

Caracterización fenotípica y genotípica de Escherichia coli multirresistente productoras de B-lactamasas de espectro extendido

HERNÁNDEZ-VERGARA, Jesús Antonio *†, CASTRO-ALARCON, Natividad, RUIZ-ROSAS, María

*Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas.**Clinica Hospital ISSSTE - UAGro. Av. Lázaro Cárdenas sin número, Ciudad Universitaria. Chilpancingo de los Bravo. Guerrero. México.*

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

Resumen

El grupo patógeno de las bacterias Escherichia coli se divide en dos tipos: las intestinales y las extraintestinales. Entre el grupo de extraintestinales se encuentran las E. coli uropatógenas (UPEC por sus siglas en inglés). La UPEC es una bacteria de la que se sabe poco, pero que es causante de numerosas infecciones del tracto urinario (ITU), principalmente entre las mujeres mexicanas. (Manjarrez-Hernández 2012). Las infecciones del tracto urinario son de las más comunes, se caracterizan por una notable morbilidad. Escherichia coli es la causante de 75%-90% de los casos en pacientes ambulatorios (Navarro-Navarro et al., 2013). Las ITU representan una de las enfermedades más comunes, con un estimado de 150 millones de infecciones urinarias por año en todo el mundo. E. coli es la bacteria más frecuente en la comunidad y los pacientes hospitalizados. (Tenover 2006) (Yun et al., 2013). Las cefalosporinas de segunda y tercera generación todavía tienen altas tasas de sensibilidad, aunque las tasas de recurrencia más alta están asociadas con su uso y la aparición de beta-lactamasas de espectro extendido producidas por enterobacterias (Horcajada et al., 2005).

Fenotípica, genotípica, Escherichia coli multirresistente.**Abstract**

The group of pathogenic bacteria Escherichia coli has two types: the intestinal and extraintestinal. Among the group of extraintestinal are uropathogenic E. coli (UPEC for its acronym in English). The UPEC is a bacterium which little is known, but is causing numerous urinary tract infections (UTI), mainly among Mexican women. (Manjarrez-Hernandez 2012). Urinary tract infections are the most common, is characterized by a significant morbidity. Escherichia coli is the cause of 75% -90% of cases in outpatients (Navarro-Navarro et al., 2013). UTIs are one of the most common diseases, with an estimated 150 million urinary tract infections per year worldwide. E. coli is the most common bacteria in the community and hospital patients. (Tenover 2006) (Yun et al., 2013). Cephalosporins second and third generation still have high rates of sensitivity, although higher recurrence rates are associated with their use and the occurrence of beta-lactamases of extended spectrum produced by enterobacteria (Horcajada et al., 2005).

Phenotypic, genotypic, multiresistant Escherichia coli.

Citación: HERNÁNDEZ-VERGARA, Jesús Antonio, CASTRO-ALARCON, Natividad, RUIZ-ROSAS, María. Caracterización fenotípica y genotípica de Escherichia coli multirresistente productoras de B-lactamasas de espectro extendido. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2014 Abril 2015, 1-2:648-652

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: antonio_24_89@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos). La tasa de aparición de bacterias resistentes a los antibióticos se determina por las tasas combinadas de mutación *novum* y la transferencia horizontal de genes (HGT) de determinantes de resistencia. Las mutaciones más comunes conducen a alteraciones en el sitio blanco del antibiótico y el aumento de flujo de salida de drogas (Andersson y Hughes 2010). Los principales mecanismos de resistencia se agrupan en tres categorías: 1) Inactivación enzimática, 2) Modificación del sitio blanco y 3) Alteraciones en la permeabilidad del antibiótico (Vignoli y Seija 2006).

Este mecanismo implica la inactivación de los betalactámicos como consecuencia de la acción de enzimas que reciben el nombre de betalactamasas, y es el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos (Vignoli y Seija 2006). Las β -lactamasas son ubicadas en las bacterias Gram negativas y representa una forma importante de resistencia, pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Estas enzimas son producidas por bacterias patógenas, hidrolizan los anillos betalactámicos, formando derivados acíclicos incapaces de fijarse en sus dianas en la membrana celular bacteriana (Lina et al., 2009). Las β -lactamasas hidrolizan el anillo betalactámico antes que el antibiótico llegue al punto de unión con las PBP. A pesar de que todas las β -lactamasas van a catalizar la misma reacción, se han clasificado en diferentes formas: en su secuencia de aminoácidos, peso molecular o especificidad del sustrato (Rudres y Nagarathnamma 2011). Más de 500 diferentes beta-lactamasas se han descrito, y este número está aumentando rápidamente cada año.

La clasificación más simple es por secuencia de la proteína, por lo que las β -lactamasas se clasifican en cuatro clases moleculares: A, B, C, y D. Las clases A, C, y D incluyen enzimas que hidrolizan sus sustratos mediante la formación de una enzima acil serina a través de un sitio activo, mientras que las β -lactamasas de clase B son metaloenzimas que utilizan al menos un ion de cinc del sitio activo para facilitar la hidrólisis del β -lactámico (Bush y Jacoby 2010, Rubtsova et al., 2010).

Las B-lactamasas de espectro extendido (ESBL) son la principal fuente de resistencia a oximino-cefalosporinas en enterobacterias. La mayoría de las ESBL son mutantes de enzimas TEM y SHV, pero las enzimas CTX-M son cada vez más importantes. Los tipos CTX-M son diversos, con más de 30 alelos se dividen en cinco grupos filogenéticos distintos y han evolucionado a través de la fuga genética y la mutación de genes cromosómicos. (Woodford et al., 2004). La mayoría de los genes que codifican para estas enzimas, se encuentran en plásmidos conjugativos y son transferidos fácilmente entre las especies bacterianas mediante la transferencia horizontal de genes (Woerther et al., 2010). Las BLEE son enzimas que comúnmente forman parte de integrones o transposones, mismos que le confieren gran capacidad de transferir sus genes de resistencia al asociarse con otros determinantes genéticos (Navarro-Navarro et al., 2013). Las BLEEs más frecuentes en la actualidad son TEM-4, TEM-24 TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32 (García-hernández et al., 2011). Los análisis filogenéticos han demostrado que cepas *E. coli* se clasifican en cuatro grandes grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) y que las cepas virulentas extraintestinales pertenecen principalmente al grupo B2 y D mientras que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A y B1 (Clermont et al., 2000).

Objetivos

- Identificar fenotípicamente a *Escherichia coli* aisladas de infecciones del tracto urinario de pacientes de la comunidad en el estado de Guerrero.
- Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos de *Escherichia coli* de ITU.
- Conocer la Prevalencia de *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido presentes causantes de ITU.
- Identificar el grupo filogenéticos de los aislamientos de *Escherichia coli* de ITU.
- Relacionar la presencia de BLEE con la resistencia a antibióticos y el grupo filogenético de *Escherichia coli*.

Metodología

Identificación de los aislamientos clínicos y prueba de susceptibilidad a antibióticos

Se analizaron muestras de orina por métodos convencionales de pacientes ambulatorios de la clínica del ISSSTE, durante el periodo enero del 2014 a agosto del 2014. Para identificación del agente etiológico se utilizó el sistema automatizado Vitek. En este equipo automatizado también se realizaron las pruebas de susceptibilidad a antibióticos como Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefazolina, Ceftriaxona, Cefepime, Aztreonam, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Amikacina, Gentamicina, Tobramicina, Ciprofloxacino, Moxifloxacino, Nitrofurantoina y Trimetoprima/Sulfametoxazol.

Determinación de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Se realizó la prueba de doble disco combinado. Para el método del disco combinado se utilizaron discos de papel de filtro impregnados con CAZ (30 μ g) y CTX (30 μ g) y un inhibidor de betalactamasas, como el ácido clavulánico (10 μ g). La confirmación o no de la producción de BLEE, se realiza midiendo el diámetro de inhibición producido en este disco, el cual debería ser superior a 5mm o más, en comparación con el halo de inhibición mostrado por el microorganismo cuando el antimicrobiano es usado individualmente (sin la adición de ácido clavulánico) se utilizó una *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo y *K. pneumoniae* 700603 como control positivo

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó por choque térmico, disolver de 2 a 3 colonias en 100 μ l de agua, hervir 5 min y en hielo 5 min, repetir el procedimiento una vez más. Centrifugar 2 min a 10000 rpm, retirar el sobrenadante y posteriormente guardarlo a -20°C.

Grupo filogenético

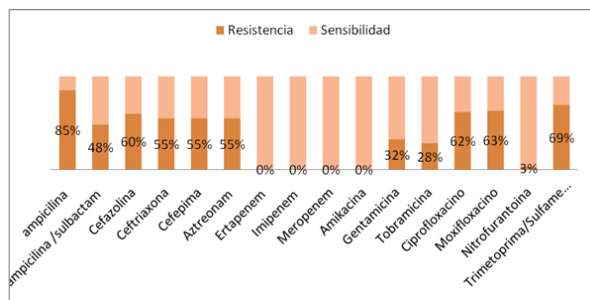
Los antecedentes filogenéticos (A, B1, B2 y D) se determinaron por medio de la técnica de PCR múltiple utilizando tres marcadores de DNA (Clermont et al., 2000). Este método se basa en la amplificación de un fragmento de DNA desconocido, denominado TSPE4C.2, y de dos genes, *chuA*, receptor hemo y *yjaA* cuya su función no se conoce. La presencia combinada de los distintos fragmentos indica el grupo filogenético al que pertenecen, tal como se muestra en la tabla 1.

Genes	Iniciadores	Tamaño del fragmento
<i>chuA</i>	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	279pb
<i>yjaA</i>	5'-TGAAGTGTGAGGAGACGCTG-3' 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	211pb
<i>tspE4C2</i>	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3' 5'-CGCGCCAACAAGTATTACG-3'	152pb

Tabla 1 Secuencia de iniciadores para identificar el grupo filogenético (Clermont et al., 2000)

Resultados

Se identificaron 88 aislamientos clínicos de *E. coli* de infecciones del tracto urinario de pacientes que acuden la clínica del ISSSTE Chilpancingo. La susceptibilidad a antibióticos de las cepas se presenta en la Grafica 1.



Grafica 1 Susceptibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU.

Se realizó la prueba de doble disco combinado utilizando sensidisos de CAZ y CTX y el ácido clavulánico como inhibidor de BLEE, con la finalidad de detectar la producción de BLEE (figura 1), Se determinó que 49 cepas son productoras de BLEE (55.6%) y 38 cepas no producen BLEE (44.4%).

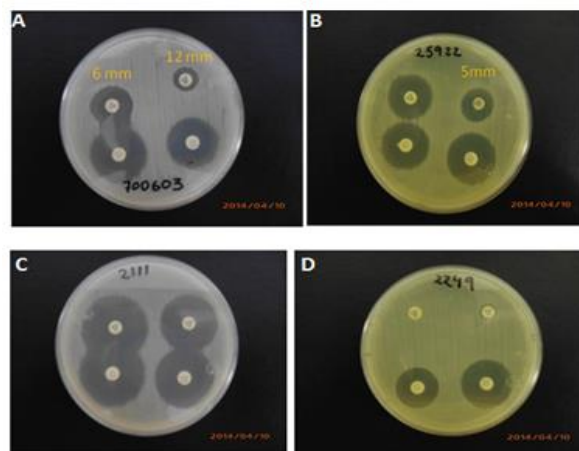


Figura 1 Prueba de doble disco combinado. A) control positivo de BLEE B) control negativo de BLEE C) Muestra 2111 negativa D) Muestra 2249 positiva.

Se realizó la PCR múltiple para determinar el grupo filogenético y los amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (figura 2). Así mismo, se determinó el grupo filogenético A: con la amplificación del gen *YjaA*, para el grupo B1: con la amplificación del gen *tspE4C2*, para el grupo B2: es la amplificación de *chuA+YjaA* y *chuA+YjaA+tspE4C2* y para el grupo filogenético D: es la amplificación del gen *chuA* y *chuA+tspE4C2*.

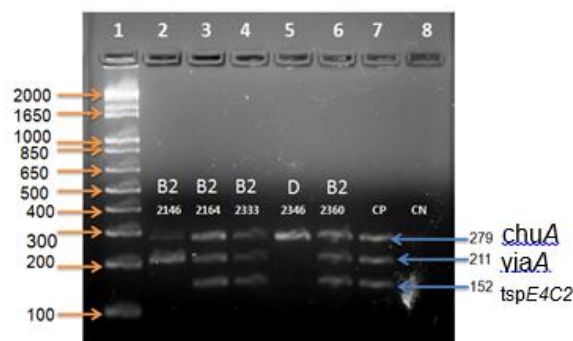


Figura 2 PCR de grupo filogenético. El carril 1) Marcador de peso molecular, los carriles 2, 3, 4, 6) Muestras 2146, 2164, 2333, y 2360 pertenece al grupo filogenético B2, carril 5) muestra 2346 pertenece al grupo filogenético D, carril 7) control positivo ATCC25922 y carril 8) control negativo.

Discusión

Los aislamientos clínicos causantes de infecciones urinarias en la población de estudio, mostraron altos porcentajes de resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados en el tratamiento de estas infecciones. El 55.5% de las cepas productoras de BLEE se correlaciono con la resistencia a cefalosporinas de segunda, tercera y cuarta generación (Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepime y Aztreonam). En las quinolonas se determinó 62% de resistencia a Ciprofloxacino y 63% a Moxifloxacina. La mezcla de Trimetroprima/sulfametoxazol alcanzó porcentajes de resistencia de 69%. Estos altos porcentajes de resistencia a estos antibióticos no betalactámicos, determino la multiresistencia en las cepas productoras de BLEE.

En las cepas que se han analizado hasta este momento se han observado que pertenecen al grupo filogenético de tipo B2 y D y estas son productoras de BLEE debido a que estos grupos son considerados como patógenos.

Conclusión

El 55.6% de los aislamientos de E. coli causantes de infecciones de tracto urinario son productores de BLEE las cuales son multiresistentes a los antibióticos utilizados en el tratamiento de ITU.

Las cepas productoras de BLEE pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D, considerados como patógenos.

Referencias

Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl (January), pp.S347–57.

Danza, P., 2010. Bacterial resistance to antibiotics: its importance in making decisions in daily practice. *Informacion Terapeutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), pp.57–67.

Rudres, S. y Nagarathnamma, T., 2011. Extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae & antibiotic co-resistance. *Indian Journal of Medical Research*, 133(1), pp.116–188.