

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**Departament de Genètica i Microbiologia**

**Unitat Docent del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau**

**CARACTERIZACION DE LAS  $\beta$ -LACTAMASAS DE  
ESPECTRO EXTENDIDO Y CEFAMICINASAS EN  
ENTEROBACTERIAS AISLADAS ENTRE 1997 Y 1999  
EN BARCELONA**

**TESIS DOCTORAL**

**Roxana Rebeca Aliaga Almedo**

**Barcelona, 2001**

El Dr. Guillem Prats Pastor, Catedrático de Microbiología del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que Roxana Rebeca Aliaga Almedo, ha llevado a término bajo mi dirección, el trabajo de investigación para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas titulado “Caracterización de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y cefamicinasas en enterobacterias aisladas entre 1997 y 1999 en Barcelona”, realizado en la Unidad Docente del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, y cumple los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el tribunal correspondiente.

Por lo tanto para que así conste, y para los efectos oportunos, firmo este certificado en Barcelona, 08 de Mayo del 2001.

Dr. Guillem Prats Pastor  
Catedrático de Microbiología  
Universidad Autónoma de Barcelona

No dejaremos de explorar  
Y el final de la exploración será  
Llegar al punto de partida  
Y conocer el sitio por primera vez

T. S. Eliot

Porque dedicar es obsequiar un objeto a las personas queridas, quiero dedicar esta tesis a las siguientes personas, alguna de ellas a miles de kilómetros de aquí, otras muy cercanas y otras incluso acompañándome siempre desde otras dimensiones, pero todas ellas muy cerca de mi corazón.

A la memoria de mi abuelo y de Germán, el primero me amo tanto que aún ahora después de tantos años de su ausencia puede sentir su cariño y amor protegiéndome; Germán siempre tuvo una palabra mimosa y de cariño para mí, pasamos tantos momentos alegres, algún día los repetiremos.

A mi madre por su infinito amor, porque es un ejemplo de vida para mí.

A mi padre, que en los Andes del Perú espera pacientemente mi regreso.

A Santiago mi compañero, pero sobre todo mi amigo de tantas jornadas y de tantos sueños, sin su aliento, sin su amor, paciencia y ayuda, la realización de esta tesis no hubiera sido posible, ni siquiera el poder estar aquí.

A Montse y Clarita, por sus energías, vitalidad, enseñanzas, confianza, infinita paciencia, ayuda en todo momento, aliento, esperanza, refugio, por ser como son, mis catalanas preferidas, mis amigas.

A Mariella, siempre esta para mí en cualquier parte del mundo.

A los cuatro mosqueteros, fuimos uno, luego dos, luego tres y finalmente cuatro, a Jorge, Montse y Mosthafa, por su amor y por tantas sonrisas juntas, porque hicieron de estos años los más inolvidables.

A un pequeñito, cuya sonrisa y dulzura me han acompañado en los últimos meses, ha hecho este camino más alegre.

A una pequeñita cuya vida no siempre ha sido fácil, por ser como es, porque la quiero tal cual es.

Mientras realizaba esta tesis murieron tres personas muy queridas (María E., Ramona B. y Laura Q.), para amigos míos muy queridos para ellos también va esta tesis porque ha pesar de los hechos creo que la vida es una continuidad ininterrumpida, que ellos están allí amándolos y queriéndolos como siempre.

Barcelona, verano del 2001.

## AGRADECIMIENTOS

Porque para mí, la gratitud es uno de los sentimientos que nunca deben faltar en la vida y que nos obliga a reconocer que todo trabajo o acto es el cúmulo de esfuerzos conjuntos, que no estamos solos en esta vida y que nos necesitamos los unos a los otros. Por eso quiero dejar constancia en esta líneas de mi agradecimiento, y reconocimiento a todas estas personas que me apoyaron de alguna u otra manera hasta poder llegar al final de esta tesis.

Al Dr. Guillem Prats, por todo el apoyo y confianza depositada para la realización de esta tesis, por darme la oportunidad desde el primer día que lo conocí, cuando llegue al laboratorio tocando las puertas, por todo su cariño y preocupación hacia mí en todos estos años, más que un tutor ha sido un maestro, un padre y un amigo. Hay deudas impagables sólo puedo expresarle mi respeto y cariño por siempre.

A la Dra. Beatriz Mirelis por todo su apoyo y ayuda siempre y en todo momento, sin ello no hubiera llegado a buen puerto esta tesis, por todas sus enseñanzas, por hacer de la microbiología un mundo aún más fascinante para mí, por su cariño y amistad

Al Dr. Ferran Navarro por haber confiado en mi para la realización de este tema, por sus enseñanzas, por llevarme de la mano en el campo de la biología molecular, por su constante apoyo a lo largo de la realización y redacción de esta tesis, por todo su tiempo dedicado, por su amistad.

A la Dra. Elisenda Miró por su ayuda, enseñanzas y asesoramiento en la realización de esta tesis, por su apoyo en la redacción de esta tesis, por su amistad.

Al Dr. Pere Coll, por su apoyo y ayuda cada vez que lo necesite.

Al Dr. Josep Barrio, por su ayuda y apoyo en la recolección de los datos clínicos, por ese don de gentes que siempre nos lleva a él cada vez que lo necesitamos.

Dr. Roger Guerra-García, por todo el apoyo y cariño brindado siempre, por la confianza puesta en mi para recibir esta beca, espero no haberlo defraudado.

Al Dr. Andrés Lucen, por toda su confianza, apoyo y cariño a lo largo de los diez años en el Servicio de Microbiología del Instituto Materno Perinatal.

A los Drs. Gloria Larrabure y Pedro Mascaró, por su apoyo incondicional para poder postular a esta beca.

Al personal y amigos a lo largo de estos años en mi querido y siempre recordado Instituto Materno Perinatal, por todo el cariño y las puertas abiertas en todo sitio y en especial a todos mis amigos del Laboratorio Clínico, y a los del Servicio Microbiología, a Liliana, Felipe, Lucy, Lizeth, Karina, Julia, Mauro, Maritza, Martha, Clelia, y un etcetera largo porque sin el apoyo y aliento de todos ellos no hubiera podido conocer estas tierras y poder realizar esta tesis.

A la familia Pastor Soplín por todo el cariño y la amistad y en especial a la Mañuquita sin su ayuda no hubiera tenido la tranquilidad de saber que todo en casa esta en buenas manos, lo mismo a Rafito por ser tan amigo.

A todos mis amigos de siempre y de toda la vida, a las moninas, a los norbertinos, a los molineros, que desde Perú y desde cualquier parte del mundo nunca dejaron de enviarme aliento y cariño desde que me traslade a esta ciudad, a la distancia nunca me sentí sola.

A Julia, Medali y José, es mi pequeña familia aquí en Barcelona, siempre me apoyaron en alegrías y tristezas, siempre estuvieron para mi en todo momento.

A las amigas de Recerca del H.S.P., a Paquita, Esther, Teresa, Silvia, Jussara, Laura y Pilar, por el aliento, las sonrisas, por estar siempre para mi cuando lo necesite, por todo su cariño y amistad.

A Jesus y Montse sin su apoyo con el préstamo del ordenador difícilmente hubiera podido terminar a tiempo esta tesis, pero más que eso, por el cariño y amistad que me brindaron siempre.

A mis amigos latinoamericanos, catalanes y españoles por tantos momentos gratos y alegres compartidos juntos, por su cariño, jamás faltó una llamada telefónica de tanto en tanto, jamás faltó un aliento o tan solo un abrazo, a Ferran y Alina, Rafael y Piedad, Eva y Angel, Adora y Salva, Cun y Nuria, Manuel y Loreto, Cris, Ramón, Gloria, Leiliani, Erika, Paco, Indiana, Norma, Zulema, Erwin, Mamen, Mar, Paula y tantos otros que conocí en el transcurso de estos años todos ellos son "culpables" en parte de llevar a buen puerto esta tesis.

A todo el personal del Laboratorio de Microbiología del H.S.P., a los adjuntos de quienes recibí siempre apoyo y asesoramiento técnico, enseñanzas y amistad; al personal administrativo quienes siempre tuvieron todas las facilidades para mi, y lo mejor, siempre sentí que lo hicieron con mucho cariño; al personal técnico de todos los turnos, porque también son los "culpables" en gran parte de que volviera a realizar esta tesis en el laboratorio, ya que desde la primera vez me trataron tan bien que quise volver. De ellos aprendí muchas cosas y trucos de este arte de la microbiología, por su cariño, amistad, invitaciones, palabras de alientos, estuvieron siempre dispuestos para mi con una sonrisa.

A los amigos de Malalties Infeccioses en especial a la Dra. Gurgui y a Lidia por el apoyo y las facilidades brindadas.

Per tot això i molt més, gràcies a tothom!!. Us recordaré sempre i ens veurem a Perú.

La estancia para la realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la beca MUTIS concedida por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).

INDICE

	página
Indice de abreviaturas	i
INTRODUCCION	1
1) Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	4
2) Antibióticos $\beta$ -lactámicos	9
2.1 Clasificación	9
2.2 Estructura	10
2.3 Mecanismo de acción	12
2.4 Evolución histórica	13
2.4.1 Las penicilinas	13
2.4.2 Las cefalosporinas	14
2.4.3 Los carbapenems	15
2.4.4 Los monobactams	15
2.4.5 Inhibidores de $\beta$ -lactamasas	16
3) Resistencia antimicrobiana	16
3.1 Mecanismos de resistencia	17
3.2 Introducción a la genética de la resistencia	17
3.2.1 Resistencia natural y resistencia adquirida	17
3.2.2 Evolución vertical y horizontal	18
3.2.2.1 Evolución vertical	18
3.2.2.2 Evolución horizontal	19
3.3 Control de la resistencia	22
4) $\beta$ -lactamasas	24
4.1 $\beta$ -lactamasas en grampositivos y gramnegativos	24
4.2 Origen de las $\beta$ -lactamasas	25
4.3 Modo de acción de las $\beta$ -lactamasas	25
4.4 Detección y caracterización de las $\beta$ -lactamasas	25
4.5 Codificación de las $\beta$ -lactamasas	26



4.6 Clasificación de las $\beta$ -lactamasas	26
4.6.1 $\beta$ -lactamasas cromosómicas	29
4.6.2 $\beta$ -lactamasas plasmídicas	31
4.6.2.1 $\beta$ -lactamasas de amplio espectro clásicas	32
4.6.2.1.1 $\beta$ -lactamasa TEM-1	32
4.6.2.1.2 $\beta$ -lactamasa SHV-1	33
4.6.2.2 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido BLEAS	33
4.6.2.2.1 $\beta$ -lactamasas tipo TEM y SHV	33
4.6.2.2.2 $\beta$ -lactamasas de la familia CTX-M	35
4.6.2.2.3 Oxacilinasas	36
4.6.2.3 $\beta$ -lactamasas resistentes a los inhibidores	37
4.6.2.4 Cefamicinasas	37
4.6.2.5 Carbepenemasas	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y METODOS	45
1) Cepas estudiadas	47
2) Determinación de la sensibilidad a los antibióticos	47
2.1 Técnica de difusión	47
2.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	48
2.2.1 Técnica de dilución en medio sólido	49
2.2.2 Técnica de microdilución	49
2.2.3 Método de E-test	50
2.3 Prueba de doble difusión con disco (placa de sinergia)	51
3) Procedimientos para el análisis epidemiológico de las cepas	51
3.1 Técnicas fenotípicas	52
3.1.1 Biotipado	52
3.1.2 Antibiotipado	52
3.1.3 Serotipado	52
4) Selección de las cepas estudiadas con cefotaxima	53

5) Determinación del punto isoelectrico	54
5.1 Extracción de $\beta$ -lactamasas	54
5.2 Análisis por la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida.	55
6) Conjugación	56
7) Detección y caracterización de las $\beta$ -lactamasas por amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
8) Técnicas de análisis del ADN	61
8.1 Endonucleasas de restricción	61
8.2 Separación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	62
9) Secuenciación directa de los productos de la PCR	63
10) Análisis computacional del ADN y de las secuencias aminoacídicas deducidas	65
 RESULTADOS	 67
1) Número de cepas estudiadas	69
2) Características clínicas de los pacientes	69
2.1 Pacientes a los que se le aisló <i>Escherichia coli</i>	69
2.2 Pacientes a los que se le aisló <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
2.3 Pacientes a los que se le aisló <i>Salmonella enterica</i>	79
2.4 Paciente al que se le aisló <i>Proteus mirabilis</i>	79
3) $\beta$ -lactamasas detectadas en las 35 cepas de <i>Escherichia coli</i>	82
3.1 Cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEA compatible con CTX-M-9	83
3.2 Cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEAs compatible con SHV-2	97
3.3 Cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEAs tipo TEM	107
4) $\beta$ -lactamasas detectadas en las 9 cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	113
4.1 Cepas de <i>K. pneumoniae</i> productoras de BLEA compatible con SHV-2	114
4.2 Cepa de <i>K. pneumoniae</i> productora de cefamicinasa CMY-2	118
5) $\beta$ -lactamasas detectadas en <i>Salmonella enterica</i>	123
5.1 Cepa de <i>S. enterica</i> productora de BLEA compatible con CTX-M-9	123
5.2 Cepa de <i>S. enterica</i> productora de cefamicinasa CMY-2	124

6) -lactamasa detectada de <i>Proteus mirabilis</i>	127
6.1 Cepa de <i>P. mirabilis</i> productora de cefamicinasa CMY-2	127
DISCUSION	131
1) Cepas productoras de BLEA compatible con CTX-M-9	136
2) Cepas productoras de BLEA compatible con SHV-2	142
3) Cepas productoras de BLEA TEM-12 y TEM-10	147
4) Cepas productoras de cefamicinasa CMY-2	150
5) Detección de BLEAs y cefamicinasas	155
6) Características clínicas de los pacientes	159
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFIA	173

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

µg	microgramos
µL	microlitros
mL	mililitro
mg	miligramo
rpm	revoluciones por minuto
ND	no determinado
pI	punto isoeléctrico

### Antibióticos:

AMP	ampicilina
AMC	amoxicilina-ácido clavulánico
ATM	aztreonam
CAZ	ceftazidima
CFP	cefoperazona
CPD	cefpodoxima
CTX	cefotaxima
CXM	cefuroxima
FEP	cefepime
CXM	cefuroxima
FOX	cefoxitina
PIP	piperacilina
TIC	ticarcilina
TZP	piperacilina-tazobactan
KZ	cefazolina
CIM	concentración inhibitoria mínima
C1G	cefalosporinas de 1 <sup>ra</sup> generación
C2G	cefalosporinas de 2 <sup>da</sup> generación
C3G	cefalosporinas de 3 <sup>ra</sup> generación
BLEA	-lactamasas de espectro extendido



valor de CIM sensible



valor de CIM intermedio



valor de CIM resistente



CIM, que después de la selección con cefotaxima, incrementó en 4 veces o más