



ARTICULO ORIGINAL

Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos

Determination of genes encoding beta-lactamase resistance spread spectrum Gram negative bacteria isolated from urine cultures

Determinação de genes que codificam resistência a Beta-lactamasas deespectro estendido em Bacilos negativos isolados de urocultura

**Diana Paola López^{1*}, Maria Inés Torres¹, Luz Maribel Castañeda²,
Carlos Fernando Prada¹**

¹ Grupo de investigación de Bacteriología y Laboratorio Clínico (GRIB), Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia

² Hospital Regional de Chiquinquirá, Chiquinquirá, Colombia

***Correspondencia:** Dirección: Carrera 2a Este N° 64-169 Tunja, Colombia Tel: 3213530671

Correo electrónico: gribac@uniboyaca.edu.co

..... **Fecha de recibido:** 02-16-2015

..... **Fecha de aceptación:** 04-07-2016

Citar este artículo así:

López DP, Torres MI, Castañeda LM, Prada-Quiroga CF. Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. Revista Investig Salud Univ Boyacá. 2016;3(2):107-126

RESUMEN

Introducción. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son un grupo de enzimas que confieren resistencia bacteriana a un amplio espectro de antibióticos betalactámicos codificados en plásmidos y que deben estudiarse como herramientas de vigilancia del comportamiento de microorganismos frente al uso de antibióticos.

Objetivo. Determinar los genes que codifican la resistencia en bacilos gramnegativos con fenotipo BLEE aislados de urocultivos, en una institución prestadora de servicios de salud del departamento de Boyacá.

Métodos. Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal. Se identificaron 19 cepas resistentes con fenotipo BLEE, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S23), y se estableció el índice de concordancia para la identificación microbiológica. Por medio de la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se determinó la presencia de los genes blaTEM, blaSHV, blaCTX y Amp-C en estas 19 cepas.

Resultados. Se encontró que las 19 cepas con fenotipo BLEE (100 %) presentaban resistencia a la ampicilina; 12 (63,2 %) a la ampicilina-sulbactam; 17 (89,5 %) a la cefalotina; 16 (84,2 %) a la cefuroxima; 17 (89,5%) a la cefotaxima; 17 (89,5 %) a la ceftriaxona y 14 (73,7%) al cefepime. En 18 aislamientos se hizo amplificación de los genes, de los cuales 12 (61,11 %) posiblemente presentaron el gen blaCTX; 10 (55,6 %) el gen AmpC; 9 (50 %) el gen blaSHV y 7 (38,88 %) el gen blaTEM.

Conclusión. La presencia de los genes blaCTX, AmpC, blaSHV y blaTEM presenta importancia epidemiológica, probablemente por la capacidad para movilizar la información genética de la resistencia en el ambiente hospitalario, donde tienen un claro potencial epidémico.

Palabras clave: antibiótico, farmacorresistencia bacteriana, betalactamasa.

ABSTRACT

Introduction: Extended spectrum beta lactamases (ESBL) are a group of enzymes that confers bacterial resistance to a wide spectrum of betalactam antibiotics. These are coded in plasmids and should be studied as surveillance tools to watch the behavior of microorganisms towards the use of antibiotics.

Objective: To determine the resistance coding genes in gram-negative bacilli with ESBL phenotype isolated from urine cultures, in a health services institution in the department of Boyacá.

Methods: An observational, descriptive, cross-sectional study was carried out. Nineteen different strains with ESBL phenotype were identified, by following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S23) guidelines; and the microbiological identification concordance index was established. Through polymerase chain reaction (PCR) technique standardization, the presence of blaTEM, blaSHV, blaCTX, and Amp-C genes was determined for the 19 strains mentioned.

Results: All of the nineteen strains with ESBL phenotype (100%) were found to be resistant to ampiciline; 12 (63,2%) resistant to ampicilin sulbactam; 17 (89,5%) to cephalothin; 16 (84,2 %) to cefuroxime; 17 (89,5%) to cefotaxime; 17 (89,5%) to ceftriaxione, and 14 (73,7%) to cefepime. Gene amplification was performed on 18 isolates, 12 (61,11%) of them possibly presented the blaCTX gene; 10 (55,6%) the AmpC gene; 9 (50 %) the blaSHV gene, and 7 (38,88%) the blaTEM gene.

Conclusion: The presence of blaCTX, AmpC, blaSHV, and blaTEM genes represents epidemiological importance, probably because of its capacity to mobilize genetic resistance information inside the hospitalary environment in which they have a clear epidemic potential.

Keywords: Antibiotics, bacterial drug resistance, betalactamase.

RESUMO

Introdução: As Beta-lactamases de espectro estendido (BLEE) são um grupo de enzimas que conferem resistência bacteriana aos antimicrobianos beta-lactâmicos, os quais estão codificados em plasmídeos e que devem ser estudados como ferramenta de vigilância no comportamento dos microrganismos contra os antibióticos.

Objetivo: Determinar os genes que codificam resistência em bacilos Gram negativos com fenótipo BLEE isolados de uroculturas, em uma instituição de serviços públicos de Saúde no Departamento de Boyacá.

Métodos: Foi realizado um estudo observacional descritivo de coorte transversal, foram identificadas 19 linhagens resistentes com fenótipo BLEE acorde com os lineamentos de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S23), o índice de concordância foi estabelecido. A determinação da presença dos genes blaTEM, blaSHV, blaCTX y Amp-C nas 19 linhagens foi realizada através da padronização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Resultados: Verificou-se que as 19 linhagens com fenótipo BLEE apresentaram resistência à ampicilina; 12 (63,2%) à ampicilina-sulbactam; 17 (89,5 %) à cefalotina; 16 (84,2 %) à cefuroxima; 17 (89,5%) à cefotaxima; 17 (89,5 %) à ceftriaxona e 14 (73,7%) à cefepime. A amplificação dos genes foi realizada em 18 linhagens, das quais possivelmente 12 (61,11 %) apresentaram o gene blaCTX; 10 (55,6 %) o gene AmpC; 9 (50 %) o gene blaSHV e 7 (38,88 %) o gene blaTEM.

Conclusão: A presença dos genes blaCTX, AmpC, blaSHV y blaTEM é de importância epidemiológica devido à capacidade de mobilizar a informação genética que codifica à resistência em ambientes hospitalares onde possuem um potencial epidêmico.

Palavras chave: antibiótico, farmacoresistência bacteriana, beta-lactamases.

INTRODUCCIÓN

Antes de que apareciera la penicilina en la década de los 40, las enfermedades infecciosas eran la principal causa de muerte del ser humano, y lo siguen siendo en gran parte del mundo. A lo largo de la historia, se ha visto un aumento significativo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, efecto que ha ocasionado gran preocupación por ser un obstáculo para el tratamiento de agentes infecciosos y es de gran interés por el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

La resistencia no suele ser un problema de patogénesis, sino de limitación de las opciones terapéuticas; se depende de los antimicrobianos para tratar las infecciones, práctica asistencial caracterizada por el uso excesivo en enfermedades en las que no aportan beneficios (1). Esta resistencia se ha asociado con el retraso en el inicio del tratamiento antibiótico apropiado y con la estancia prolongada en los centros hospitalarios, la cual aumenta los costos; además, parece ser la responsable directa del aumento en las tasas de mortalidad en pacientes con infecciones por microorganismos resistentes, lo cual genera un grave problema en salud pública que requiere del máximo esfuerzo de todas las instituciones gubernamentales para garantizar su control (2, 3).

El comportamiento epidemiológico de los brotes por bacterias multirresistentes puede estar

asociado a múltiples factores y su estudio tiene importancia para tomar decisiones en el manejo del paciente infectado. Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son un grupo de enzimas que confieren resistencia bacteriana a un amplio espectro de antibióticos betalactámicos, codificadas en plásmidos, los cuales permiten a la bacteria hidrolizar penicilinas, oximinocefalosporinas y monobactámicos, y surgen principalmente debido a mutaciones en los genes blaSHV, blaTEM y blaCTX-M. Como resultado, se han identificado cerca de 300 variantes naturales de estos genes que codifican para el fenotipo BLEE, tales como los genes TEM, SHV, CTX-M y OXA (4-6).

En estudios sobre resistencia bacteriana se ha encontrado que existe una relación directa entre la resistencia bacteriana y el consumo de los antibióticos, reflejada en el aumento o en la disminución de la resistencia con el aumento o la disminución de su consumo (7-10).

La adquisición de genes que codifican la resistencia en las bacterias se ha acelerado por el incremento de las necesidades adaptativas y de presión selectiva de las bacterias, específicamente el uso de los antibióticos en el control de infecciones en medicina, veterinaria, agricultura y nutrición animal (11). La huella de la transferencia corresponde a la existencia de un gen o secuencia en el árbol filogenético del organismo y a la observación de la misma disposición génica en

la población bacteriana donadora y receptora. El mecanismo más probable de transferencia entre especies poco relacionadas es la conjugación, en la que participan moléculas genéticas móviles, como los plásmidos, bacteriófagos, transposones, integrones y casetes, que transportan genes responsables de la codificación de funciones para su propia transferencia o para otras como la resistencia bacteriana (12-14).

Las infecciones de las vías urinarias son el grupo de infecciones bacterianas más frecuentes; se estima que son responsables del 38 % de las infecciones intrahospitalarias y del 80 % de las relacionadas con la sonda transuretral (15). La aparición de microorganismos causantes de infección urinaria que son resistentes a diferentes antibióticos, constituye un importante problema terapéutico que requiere estudiar su evolución en el tiempo para instaurar un tratamiento empírico adecuado (16). La presencia de microorganismos multirresistentes es cada vez más usual y, actualmente, la atención se centra en el aumento de infecciones y migraciones en pacientes provenientes de la comunidad; por ejemplo, en Madrid la frecuencia es de 3,7 %; en Cuba, de 20 %, y en Colombia, de 12,3% (6).

En Colombia se propuso implementar la vigilancia de tal manera que permitiera abordar el problema desde diferentes perspectivas relacionadas con el aumento de la resistencia bacteriana; entre ellas,

sobresalen las relacionadas con infecciones por dispositivos, consumo de antibióticos, elevada carga de infecciones y uso inapropiado de antimicrobianos en los hospitales (17).

Teniendo en cuenta lo mencionado, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de los genes que codifican la resistencia en bacilos Gram negativos aislados de urocultivo, en una institución prestadora de servicios de salud del departamento de Boyacá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal, para el cual se analizaron 19 cepas, obtenidas del laboratorio clínico de la institución en donde se realizaron el procesamiento de la muestra, los cultivos primarios, la identificación de género y especie, y la determinación de los perfiles de sensibilidad y el fenotipo de la resistencia. Las cepas resistentes fueron remitidas al laboratorio de la Universidad de Boyacá, en donde se confirmó la identificación y el fenotipo de la resistencia de acuerdo con la guía CLSI M100-S23 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); se hizo el análisis molecular de la presencia de los genes que codifican para resistencia del fenotipo BLEE.

Se incluyeron todos los bacilos Gram negativos con fenotipo de resistencia BLEE aislados de

urocultivos, durante los meses de febrero a agosto del año 2015. No se tuvo acceso a las historias clínicas ni a la información de los pacientes. La identificación bacteriana en laboratorio clínico de la institución hospitalaria se hizo mediante el sistema de tarjeta GN 21341 (método automatizado) y, las pruebas de sensibilidad, por el sistema de AST N271 (equipo Vitek® 2 compact 15, Biomeriëux Ltda.); además, se determinó el fenotipo de la resistencia de tipo BLEE.

En el laboratorio de la Universidad de Boyacá se hizo la confirmación microbiológica del género y la especie de las 19 cepas con el sistema BBL Crystal®, la determinación molecular por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pruebas de sensibilidad. El método de Kirby Bauer para determinar la sensibilidad se desarrolló siguiendo los estándares del CLSI, utilizando la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como control positivo y la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo. Los sensibilizadores empleados fueron cefotaxime (CTX30), ceftazidime (CAZ30), cefepime (FEP30), ceftriaxona y aztreonam (ATM30); se llevaron a incubación por 24 horas a 37 °C y se confirmó el fenotipo de resistencia con el test de sinergia de doble disco, utilizando cefotaxime-ácido clavulánico (CTXCLA), cefotaxime (CTX) y ceftazidime-ácido clavulánico (CAZCLA) y ceftazidime. Se consideró como resultado positivo la diferencia mayor o igual de 5 mm en el halo de la cefalosporina en combinación con el ácido

clavulánico, en comparación con la cefalosporina sola, o por la observación del efecto sinérgico (18).

Para el proceso de extracción y purificación de ADN, se utilizó el kit de Promega, Wizard Genomic DNA Purification, en el que se modificó el volumen de la solución rehidratante (30 µl) de ADN para aumentar la concentración. Se midió la concentración de ácidos nucleicos en el equipo Nanodrop de marca Maestrogen a una absorbancia de 260 nm. El ADN usado tuvo una concentración de $\geq 100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la relación de ADN-proteínas A260/280 para evaluar la pureza de las muestras considerándose una pureza óptima con radio entre 1,8 a 2,0 y se conservó a -20°C.

Para el análisis molecular se procesaron 18 cepas, teniendo en cuenta que una extracción de ADN no cumplió con las condiciones de concentración y relación entre ADN y proteínas. La amplificación de los genes blaTEM, blaSHV, blaCTX y Amp-C, se llevó a cabo de acuerdo con la modificación del protocolo de Paterson, et al. (19) (tabla 1). Como control positivo se usó la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 que contiene los cuatro genes, y como control negativo, *E. coli* ATCC 25922. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Labocom.

Tabla 1. Condiciones de la PCR para amplificación de los genes que codifican para la resistencia en cepas con BLEE

GEN	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	DN	CS	ALIN.	EXT.	EF
blaTEM	5'-AAACGCTGGTCAAAGTA 3' 5'-AGCGATCTGTCTAT 3'	700	94 °C, 30 segundos	35	49 °C, 1 minuto	72 °C 1 minuto	72 °C 10 minutos
blaSHV	5' ATGCGTTATATTCGCCTGTG 3' 5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA 3'	700	94 °C, 30 segundos	35	56 °C	72 °C 1 minuto	72 °C 10 minutos
blaC- TX-M1	5'-GACGATGCTACTGGCTGAGC 3' 5'-AGCCGCCGACGCTAATACA 3'	500	94 °C, 30 segundos	35	58°C	72 °C 1 minuto	72 °C 10 minutos
Amp-C	5'-ATCAAACTGGCAGCCG-3' 5'-GAGCCCGTTTTATGCACCCA-3'	550	94 °C, 30 segundos	35	56,9°C	72 °C 1 minuto	72 °C 10 minutos

DN: desnaturalización inicial; CS: ciclos; Alin.: alineamiento; Ext.: extensión; EF: extensión final

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con TAE al 1% y Safeview classic como colorante. Los geles se visualizaron utilizando el transiluminador Ultra Slim Led Illuminator. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb ABM® y la lectura se hizo registrando la presencia o la ausencia de las bandas de las muestras comparadas con el tamaño de los controles positivos: 700 pb para el gen blaTEM y el blaSHV, 500 pb para el gen blaCTX y 550pb para el gen Amp-C.

Se hizo un análisis descriptivo determinando las frecuencias absolutas y relativas, utilizando la

hoja de cálculo de Excel 2013 y SPSS®, versión 24, y se estableció el índice de concordancia.

El estudio se clasificó como investigación sin riesgo, de acuerdo con la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, y fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Boyacá; se manejó información codificada y solo se obtuvo acceso a los datos de muestra y servicio.

RESULTADOS

De febrero a agosto del 2015, se procesaron 1.293 cultivos. Del total, el 69,37 % (n=897) fueron

cultivos negativos para gérmenes comunes y, el 60,63 % (n=396), cultivos positivos para gérmenes comunes; de estos últimos, el 8,84 % (n=35/396) fueron Gram positivos y, el 91,16 % (n=361/396), Gram negativos. De los microorganismos Gram negativos, el 46,96 % (n=186) correspondía al servicio de urgencias; 27,02 % (n=107), a consulta externa; 14,14% (n=56) a urgencias pediátricas, y 4,29 % (n=17), a otros servicios; en este último grupo, se incluyeron aquellas solicitudes que no fueron específicas debido al tránsito en los pacientes por diferentes servicios: 4,04 % (n=16) en cirugía; 2,52 % (n=10) en hospitalización y el 1,01% (n=4) en ginecología.

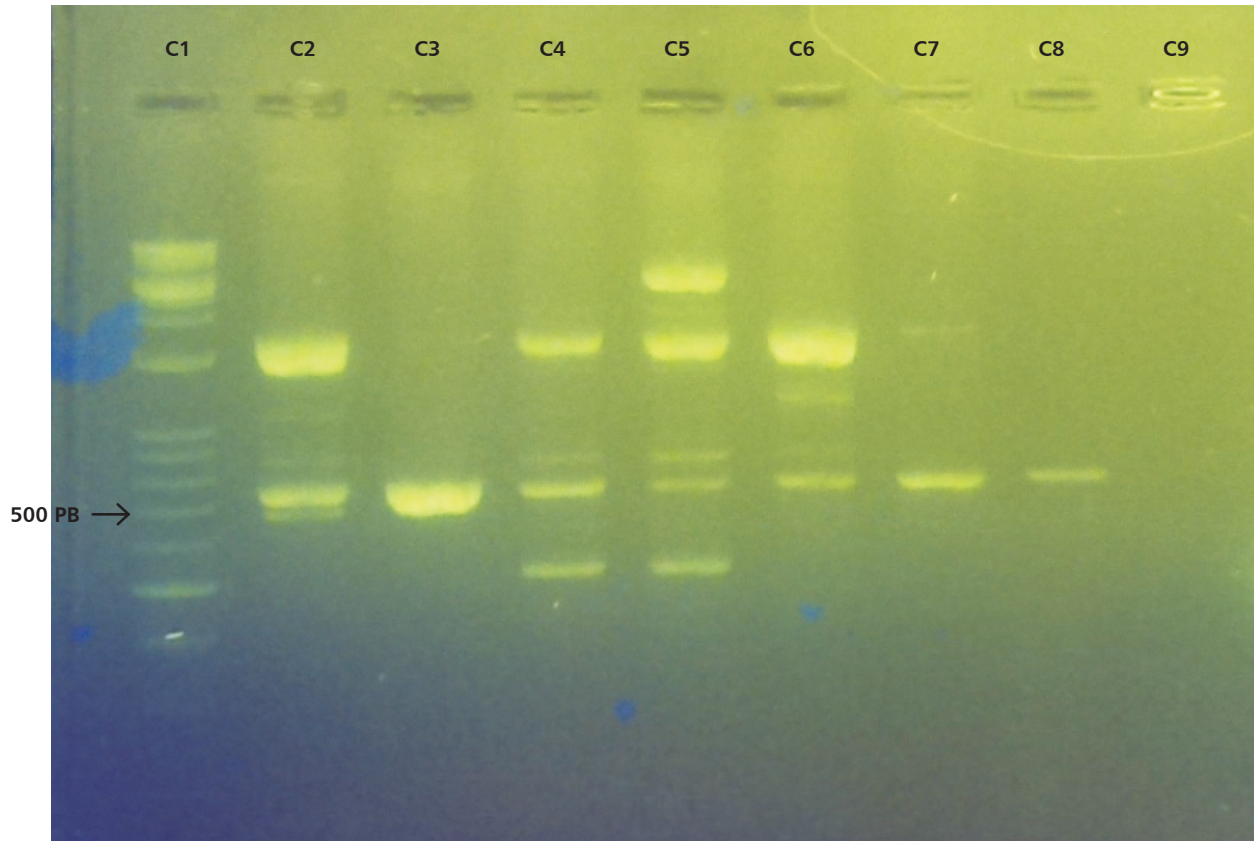
Al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Boyacá se enviaron 19 cepas que tenían el fenotipo BLEE, en las cuales se hizo la confirmación microbiológica del género y la especie. La concordancia entre los dos métodos, Vitek® y BBL Crystal®, fue muy buena; para el género y la especie fue de 94,7 %, con un índice kappa de 0,99, y para el fenotipo de resistencia fue de 100 %, con un índice kappa de 1. La cepa en la cual no se obtuvieron resultados similares en los laboratorios correspondió a la reportada como *Serratia marcescens* y, en el Laboratorio de Análisis Microbiológico de la Universidad de Boyacá, se identificó como *Stenotrophomonas maltophilia*. El microorganismo más prevalente fue *E. coli*,

78,94 % (n=15), seguido por *K. pneumoniae*, 10,52 % (n=2), *Pseudomonas aeruginosa*, 5,26 % (n=1) y *S. maltophilia*, 5,26 % (n=1).

Los perfiles de sensibilidad de los aislamientos reportaron resistencia a ampicilina de 100% (n=19/19); a ampicilina-sulbactam, de 63,2% (12/19); a cefalotina, de 89,5 % (n=17/19); a cefuroxima, de 84,2 % (n=16/19); a cefotaxima, de 89,5 % (n=17/19); a ceftriaxona, de 89,5 % (n=17/19), y a cefepime, de 73,7 % (n=14/19).

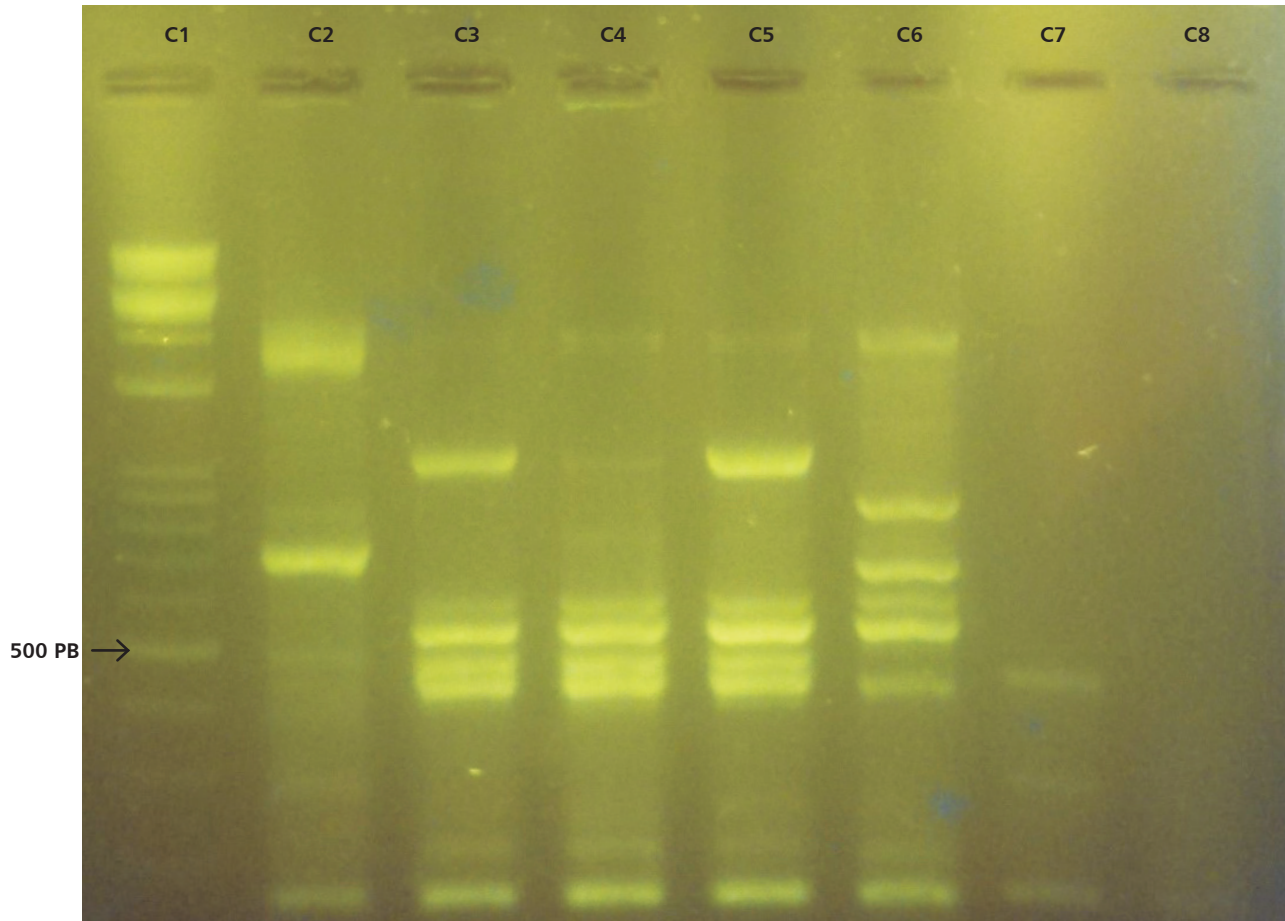
Respecto a la determinación de genes que codifican para la resistencia del fenotipo BLEE, hubo 61,11 % (n=12) de fragmentos con el tamaño esperado para el gen blaCTX (figura 1); 55,6 % (n=10) para el del gen AmpC (figura 2); 50 % (n=9) para el del gen blaSHV (figura 3), y 38,88 % (n=7) para el del gen blaTEM (figura 4). Para cada género y especie, se estableció la presencia de cada gen (tabla 2).

Figura 1. Gel de electroforesis del gen blaCTX



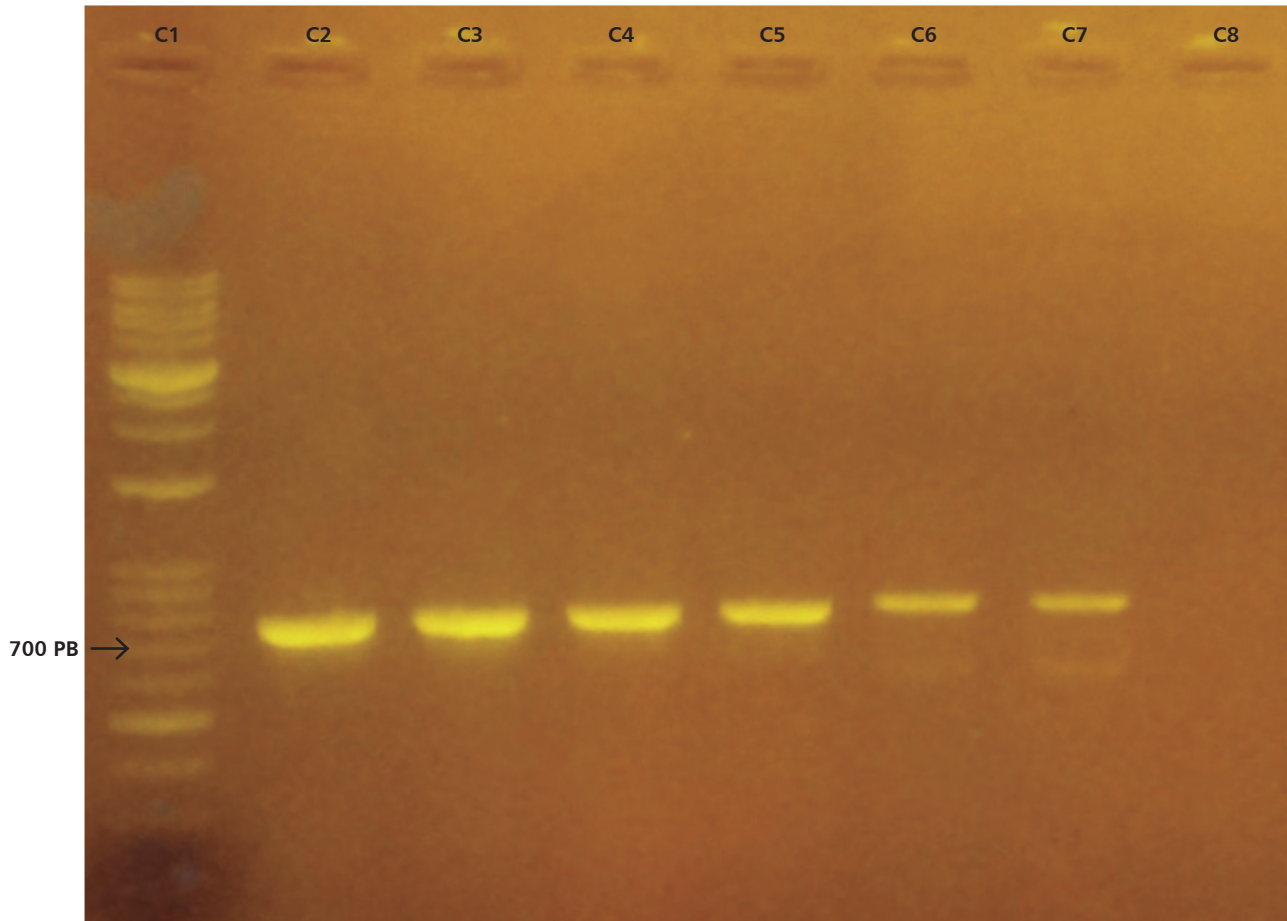
Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (500 pb tamaño del gen); carril 2: control positivo; carril 3: muestra 21 (*E. coli*); carril 4: muestra 26 (*E. coli*); carril 5: muestra 14 (*S. marcescens*); carril 6: muestra 15 (*K. pneumoniae*); carril 7: muestra 16 (*K. pneumoniae*); carril 8: muestra 22 (*E. coli*); carril 9: control negativo.

Figura 2. Gel de electroforesis del gen AmpC



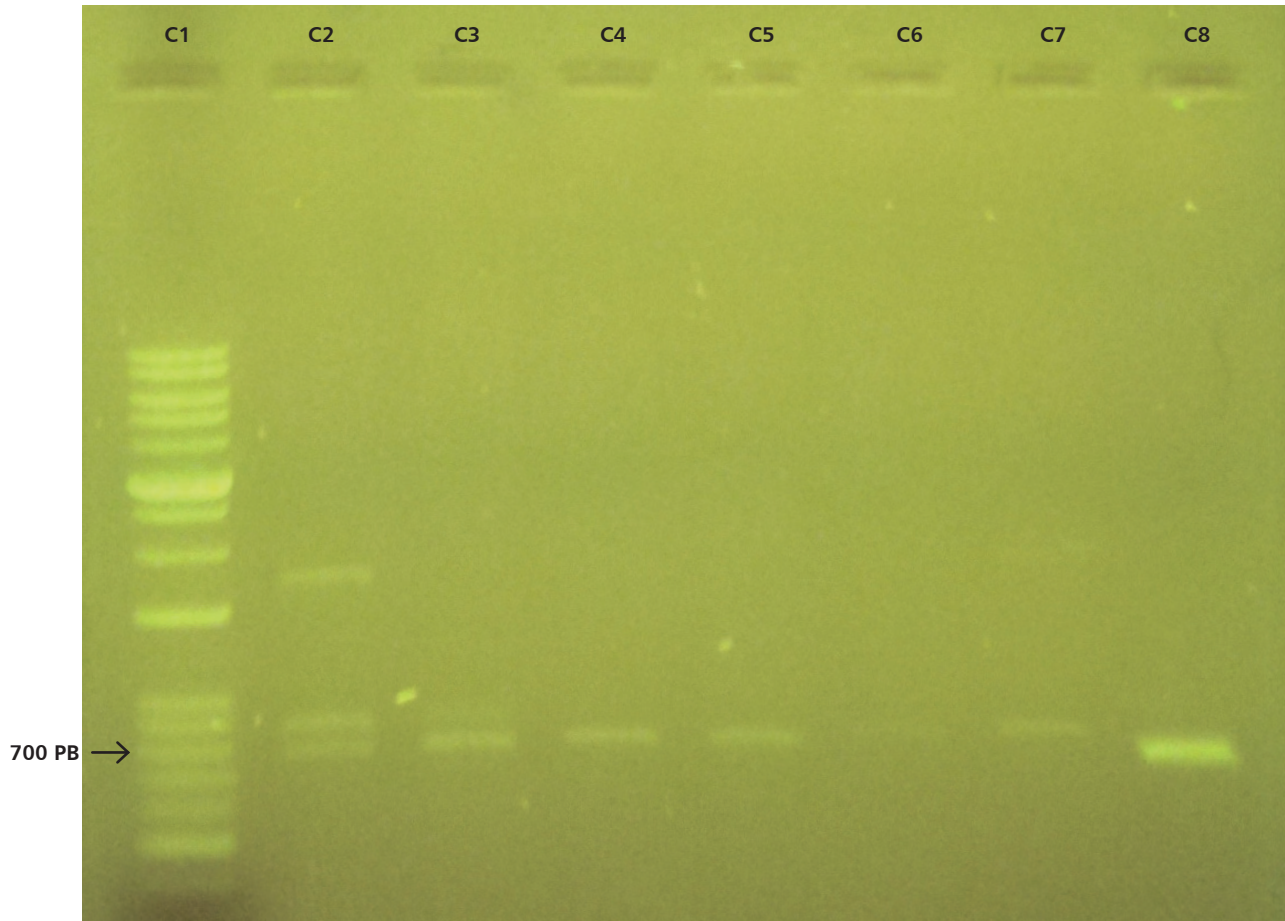
Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (550pb tamaño del gen); carril 2: control positivo; carril 3: muestra 21 (*E. coli*); carril 4: muestra 26 (*E. coli*); carril 5: muestra 14 (*S. marcescens*); carril 6: muestra 15 (*K. pneumoniae*); carril 7: muestra 16 (*K. pneumoniae*); carril 8: control negativo.

Figura 3. Gel de electroforesis del gen blaSHV



Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (700pb tamaño del gen); carril 2: control positivo; carril 3: muestra 13 (*E. coli*); carril 4: muestra 17 (*E. coli*); carril 5: muestra 18 (*E. coli*); carril 6: muestra 19 (*E. coli*); carril 7: muestra 22 (*E. coli*); carril 8: control negativo.

Figura 4. Gel de electroforesis del gen blaTEM



Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (700pb tamaño del gen); carril 2: control positivo; carril 3: muestra 21 (*E. coli*); carril 4: muestra 26 (*E. coli*); carril 5: muestra 14 (*S. marcescens*); carril 6: muestra 15 (*K. pneumoniae*); carril 7: muestra 16 (*K. pneumoniae*); carril 8: muestra 25 (*P. aeruginosa*).

Tabla 2. Determinación de genes que codifican la resistencia en el fenotipo BLEE

	AMP C	bla SHV	bla TEM	bla CTX
AMPLICÓN	550 pb	700 pb	700 pb	500 pb
<i>Escherichia coli</i>	66,7 %	44,4 %	44,4 %	66,7 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,6 %	11,1 %	11,1 %	5,6 %
<i>Stenotrophotomona maltophilia</i>	5,6 %	0%	5,6 %	0%
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	5,6 %	0%	0%	0%

DISCUSIÓN

Las infecciones urinarias constituyen un problema común en la práctica médica diaria, pues producen diferentes síntomas con un comportamiento clínico, terapéutico y pronóstico variado; este se encuentra relacionado con bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido, las cuales adquieren gran importancia en la atención de pacientes ambulatorios por las altas tasas de resistencia bacteriana.

En diferentes estudios, *E. coli* es el uropatógeno con mayor número de aislamientos entre los Gram negativos, seguido por *K. pneumoniae* (20-22), Asimismo, se encontró que el servicio con mayor número de aislamientos fue el de urgencias (55,55 %), seguido del de consulta externa (33,33 %), similar a lo reportado por otros autores (23, 24). Esto sugiere un grave problema, pues el mayor número de microorganismos aislados pro-

vienen de muestras de pacientes ambulatorios, y pone en evidencia la existencia de estos patógenos resistentes en comunidad. En el presente estudio se encontró un gran número de aislamientos de bacterias Gram negativas con el fenotipo de resistencia BLEE; esto indica que es necesario restringir el uso de betalactámicos de amplio espectro e implementar medidas rigurosas de higiene para el control de las infecciones y para prevenir la diseminación de microorganismos productores de betalactamasas.

La concordancia del fenotipo en Gram negativos obtenida en el presente estudio (94,7 %), similar a lo reportado por Robinson, et al., quienes obtuvieron una relación del 95,5 % en la identificación de la especie en bacilos Gram negativos (25). Los resultados también concuerdan con los obtenidos por Jorda, et al., en la identificación bacteriana por Vitek® y el método tradicional: 98,1 % en género y especie, y 99,5 % en género

(26). De igual manera, se estableció una muy buena concordancia entre las dos técnicas según el índice kappa. Sin embargo, se requiere identificar la región ARN 16S, pues esta es una limitación del estudio.

La concordancia de la sensibilidad antimicrobiana fue de 100 % entre el Vitek® y el método de Kirby Bauer, utilizando el test confirmatorio de doble disco descrito por el CLSI (18). En un estudio peruano, el sistema Vitek® demostró tener buena confiabilidad en la detección de distintos mecanismos de resistencia antimicrobiana, como la resistencia a betalactámicos (27).

Las tarjetas del sistema Vitek® poseen paneles fijos de antibióticos, teniendo en cuenta el perfil de sensibilidad de la región. Por esta razón, se desarrollan tarjetas de sensibilidad antimicrobiana con base en la epidemiología local y el surgimiento de nuevos mecanismos de resistencia. La ventaja más notable del sistema automatizado es la rapidez con que se obtienen los resultados (26). Con el sistema Vitek® se evaluaron la ampicilina, la ampicilina/sulbactam, la cefalotina, la cefuroxima, la cefotaxima, la ceftriaxona y el cefepime; se encontró resistencia en el 100 % de las muestras para penicilinas, y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y en el 68 %, para las cefalosporinas de cuarta generación. Esto ejerce una presión importante en las bacterias Gram negativas, que ha generado un problema en Latinoamérica,

pues el 50 % de las infecciones hospitalarias son tratadas con antibióticos betalactámicos y, cerca del 70% de las infecciones adquiridas en la comunidad, con cefalosporinas (20).

En el análisis molecular, en 61,11 % de las cepas se detectó una banda del tamaño correspondiente al gen blaCTX, este porcentaje coincide con los encontrados por otros autores; en el estudio de Gil, et al., el gen blaCTX estuvo presente en el 51, % de las muestras (28) y en el de Arce et al., en el 51,4 % (29). El hallazgo de 55,6 % de cepas con el tamaño de banda esperado para el gen AmpC es de importancia epidemiológica, por su capacidad para movilizarse y transferirse tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad (30). El porcentaje encontrado en el presente estudio de cepas con el gen blaSHV (50 %) fue alto, si se compara por el reportado por Gil, et al. (20 %) (28), y el de cepas con el gen blaTEM (44 %) comparado con el reportado por González, et al. (16 %) (31).

Por otra parte, la amplificación simultánea de AmpC, blaSHV, blaTEM y blaCTX en E. coli resistentes a los antimicrobianos evaluados, en 16,6 % de todos los aislamientos, fue similar a lo reportado por Gaitan, et al. (32). El mecanismo de resistencia por presencia e hiperproducción de betalactamasas posiblemente está relacionado con elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones, que convierten

los genes en funcionales; además, se han generado nuevos conocimientos sobre la transferencia horizontal de genes y que sugieren una amplia distribución en el ambiente natural (33, 34).

En conclusión, las cepas productoras de BLEE representan un grave problema de salud pública, pues cada vez son más limitadas las alternativas terapéuticas, lo cual obliga a reevaluar el tratamiento empírico y desarrollar estrategias de prevención mediante la restricción del uso de agentes antimicrobianos. La presencia de los genes AmpC, blaSHV, blaTEM y blaCTX en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos indica una probable capacidad de movilizarse y transferirse horizontalmente, lo que les confiere un claro potencial epidémico en el ámbito hospitalario y en la comunidad. Sin embargo, es necesario secuenciar las cepas de la presente investigación para identificar nuevos blancos bacterianos, mediante análisis de los genomas, que incluyen la genómica comparativa y la genética molecular.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores expresan su agradecimiento a la Institución Prestadora de Servicios de Salud del departamento de Boyacá y a todas las personas que contribuyeron de una u otra forma en este proyecto.

FINANCIACIÓN

Centro para la investigación y desarrollo CIPADE. Universidad de Boyacá.

REFERENCIAS

1. Vives-Soto M, Difabio M. Tratamiento de las infecciones por enterobacterias. Medicina-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2010;10(51):3432-9.
2. García Castellanos T, Castillo Marshal A, Salazar Rodríguez D. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. Rev Panam Salud Publica. 2014;40(1):129-35.
3. González L, Cortés JA. Revisión sistemática de la farmacoresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. Rev Ing Biomed. 2014;34(2):180-97.

4. López-Velandia DP, Torres-Caycedo MI, Prada-Quiroga CF. Resistance genes in gram negative bacilli: Impact on public health in Colombia. *Universidad y Salud*. 2016;18(1):190-202.
5. Méndez-Fandiño YR, Caicedo-Ochoa EY, Guio-Guerra SA, Fernández-Niño DS, Urrutia-Gómez JA, Prieto AC. Caracterización clínica de infecciones de vías urinarias producidas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en Duitama (Colombia), durante 2010-2015. *Infectio*. 2016;1(12):2-5
6. Macero Méndez, R. M. Frecuencia de *Escherichia coli* betalactamasa de espectro extendido (BLEE), en infecciones de vías urinarias, en pacientes que acuden al hospital José Carrasco Arteaga del Instituto Ecuatoriano del Seguro Social [Tesis de Maestría]. Universidad de Guayaquil. 2013
7. Suárez Trueba B, Milián Samper Y, Espinosa Rivera F, Hart Casares M, Llanes Rodríguez N, Martínez Batista ML. Susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* aisladas a partir de urocultivos en un hospital de tercer nivel. *Revista Cubana de Medicina*. 2014;53(1):3-13.
8. Gonçalves LF, de Oliveira Martins-Júnior P, de Melo ABF, da Silva RCRM, de Paulo Martins V, Pitondo-Silva A, et al. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;6(1):1-4.
9. Morgand M, Vimont S, Bleibtreu A, Boyd A, Thien HV, Zahar J-R, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infections in children: are community-acquired strains different from nosocomial strains? *Int J. Med Microbiol*. 2014;304(8):970-6.
10. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC infectious diseases*. 2014;14(1):1.
11. Errecalde JO. Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública: Roma. FAO; 2004.
12. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6):S3-S10.

13. Redondo, C., & Alonso, G. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2007; 27(2):100-107
14. Kakabadse, D. Transferencia de genes de resistencia a antibióticos en aislados de *Escherichia coli* provenientes de comunidades remotas de la provincia de Esmeraldas [Tesis de licenciatura], Quito: USFQ. 2007
15. Chavolla-Canal, A. J., Gonzalez-Mercado, M. G., & Ruiz-Larios, Ó. A. Prevalencia de bacterias aisladas con resistencia antibiótica extendida en los cultivos de orina durante 8 años en un hospital de segundo nivel en México. *Revista Mexicana de Urología.* 2016;76(4), 213-217.
16. Narros MdRC, Real SH, González PC, Carbajosa SG. Estudio de multirresistencia antibiótica de *Escherichia coli* en urocultivos. *Medicina clínica.* 2007;129(11):409-11.
17. Villalobos AP, Barrero LI, Rivera SM, Ovalle MV, Valera D. Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. *Rev Ing Biomed.* 2014;34:67-80.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA; 2014.
19. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemoth.* 2003;47(11):3554-60.
20. De Paz, A. R. A., Chávez, A. R., & Hernández, N. R. (2015). *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario. *Rev Cubana Med Intensiva y Emergencias,* 14(4), 16-29.
21. Camulombo C, Alvarez BR, Jala MC, Chantez GAR, Amarilys G, Rojas Hernández NM. Evaluación de la resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias en la provincia de Huambo, Angola. *Rev Cubana de Ciencias Biológicas.* 2015;4(2).71-77

22. Machado-Alba JE, Murillo-Muñoz MM. Evaluación de sensibilidad antibiótica en urocultivos de pacientes en primer nivel de atención en salud de Pereira. *Rev salud pública*. 2012;14(4):710-9.
23. Rendon M, Reyes A, Rosas J, Rodríguez F. Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. coli* y *E. coli* ESBL a quinolonas, trimetoprimasulfametoxazol y nitrofurantoína. *Med Int Mex*. 2012;28(5):434-9.
24. Pavón-Gómez NJ. Diagnóstico y tratamiento de infección de las vías urinarias en embarazadas que acuden a Emergencia y consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque en Managua, Nicaragua. *Perinatol Reprod Hum*. 2013;27(1):15-20.
25. Robinson A, McCarter YS, Tetreault J. Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter system, API 20E system, and Vitek AutoMicrobic system for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 1995;33(2):364-70.
26. Jordá Vargas L, Vila A, Lanza A, Bonvehí P, Nazar J, Mikietuk A, et al. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta bioquím clín latinoam*. 2005;39(1):19-25.
27. Galván F, Agapito J, Bravo N, Lagos J, Tamariz J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*. 2016;27(1):22-9.
28. Gil ZA, Núñez JL, Benevidez EA, López EL. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo-Perú. *Rev cuerpo méd HNAAA*. 2014;7(3):27-30.
29. Arce-Gil Z, Llontop-Nuñez J, Flores-Clavo R, Fernández-Valverde D. Detección del gen CTX-M en cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido procedentes del Hospital Regional de Lambayeque; Chiclayo-Perú: Noviembre 2012-Julio 2013. *Rev Cuerpo Med HNAAA*. 2015;6(4):13-6.
30. Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter*. 2012;25(2):89-99.
31. González Mesa L, Ramos Morí A, Nadal Becerra L, Morffi Figueroa J, Hernández Robledo E, Álvarez AB, et al. Identificación fenotípica y molecular de β -lactamasas de

espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos de hospitales. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;59(1):52-58.

32. Gaitán SL, Espinal PA. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Revista chilena de infectología*. 2009;26(3):239-46.
33. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. *Salud Pública de Mex*. 2009;51(suppl3):ss439-s446.
34. Tellevik MG, Sollid JE, Blomberg B, Jureen R, Urassa WK, Langeland N. Extended-spectrum β -lactamase-type SHV-12-producing *Enterobacteriaceae* causing septicemia in Tanzanian children: vectors for horizontal transfer of antimicrobial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(3):351-4.