo, México, describieron que los genes *bla*TEM (94,4%) fueron los más frecuentes, seguidos dos por *bla*CTX-M (50%) y *bla*SHV (5,5%) 39. Esta diferencia probablemente se deba a que algunos microorganismos que expresan ciertas enzimas están mejor adaptados a algunas áreas geográficas (40).

La alta prevalencia de los genes BLEE, así como el éxito de su diseminación, está relacionado con la ubicación de los estos, ya sea en plásmidos autotransferibles o elementos genéticos móviles y por los mecanismos de transferencia horizontal (conjugación) de los plásmidos donde con frecuencia se localizan. Las  $\beta$ -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, así como sus derivados, las BLEE tipo TEM o SHV, se han descrito en plásmidos de un tamaño que oscila entre 80 y 300 Kb, de un número reducido de grupos de incompatibilidad: IncC, IncFI, IncFII, IncFIB, IncHI2 y IncL/M. Las BLEE tipo CTX-M se han encontrado en plásmidos de un tamaño variable, desde 7 Kb a 160 Kb. del grupo IncN o IncL/M (CTX-M-1), IncA/C2 (CTX-M-3), IncFII (CTX-M-15) e IncHI2, IncP1-alfa o IncFI (CTX-M-9). Estos plásmidos que contienen genes tipo CTX-M suelen ser transferibles por conjugación y su frecuencia de transferencia varía desde 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-2</sup> por célula donadora. Esto explica la fácil diseminación de la mayoría de los plásmidos que portan *bla* CTXM (40).

Los genes BLEE pueden también estar asociados a secuencias de inserción y transposones como por ejemplo IS26, ISEcp1, ISCR1 y a transposones Tn3, Tn402, entre otros, los cuales desempeñan un papel muy importante en la movilización génica intracelular, incorporan genes, ocasionando mutaciones puntuales en los genes blanco (sitios de inserción de los genes de resistencia) de bacterias susceptibles. Todos estos elementos podrían haber acelerado la evolución de la diversidad genética y la rápida expansión de los genes BLEE, originando además que los plásmidos que codifican las BLEE contengan también genes de resistencia de otras clases de antibióticos, lo que hace que las bacterias se vuelvan multiresistentes (40).

La tabla 4 muestra que se encontraron asociaciones de genes, en su mayoría *bla*CTX-M + *bla*TEM. Estas asociaciones pueden conferirles a las cepas de *E.coli* un aumento en los niveles de resistencia, así como diversos espectros de hidrólisis hacia los diferentes antibióticos, lo cual fue corroborado con los altos porcentajes de resistencia

reportados en la tabla 2. La combinación de genes TEM y SHV, por otro lado, fueron las menos encontradas en el mismo genoma, mientras que existe un regular número de *E.coli* que contienen a los tres genes a la vez en sus genomas y un total de 30 cepas de *E.coli* portó más de un gen de manera simultánea.(41).

El fenotipo de resistencia, donde los cultivos presentan dos o más tipos de BLEE, es una estrategia bacteriana de producción cada vez más común y peligrosa en *E. coli*, indica la evolución de las mismas que a veces les permite enfrentar con mucha frecuencia y efectividad a otros grupos de antimicrobianos (42). La portación simultánea de varios genes es debido a la alta transmisión de plásmidos conjugativos y la promiscuidad en el proceso de transferencia de la información.

El presente trabajo constituye la primera publicación sobre la presencia de genes BLEE en *E. coli* y su caracterización genética en pacientes de nuestro medio. Hay que tener presente que una de las limitaciones del presente trabajo es el secuenciamiento de cada uno de los genes obtenidos, lo cual hubiera permitido identificar las posibles mutaciones y determinar las variantes de CTX-M, TEM y SHV que se están produciendo en la actualidad. La difusión de estos genes codificantes de BLEE contribuirá a orientar en la elección de los esquemas terapéuticos a ser utilizado en el tratamiento empírico de las ITU en esta población en particular.

## V. CONCLUSIONES

1. Las *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido están experimentando un preocupante aumento en los aislados de urocultivos en los últimos años.
2. El gen CTX-M es el genotipo mayormente encontrado en *E.coli* productoras de betalactamasas de espectro aisladas de ITU y las más prevalentes en el mundo.
3. La alta prevalencia de los genes BLEE, así como el éxito de su diseminación, se debe a su ubicación en plásmidos o elementos genéticos móviles y a los mecanismos de transferencia horizontal, lo que hace posible actualmente detectar genomas que portan simultáneamente varios genotipos BLEE en una misma cepa bacteriana.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gómez J. Valor de la racionalización en el uso clínico de antibióticos. *Ana Med Interna (Madrid)*. 2998;15:334-7.
2. Hernandez E. *Escherichia coli* productoras de BLEES aisladas de urocultivos: Implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria (Tesis doctoral) Madrid. Universidad de Complutense de Madrid.
3. Martín S, Martín T, Liso PJ. Tratamiento de las infecciones producidas por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): Formación continuada para farmacéuticos de hospital V. Badajoz, España: Fundación PROMEDIC; 2010. p. 95-127.
4. Gomez J. Infección urinaria por *Escherichia coli* multirresistente: impacto clínico y nuevas perspectivas. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-articulo-infeccion-urinaria-por-escherichia-coli-13110473>
5. Tena D, Praetorius AG, González JC, et al. Evolución del patrón de sensibilidad de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario diagnosticadas en la comunidad durante el periodo 2003-2007: Estudio multicéntrico en Castilla la Mancha. *Rev Esp Quimioter*. 2010; 23(S1):36-42.
6. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO & Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2015; 13:42–51.
7. Morejon M, Salup R, Cue M. Actualización en antimicrobianos sistémicos. La Habana: Editorial Ciencias médicas; 2005. p. 47,48.
8. Sidjabat, H., Kamolvit, W., Wailan, A. y Paterson, D. 2013. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria. *Microbiology Australia*, 34(1): 43-46.
9. Garcia-Hernandez A. M., Garcia Vazquez, E., Hernandez-Torres A., Ruiz J., Yague G., Herrero J. A. et al. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) significacion clinica y perspectivas actuales. *Revista Espanola de Quimioterapia* 2011; 24(2): 57-66
10. Paterson, D. 2006. Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal Medicine*, 119: 20-28.
11. Walsh, T.; Toleman, M., Poirel, L. y Nordman, P. 2005. Metallo- $\beta$ -lactamasas: the quiet before the storm?. *Clinical Microbiology Review*, 18: 306-325.
12. Máttar, S. y Martínez, P. 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): Detección, impacto clínico y epidemiología. *Asociación Colombiana de Infectología*, 11(1): 23-35.
13. Colquechagua F *Enterobacterias* productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el instituto nacional de salud del niño (Tesis doctoral)Lima Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2014.
14. Miranda M. *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. *Resistencia Sanid. mil* 2013; 69 (4): 244-248.
15. Marin, M. and F. Gudiol (2003). "[beta-Lactam antibiotics]." *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21(1): 42-55.
16. Gniadkouski, M. 2001. Evolution and epidemiology of extended- spectrum  $\beta$ -lactamasas (ESBLs) and ESBL, producing microorganism. *Infection Microbiology Clinical*, 7: 597-608.
17. Colodner R, Keness Y, Chazan B, Raz R. (2001) Antimicrobial susceptibility of community acquired uropathogens in Northern Israel. *Int. J. Antimicrob. Agents*.18:189-192.
18. Blanco M. y Cremona A. Manejo de las infecciones por organismos multirresistentes. *Infectología Crítica a Larga Distancia-Modulo IV*. 2009. Comité de Infectología Crítica. La Plata, Argentina.

19. Loayza, C.; 2009. Producción de Betalactamasas Clásicas y De Espectro Ampliado en *Escherichia coli* aislados en pacientes atendidos en el Laboratorio de Análisis Clínicos "Loayza" Chota, Cajamarca-Perú. 2008. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo.
20. Zavala, E. Correlación entre producción de betalactamasas de espectro extendido en urocultivos y la multirresistencia antibiótica en el H.C.F.A.P. Julio 2005 - Diciembre 2006. Tesis para optar el grado de Maestro en Medicina con mención en Medicina Interna USMP.
21. Mandell G, Bennett J. Principles and practice of infectious diseases. 2005 2: 2567-2586.
22. Fierer, J. And D. Guiney, 2000. Extend Spectrum B-lactamasas: A plaque of plasmids. American Medical Association. 281(6): 563-564.
23. Bou, G., M. Cartelle, et al. (2002). "Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain." J Clin Microbiol 40(11): 4030-6.
24. Galvan F Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú Rev Med Hered. 2016; 27:22-29.
25. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988;10(4):867-78.
26. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2004 Nov; 42(11):4947-55.
27. Reinert RR, Low DE, Rossi XF. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother 2007;60:1018-1029.
28. Sood S, Gupta R. Antibiotic resistance pattern of community acquired uropathogens at a tertiary care hospital in Jaipur, Rajasthan. Indian J. Community Med. 2012;37: 39-44.
29. Pigrau, C. Infecciones del tracto urinario nosocomiales. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015>
30. Arce Z , Alarcón E , Limo J , Llontop J , Valle J Detección de genes SHV y TEM en cepas productoras de Betalactamasas de espectro extendido procedentes de dos centros hospitalarios de Chiclayo-Peru Rev. cuerpo méd. HNAAA 2012 5(3).
31. Morfín-Otero R, et al. Characterization of Enterobacteriaceae isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum b-lactamase. Microb Drug Resist 2013;19:378-383.
32. Diaz J., Amar W., Angulo M, Bustamante Y Prevalencia de *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y otras resistencias en urocultivos en un hospital general de Ica, Perú Rev méd panacea. 2015; 5(1): 20-24.
33. Lee K, LimJK, Yong D, Yum J, Chong Y, Okamoto R, et al. Evaluation of Efficiency of Screening Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Hospitals Where the Bacteria Are Increasingly Prevalent. J Clin Microbiol 2001;39(10):3696-9.
34. Livermore DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):557-84.
35. Rivera, M. et al. Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en Enterobacteriaceae aisladas de reservorios ambientales de un hospital general en Cajamarca, Perú. Rev Med Hered; 2011: 22(2): 69-75.

36. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48: 1-14.
37. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type  $\beta$  -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 2013;303(6-7):305-17. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008.
38. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario en Lima - 2008. INSMINSA, Perú.
39. Zurita, J. 2012. Resistencia Bacteriana en el Ecuador. Centro de Publicaciones PUCE. Quito, Ecuador
40. Castro N, Salgado JFS, Ocampo RLO, Silva J, Ruiz MR. Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. *Tlamati*.2014; 5(1): 14-23.
41. Fernandez A Beta-lactamasas en Enterobacteriaceae: Aspectos genéticos, epidemiológicos, clínicos y biológicos (Tesis doctoral) España Universidad de Coruña Servicio de Microbiología-Instituto de Investigación Biomédica A Coruña 2012.
42. Guzman M Genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Invest Clin* 54(3): 235 - 245, 2013.
43. Kassakian SZ, Mermel LA. Changing epidemiology of infections due to extended spectrum beta-lactamase producing bacteria. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2014;3(1):9. doi: 10.1186/2047-2994-3-9.