

**β-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN  
CEPAS DE *Klebsiella* spp. Y *Escherichia coli* RESISTENTES  
A CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACION**

**POR**

**CLAUDIA ANGELICA ZEMELMAN MERINO**

**TESIS PRESENTADA A LA ESCUELA DE GRADUADOS DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA**

**CONCEPCION – CHILE**

**2001**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

<b>Figura 1. Perfil plasmídico de la cepas de las cepas dadoras</b> <i>K. pneumoniae</i> K243, <i>E.coli</i> 117, cepa receptora <i>E. coli</i> K-12 y cepas transconjugantes <i>E. coli</i> K12-243T y <i>E. coli</i> K12-117T.....	<b>60</b>
<b>Figura 2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de</b> <b>CFTX sobre las cepas <i>K. pneumoniae</i> 243, <i>E. coli</i> K-12 y</b> <b>transconjugante <i>E. coli</i> K12-243T.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de</b> <b>CFTX sobre las cepas <i>E. coli</i> 117, <i>E. coli</i> K-12 y transconjugante</b> <b><i>E. coli</i> K12-117T.....</b>	<b>62</b>

## RESUMEN

Las infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas, especialmente las intrahospitalarias, constituyen una de las indicaciones más frecuentes de uso de antibióticos bactericidas y de amplio espectro, entre ellos cefalosporinas de tercera generación. *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. participan en una proporción importante como agentes etiológicos de cuadros infecciosos graves y presentan grados variables de susceptibilidad a cefalosporinas de tercera generación. La resistencia a estos compuestos se encuentra determinada por  $\beta$ -lactamasas, enzimas que son codificadas por genes cromosomales o extracromosomales. Epidemiológicamente son más importantes las últimas porque los genes codificantes pueden ser transferidos, favoreciéndose su diseminación en el medio hospitalario.

Las  $\beta$ -lactamasas de codificación cromosomal manifiestan especial actividad sobre cefalosporinas de primera a tercera generación y no son inhibidas por ácido clavulánico. Por el contrario, las enzimas extracromosomales son inhibidas por ácido clavulánico y pueden pertenecer a varias familias, como SHV y TEM en enterobacterias y, con menor frecuencia, a otros grupos (ej. CTX-M, PER, OXA, etc.). En los últimos años circulan, con relativa frecuencia, cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* que producen  $\beta$ -lactamasas con actividad hidrolítica sobre cefalosporinas de tercera generación las que, por esta razón, se denominan  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Estas enzimas son inhibidas por ácido clavulánico, característica que permite la pesquisa de las cepas bacterianas que las producen en el laboratorio.

En esta Tesis se determinó los patrones y niveles de resistencia de 171 cepas de *Klebsiella* spp. y 150 cepas de *E. coli* aisladas de procesos infecciosos en pacientes

provenientes de diferentes hospitales. Las cepas bacterianas se purificaron e identificaron por los métodos bacteriológicos habituales y se investigó la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en estas bacterias por dos métodos microbiológicos basados en la sinergia que se produce entre cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftazidima) y ácido clavulánico. La presencia de las enzimas fue corroborada mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de las cefalosporinas, en ausencia y en presencia de ácido clavulánico. Este compuesto inhibidor produce habitualmente una disminución de las CMIs equivalente, al menos, a  $\frac{1}{4}$  de la CMI del antibiótico solo, siempre y cuando no existan otros mecanismos de resistencia adicionales. Posteriormente se determinó los puntos isoeléctricos de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido mediante isoelectroenfoque. Se investigó el grupo enzimático al cual pertenecían las enzimas por amplificación genética, mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR), utilizando partidores con secuencias específicas para los grupos más importantes de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (TEM, SHV, OXA, PER y CTX-M).

También se realizaron experiencias de conjugación bacteriana entre cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*, como bacterias dadoras, y una cepa de *E. coli* K-12, como receptora, para comprobar la ubicación extracromosomal de los genes que codifican las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

Los resultados obtenidos en las experiencias de sinergia entre cefalosporinas de tercera generación y ácido clavulánico permitieron detectar la presencia de 75 cepas de *Klebsiella* spp. y de 12 cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. En todas las cepas seleccionadas se produjo una disminución de la

resistencia a cefalosporinas de tercera generación en presencia de ácido clavulánico, indicando la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Este efecto fue superior cuando se empleó cefotaxima o ceftazidima, pero inferior en el caso de cefepima.

En las cepas de *Klebsiella* spp. se detectaron  $\beta$ -lactamasas con puntos isoeléctricos 5.4, 6.4, 7.0, 7.6, 8.2, 8.6 y 8.4, siendo las enzimas más frecuentes aquéllas con pI 5.4 (72 cepas) y 7.6 (69 cepas). Con menor frecuencia se encontraron  $\beta$ -lactamasas con pI 8.2 (42 cepas), 8.6 (12 cepas), 6.4 (3 cepas) y 8.4 (5 cepas). En cambio en *E. coli* la distribución de  $\beta$ -lactamasas de acuerdo a sus respectivos pIs fue: 5.4 (11 cepas), 8.4 (5 cepas), 8.2 (3 cepas), 7.9 (2 cepas), 7.0 (1 cepa), > 8.5 (2 cepas). La mayor parte de las cepas estudiadas presentó varias  $\beta$ -lactamasas, siendo esto más frecuente en cepas de *Klebsiella* spp. (75 cepas con más de una  $\beta$ -lactamasa). En *E. coli*, en cambio, 5 de las 12 cepas presentaron una sola enzima, 3 cepas presentaron dos  $\beta$ -lactamasas y 4 cepas presentaron tres enzimas, de acuerdo a los pIs encontrados. Se logró transferir la resistencia de una cepa de *K. pneumoniae* y de una cepa de *E. coli* a una cepa de *E. coli* K-12, comprobándose la presencia de un plásmido de peso molecular de 55kD en las cepas dadoras y en las transconjugantes.

Los resultados permiten concluir que las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido son frecuentes en cepas multiresistentes de *Klebsiella* spp. y de *E. coli*, aunque la frecuencia es más elevada en las primeras. Las frecuencias encontradas son relativamente más elevadas que las informadas por otros autores sudamericanos y europeos, aunque en otros países la frecuencia es relativamente similar.

Los resultados indican la presencia de un complejo enzimático en las cepas de *Klebsiella* spp. y de *E. coli*, con amplia similitud en los tipos de  $\beta$ -lactamasas. También

existe similitud en el plásmido que parece codificar estas enzimas. Esto permite concluir acerca de una constante interacción genética intrahospitalaria entre ambos microorganismos.



## **SUMMARY**

Infections produced by Gram-negative bacteria, specially in the hospital environment, constitute the most frequent cause of broad-spectrum and bactericidal