Artículo Original

Detección del gen CTX-M en cepas de Escherichia coli productoras de B-lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque; Chiclayo–Perú: Noviembre 2012-Julio 2013

Detection of CTX-M gene of Escherichia coli producing B-lactamase extended spectrum from the Regional Hospital of Lambayeque, Chiclayo, Peru: November 2012-July 2013

Zhandra Arce–Gil[1,a], José Llontop–Nuñez[1,b], Rene Flores–Clavo[2,c], Darwin Fernández–Valverde[2,d]

RESUMEN

Introducción: *Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas. Las cepas que producen Blee en su mayoria enterobacterias, y en particular E. coli son resistentes a todos los antibióticos betalactámicos con la excepción de las Carbapenemes y cefamicinas. El objetivo fue determinar la presencia fenotípica y molecular de BLEE que presenten el gen CTX-M en cepas de E. coli aisladas de urocultivos de pacientes con infecciones urinarias internados o ambulatorios en el Hospital Regional durante el periodo Noviembre 2012 a Julio 2013.* ***Material y Métodos****: Se trabajó con 35 cepas de E. coli a quienes se les hizo el tamizaje de susceptibilidad antimicrobiana por el método fenotípico de Jarlier y las pruebas de identificación bioquímica, posteriormente se detectó la presencia del gen blaCTX-M mediante la prueba molecular de PCR.* ***Resultados:*** *18 (51,4%) de las cepas de E. coli eran productoras de BLEE tipo CTX-M, de éstas, 14 fueron aisladas del sexo femenino y por consulta externa (en áreas de urología, pediatría, nefrología, endocrinología, gastroenterología, ginecología) y 04 de pacientes que estuvieron internados en el Hospital.* ***Conclusiones****: Se reporta la existencia del gen CTX-M en cepas de E. coli aisladas de urocultivo a partir de pacientes ambulatorios mayoritariamente, lo que nos demuestra la existencia de este patógeno a nivel de comunidad, sugiriéndonos un uso indiscriminado de antibióticos en nuestro medio, que nos motiva a realizar más trabajos de este tipo para vigilar el uso correcto de los mismos.*

Palabras clave: *BLEE, E. coli, gen CTX-M (****Fuente:*** *DeCS-BIREME)*

ABSTRACT

Introduction: ESBLs are enzymes that are characterized phenotypically by conferring resistance to penicillins and cephalosporins. The strains Extended-Spectrum B-lactamases producing strains in their most Enterobacteria, in particular E. coli are resistant to all betalactam antibiotics except carbapenems and cephamycins. The Purpose was to determine the phenotypic and molecular presence of ESBL submit the CTX -M gene in strains of E. coli isolated from urine cultures in hospitalized patients with urinary tract infections or outpatient at the Regional Hospital during the period November 2012 to July 2013. **Material and Methods:** We worked with 35 strains of E. coli who were asked antimicrobial susceptibility screening method for Jarlier phenotypic and biochemical identification tests then the presence of blaCTX - M gene was detected by PCR molecular testing. **Results:** 18 (51.4 %) strains of E. coli were producing ESBL CTX -M, of these, 14 were isolated from female and outpatient (in areas of urology, pediatrics, nephrology, endocrinology, gastroenterology , gynecology) and 04 patients who were admitted to the Hospital. **Conclusions:** The CTX -M gene in strains of E. is reported coli isolates from outpatient urine culture mostly patients, which demonstrates the existence of this pathogen at the community level, suggesting indiscriminate use of antibiotics in our environment, which motivates us to do more work of this type to monitor the proper use thereof.

Keywords: ESBL, E. coli, gene CTX-M (**Source:** MesH-NLM)

INTRODUCCIÓN

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son una

1. Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo
2. Hospital Regional Lambayeque
a. Licenciada en Biología.
b. Magister en Ciencias
c. Biólogo
d. Técnico en Laboratorio

familia de enzimas producidas por bacilos gramnegativos, que en su mayoría derivan de las betalactamasas clásicas TEM y SHV a partir de una serie de mutaciones puntuales que alteran su centro activo, como respuesta a la presión ejercida por el amplio uso a la cefalosporinas de tercera generación permitiéndoles modificar su perfil de sustrato, mejorando su capacidad de hidrólisis frente a los betalactámicos. Se han descrito más de 200 ß-lactamasas diferentes, algunas son específicas para penicilinas (penicilinasas) o cefalosporinas (cefalosporinasas), mientras que otras tienen un espectro amplio de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar la mayoría de antibióticos ß- lactámicos. Este último grupo de ß-lactamasas (ß-lactamasas de espectro ampliado [BLEAs]) es problemático porque con frecuencia están codificadas en plásmidos y pueden transferirse de un organismo a otro[1].

Un creciente número de BLEE que no provienen de TEM ni SHV están empezando a ser descritas, estando además codificadas por plásmidos, lo cual les concede la capacidad de transmitir horizontalmente los genes de resistencia[2]. Las CTX-M se caracterizan por su alta capacidad hidrolítica sobre cefalosporinas en especial sobre la cefotaxima y a la ceftriaxona y poca capacidad de hidrolizar la ceftazidima y cefepime[3]. Este genotipo es un buen ejemplo de betalactamasas cromosómicas, encontradas normalmente en especies de "kluyvera", un grupo relativamente raro de patógenos comensales. Estas enzimas no están muy relacionadas con las TEM o SHV, ya que solo muestran un 40% de identidad con las mismas. Se conocen actualmente más de 80 tipos de CTX-M, de las cuales algunas son más activas contra ceftazidina que contra cefotaxima. Además, se han encontrado en cepas de Salmonella enterica serovar typhimurium y en E. coli, pero también han sido descritas en otras especies de enterobacteriaceas y son la BLEE predominante en algunas partes del mundo, hallándose también en Europa del Este, siendo los tipos CTX-M-14, CTX-M-3, y CTX-M-2 los más habituales.

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), Dentro de los métodos moleculares cuando se hacen pruebas genéticas, la vigilancia molecular, se basa en la identificación de genes que codifican los mecanismos de resistencia en las bacterias y que representan el futuro de la vigilancia de resistencia antibiótica.

En el Perú, hay muy pocos estudios, un estudio realizado en niños de comunidades rurales de la selva peruana que no se exponen a antimicrobianos, se determinó que las E. coli comensales en heces presentaban una tasa de resistencia a ceftriaxona de 0,1% (2002) y de 1,7%(2005). Asimismo se determinó la presencia de BLEE tipo CTX-M del grupo 9 (CTX-M-14 y CTX-M-15). En una publicación reciente, se ha mostrado que la producción de BLEE en Klebsiella y E. coli aisladas de hemocultivos de nueve hospitales de Lima durante el 2008-2009 fue de 75,1 % y 76,8 %, respectivamente. Ninguna cepa fue resistente a carbapenemes[4].

A nivel de nuestra región sólo se han reportado trabajos para determinar la presencia de los genes TEM Y SHV más no del gen CTX-M 5, y también se han determinado las caracteristicas clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria causada por enterobacterias BLEE 6. Por lo mencionado, es que centramos el presente estudio que tuvo como objetivo determinar la presencia fenotípica y molecular de BLEE que presenten el gen CTX-M en cepas de E. coli aisladas de urocultivos de pacientes con infecciones urinarias internados o ambulatorios en el Hospital Regional Lambayeque.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se desarrolló un estudio Descriptivo transversal. La muestra estuvo constituida por 35 cepas clínicas de E. coli productora de ß-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivos proveniente del laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional Lambayeque-Chiclayo- Perú entre los meses de Noviembre 2012 a Julio del 2013.

METODOLOGÍA

Aislamiento de bacterias: Las bacterias fueron obtenidas de 64 muestras de urocultivo positivo para E. coli en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional de Lambayeque durante el periodo Noviembre 2012 Julio del 2013. Las cuales fueron sometidas a pruebas de tamizaje y confirmación para verificar previamente la viabilidad de las cepas. 35 muestras del total dieron positivas a las pruebas bioquímicas según el manual del INS (2002)[7]. El medio final en el cual fueron conservadas fue TSA (Agar Tripticasa Soya); para su posterior diagnóstico fenotípico Blee.

Test de susceptibilidad: Las cepas fueron tamizadas a travez del método de disco de difusión; que presentaron los halos de inhibición para las cepas BLEE sospechosas, usando los siguientes discos de antibióticos Aztreonam (30 ug) ≤ 27 mm, Cefotaxima (30 ug) ≤ 27 mm, Ceftazidima (30 ug) ≤ 22 mm y Ceftriaxona (30 ug) ≤ 25 mm según el (CLSI); que luego fueron confirmadas por el método de Jarlier (Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología)[8]. La presencia de BLEE fue manifestado por el efecto sinérgico del inhibidor Amoxicilina/ácido clavulámico (AMC) (20/10mcg) en el centro de una placa petri con agar Müeller Hinton y alrededor a 25mm de distancia, y los discos de Ceftazidima, CAZ (30mcg); Cefepime, CPM (30mcg); Ceftriaxona, CRO (30mcg) y Aztreonam/Monobactam ATM(30ug) a las 24 horas se observaron las siguientes características en las placas de cultivo (efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano) Y finalmente se registraron 35 cepas que cumplían con las condiciones para ser BLEE fenotípicamente positivas (Figura Nº01)[9,10].

Figura Nº01. Test de confirmación fenotípico BLEE método de Jarlier (CLSI)

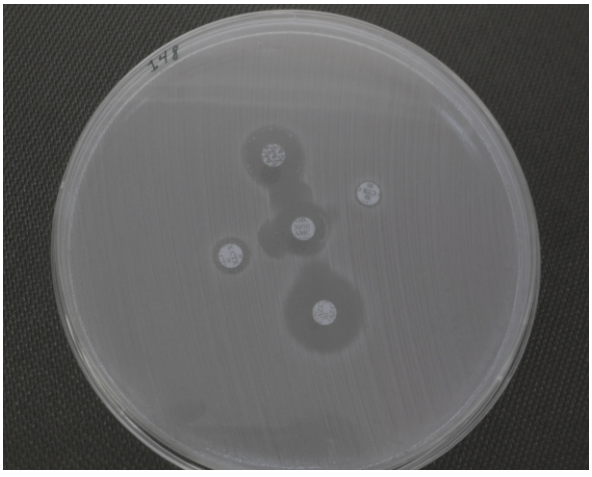

Tabla Nº01. Zonas de Inhibición para detectar posibles BLEE en Escherichia coli (CLSI)[8].

Antibiótico	Zona de inhibición para cepas sensibles	Zona de inhibición con posible producción de BLEE
AZTREONAM	≥ 22mm	≤ 27mm
CEFOTAXIMA	≥ 23mm	≤ 27mm
CEFTRIAXONA	≥ 21mm	≤ 25mm
CEFTAZIDIMA	≥ 18mm	≤ 22mm

Extracción de ADN: La extracción de ADN de todas las cepas de E. coli fue realizado con el Kit Pure Link Genomic DNA según el protocolo de purificación rápida de ADN de Invitrogen para muestras bacterianas. El ADN extraído fue guardado de – 2°C hasta su posterior uso.

Reacción en cadena de la polimerasa: La amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes blaCTX-M fue realizado con los oligonucleótidos: CTXM-1 (5´-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA3').
CTX-M-2 (5´CGATATCGTTGGTGGTGCCAT3').
Siguiendo las recomendaciones descritas por Castro y otros.11 La mezcla de reacción fue ajustada a un volumen final de 50 mL según las condiciones descritas en el protocolo Fast Start Taq DNA Polymerase, dNT Pack de Roche: 25,6 mL agua PCR; 5 mL de buffer PCR 10x, 4 mL 25mM MgCl2, 1mL del mix de nucleótidos grado PCR; 5 mL cebador TEM-1, 5 mL del cebador TEM-2; 0,4 mL de Fast Start Taq DNA polimerasa (ROCHE) y 4 mL del ADN extraído previamente de cada cepa bacteriana. Las RCP fueron realizados en un termociclador Verita Thermal Cycler (Applied Biosystems), bajo las condiciones siguientes: 1 ciclo de 4 min de pre-desnaturalización a 95 °C; 60 s de hibridación a 52 °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 5 min a 72 °C y un tiempo infinito a 4°C. El producto de amplificación fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % (Promega Corporation, USA). El gel teñido con bromuro de Etidio (1,0 mg/mL) fue examinado a través de un transiluminador Biorad Pharos FX Plus® y editado con el programa Quantity one® (Figura Nº02). Se verificó el tamaño del ADN amplificado (544pb) usando un marcador de peso molecular de 100 pb. La corrida electroforética fue llevada a cabo a 100 V por 45-60 minutos.

RESULTADOS

Figura Nº02. Geles de agarosa mostrando el gen blaCTX-M de 544pb de 35 cepas analizadas A). 18 cepas de E. coli BLEE y el carril 1; 10 Ladder 1 Kb B). 17 cepas de E. coli BLEE, carril 1; 10 Ladder 1 Kb y carril 20 control negativo.

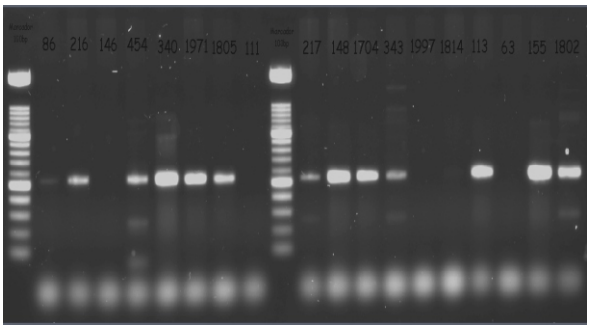

Fig 2A. Amplificación por PCR del gen blaCTX-M de 18 cepas de E. coli

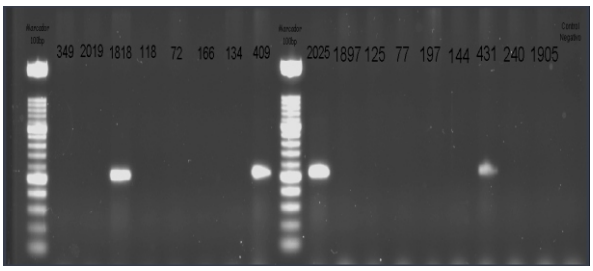

Fig 2B. Amplificación por PCR del gen blaCTX-M de 17 cepas de E. coli.

De las 35 cepas aisladas de urocultivo procedentes del Hospital Regional Lambayeque entre los meses de Noviembre 2012 a Julio 2013, resultaron 18 (51,4%) cepas positivas a la presencia del gen CTX-M con la técnica de PCR. (Figura 2A, 2B)

De las 18 cepas positivas, 14 fueron aisladas del sexo femenino, siendo 14 de consulta externa (en áreas de urología, pediatría, nefrología, endocrinología, gastroenterología, ginecología) y 04 de pacientes que estuvieron internados en el Hospital como se puede observar en la Tabla Nº02.

Tabla Nº02: Características de las muestras de urocultivo según sexo, edad, presencia de CTX-M y área de ingreso del Hospital Regional Lambayeque. Noviembre 2012-JULIO 2013.

Características	N=35
Sexo	
Femenino	24
Grupo Etáreo	
< 1 año	2
1 a 18 años	3
19 a 40 años	9
40 a 65 años	11
> 65 años	10
CTX-M	
SI	18
Servicio	
Emergencia	9
Ginecología	7
Nefrología	6
Urología	5
Medicina Interna	2
Otros	6

Aspectos éticos: todas las cepas fueron trabajadas en cabina de Bioseguridad. Se solicitó el permiso respectivo a las autoridades del hospital para trabajar con dichas cepas y tener acceso a la base de registro de las mismas, guardando la confidencialidad de los datos.

DISCUSIÓN

El presente estudio se inició realizando una caracterización fenotípica de las cepas de E. coli obtenidas de urocultivos, lográndose establecer una divergencia amplia para el gen CTX-M de las 35 cepas estudiadas provenientes del Hospital Regional Lambayeque.

Las resistencias de las 35 cepas trabajadas fueron manifestadas por el efecto sinérgico del inhibidor Amoxicilina/ácido clavulámico a los antibióticos ceftazidima, Aztreonam, amoxicilina-ácido clavulámico, cefotaxima, siendo reportadas como cepas Blee. Desde el punto de vista genotípico sólo 18 cepas fueron positivas a la presencia del gen CTX-M, indicándonos que el resto de cepas tendrían otro tipo

de gen que las hace resistente a los Betalactámicos.
Se constituye así en un problema a nivel mundial que supone mayor sufrimiento humano, pérdida en la productividad y mortalidad. La relación antibiótico-bacteria se ve alterada por otros múltiples factores como la farmacocinética de la droga, la dosis, la duración del tratamiento, el tamaño de inóculo bacteriano, etc. Por lo que para optimizar el uso de estos fármacos, se realizan supervisiones periódicas de la resistencia como parte transcendental de la política de control de la resistencia antibiótica[12,13].

Dada la creciente resistencia antibiótica en E. coli y su impacto actual a nivel mundial, así como el creciente número de publicaciones sobre resistencia antibiótica a nivel nacional, consideramos de importancia revisar los principales mecanismos moleculares de resistencia en las E. coli con la finalidad de proporcionar a los microbiólogos, biólogos, médicos, epidemiólogos y demás personas del área biomédica, información actualizada y resumida sobre estos mecanismos para poder así conocer e interpretar mejor este problema en la literatura médica[14].

En los últimos años se ha descrito la creciente importancia clínica en Enterobacterias de la familia CTX-M[15], un grupo de betalactamasas de espectro extendido que afecta la actividad de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, especialmente Cefotaxima, Ceftriaxona; Aztreonam (Baraniak 2002). Un ejemplo de la emergencia de estas betalactamasas CTX-M es un estudio realizado en 32 cepas de E. coli BLEE resistentes a cefalosporinas aisladas de pacientes pediátricos hospitalizados en Túnez, se informó una frecuencia del 97 % de blaCTX-M-15[16]. Las infecciones por E. coli con BLEE han experimentado importantes cambios epidemiológicos en los últimos tiempos y actualmente la atención se centra en el aumento de infecciones y colonizaciones en pacientes procedentes de la comunidad, sobre todo en relación con instituciones sanitarias, y la mayor incidencia de las CTX-M frente a otros tipos de BLEE. En las infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad han sido las BLEE CTX-M las que tienen incidencia, y son endémicas de América Latina y el primer reporte se dio en Perú[17].

En nuestro estudio la mayoría de cepas proceden de pacientes de consulta externa, del sexo femenino; siendo un 74,8% niños y adultos mayores. Esto refuerza la idea de que este tipo de cepas BLEE son adquiridas en la comunidad.
Este hecho demuestra la necesidad de desarrollar nuevas y mejores estrategias como es en este caso la secuenciación de genes para la búsqueda de nuevas biomoléculas encaminadas hacia la creación de medicamentos mucho más específicos; además que nos ayuda a conocer sus mecanismos de resistencia, la capacidad que tienen para diseminarse a microorganismos de otra especie, además de escoger el tratamiento adecuado y así no generaremos nuevas resistencias a corto plazo. Según García y otros; nos plantea una pregunta que no debemos dejar de tener presente ¿Qué podemos hacer en nuestros hospitales en los que más del 70 % Enterobacterias que causan bacteriemia son productoras de BLEE?[18].

Las limitaciones del presente estudio fue el corto presupuesto para la realización de las pruebas moleculares que restringieron el trabajo no permitiendo trabajar con mayor número de cepas.

Conflicto de Interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Álvarez D. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. 2010. Rev. Científica Medica de la Habana v.9 n.4.
2 Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller Metabolismo y genética de las bacterias. Microbiología Médica 6aEd. Elsevier-España.2009:23-38.
3 Enterobacteriacea: Hospital prevalence and susceptibility patters. Rev Infect Dis.1988; 10(4):867-78.
4 Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal Escherichia coli isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. Antimicrob Agents Chemother. 2007.
5 Arce Z, Alarcón E, Limo J, Llontop J, Valle J. Detección de genes SHV y TEM en cepas de Escherichia coli productoras de ß lactamasas de espectro extendido procedentes de dos centros hospitalarios de Chiclayo- Perú.2011.Rev del Cuerpo Médico HNAAA 5(3)
6 Escalante J, Síme A, Diaz C. Caracteristicas clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido. Rev. Perú Epidemiol.2013(17)
7 Calderon ER, Yagui MM, Sacsaquispe CR. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el Método de Difusión de disco. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2002.
8 Clinical and Laboratory Standars Institute. Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First Informatonial Suplement. CLSI document M100-S21.2011 31(1):48-49.
9 Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M y col. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. Rev Arg Microb. 2005; 37(1):57-66.
10 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.
11 Castro N, Damaris E, Moreno M, Alarcón L. Caracterización molecular de ß lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de Escherichia coli. 2008 Enf Inf Microbiol 28(3): 114-120
12 Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Rev Panam Salud Pública. 2001; 10:284-93.
13 Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance. Nat Rev Microbiol. 2010,8(4):260-71.
14 Mosquito S, Ruiz J, Bauer J, Theresa J. Ochoa. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a Diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011; 28(4):648-56.
15 Réjiba S, Mercuri PS, Power P, Kechrid A. Emergence and dominance of CTX-M-15 extended spectrum betalactamase among Escherichia coli isolates from children. Microb Drug Resist. 2011;17(2):135-40
16 Luz E. Ochoa Sanchez. Análisis de ß lactamasas de espectro extendido. Tesis, Xalapa- Veracruz- Mexico.2008
17 Bryan L.E. Antimicrobial Drug Ristance. Editorial Harcout Brace Jovanovich, Publishers Pags. 1-100
18 García C, Astocondor L, Banda C. Enterobacterias productoras de ß lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú.2012. Acta Med Per 29(3)

Correspondencia:
Rene Flores Clavo
Dirección: Área de Investigación del Hospital Regional Lambayeque. Lab. Biología Molecular
Correo: paloma3186@yahoo.com

Revisión de pares:
Recibido: 10/08/2013
Aceptado: 15/11/2013