

Fig. 7: Antibiograma de una cepa de *E. coli* productora de SHV-2

Tabla 15 Patrón de sensibilidad de 6 cepas de *Escherichia coli* productoras de -lactamasa compatible con SHV-2

CEPA	AMP	AMC	TIC	PIP	TZP	CXM	FOX	CTX	CAZ	CPD	CFP	FEP	ATM
907-D	512	8/4	1024	>64	8/4	32	8	1	2	16	8	1	0,5
1000-D	256	4/2	1024	32	4/4	8	4	1	1	8	4	0,125	0,5
1034-D	1024	4/2	>1024	256	4/4	16	8	4	4	8	8	1	1
1036-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	8	8	1	1	8	8	0,25	0,25
1245-D	512	4/2	1024	32	4/4	16	8	1	1	8	2	0,25	0,125
1310-D	>1024	8/4	>1024	>1024	>256/4	256	2	32	16	128	128	8	8
CIM ₅₀	1024	8/4	>1024	256	4/4	16	8	1	1	8	8	0,5	0,5
CIM ₉₀	>1024	8/4	>1024	>1024	8/4	256	8	4	4	32	16	1	4
Cons.	256	4/2	1024	32	4/4	8	2	1	0,25	8	2	0,125	0,125
Extrem.	h 1024	h 16/8	h >1024	h >1024	h >256/4	h 256	h 8	h 32	h 16	h 128	h 128	h 8	h 8

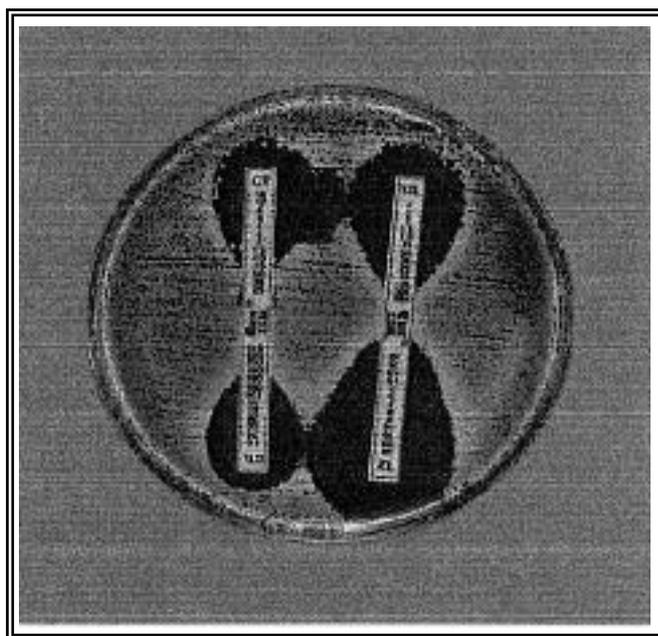


Fig. 8: Determinación de la CIM, por el método del E-test, para una cepa productora de β -lactamasa SHV-2. Tira de la izquierda, arriba: cefotaxima, abajo: cefotaxima con ácido clavulánico. Tira de la derecha, arriba: ceftazidima con ácido clavulánico, abajo: ceftazidima.

Tabla 16 Cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasa SHV-2 según fecha de aislamiento, serogrupo, biotipo y procedencia

CEPA	MES	AÑO	SEROGRUPO	BIOTIPO	PROCEDENCIA
907-D	02	97	O6	1775	Cirugía general
1000-D	06	97	O4	1775	Cardiología
1034-D	07	97	O4	1775	Oncología
1036-D	07	97	O4	1775	Ambulatorio
1245-D	09	98	ND	1775	Neurocirugía
1310-D	01	99	O6	1775	Ambulatorio

PCR: Las seis cepas cuyo patrón de sensibilidad y pI, fueron compatibles con las cepas productoras de SHV-2, fueron sometidas a PCR con iniciadores específicos para el gen *bla_{SHV}* (Figura 9). En todos los casos, se amplificó el fragmento esperado (1017pb). El producto de la amplificación fue digerido con la enzima de restricción *NheI*, la cual produjo dos fragmentos (769 pb y 248 pb), que resultan compatibles con una lactamasa SHV-2, tal como se observa en la figura 10.

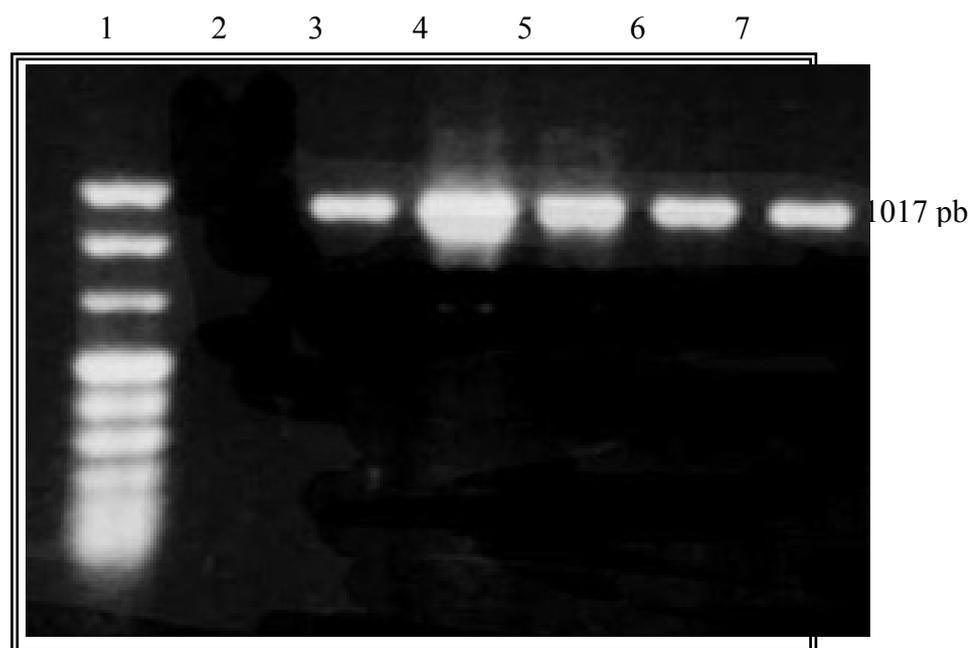


Fig. 9: Electroforesis de los amplificados de la PCR para *bla*_{SHV}. Carril 1, marcador de peso molecular (Marker VIII, Roche). Carril 2, control negativo *E. coli* CTX-M-9 (MSP 492). Control 3, control positivo *E. coli* SHV-1 (J53 R1010). Carril 4, control positivo *E. coli* SHV-2 (DH5x, MPB-2). Carriles 5-7, muestras de *E. coli* 1036-D, 1245-D y 1310-D.

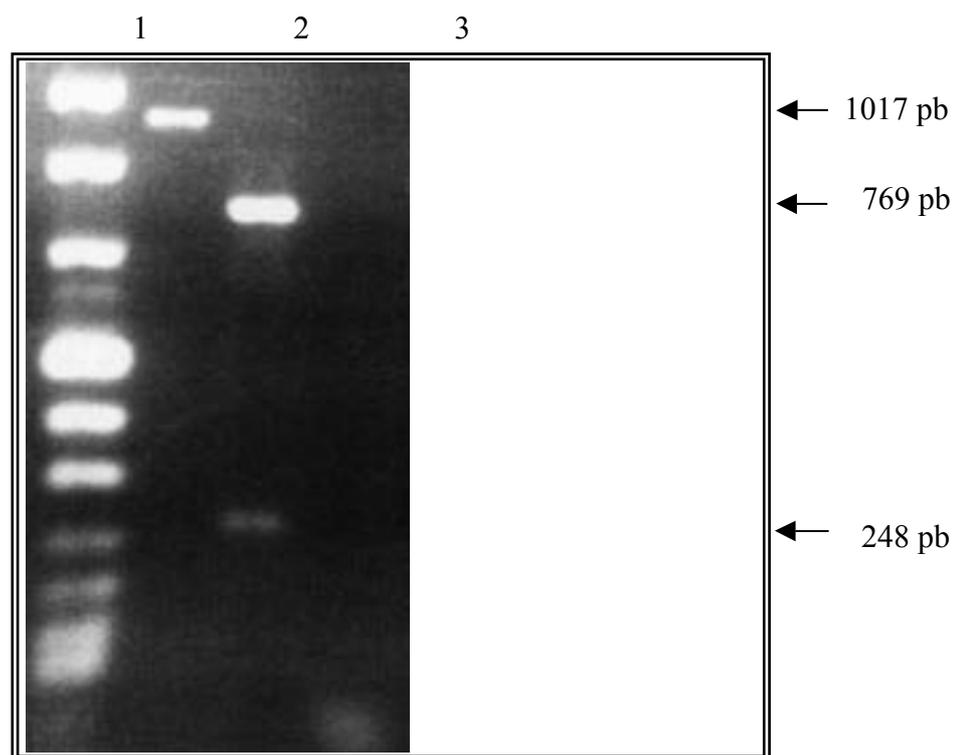


Fig. 10: Electroforesis de la digestión de los amplificados de la PCR para *bla_{SHV}* de *E. coli*. Carril 1, marcador de peso molecular (Marker VIII, Roche). Carril 2, control negativo de digestión *E. coli* SHV-1 (J53 R1010). Carril 3, muestras de *E. coli* 907-D.

Selección con cefotaxima: De las seis cepas analizadas, se escogieron 5 para ser seleccionadas con cefotaxima (Tabla 17). Frente a la piperacilina, se observaron 3 cepas que fueron reevaluadas después de la selección como resistentes (las tres incrementaron su CIM de 32 $\mu\text{g/mL}$ ó 64 $\mu\text{g/mL}$ a >1024 $\mu\text{g/mL}$). La CIM₉₀ de cefoxitina (8 $\mu\text{g/mL}$) no se modificó con la selección y para la amoxicilina-ácido clavulánico, el cambio de la CIM₉₀ es de una sola dilución doble progresiva (8/4 $\mu\text{g/mL}$ a 16/8 $\mu\text{g/mL}$); sin embargo, la cepa 1036-D pasó a ser reevaluada como resistente (de 8/4 $\mu\text{g/mL}$ a 32/16 $\mu\text{g/mL}$).

Para cefepime la sensibilidad del conjunto de cepas cambió en algunos casos hasta un nivel de resistente; su CIM₉₀ sufrió un incremento de 5 diluciones dobles progresivas de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de aztreonam, la sensibilidad del conjunto de cepas cambió hasta un nivel intermedio; CIM₉₀ de 4 $\mu\text{g/mL}$ a 16 $\mu\text{g/mL}$. Estos cambios no se observaron en la cepa 1034-D.

En las cepas seleccionadas se observa, un incremento considerable de la CIM₉₀ para la piperacilina-tazobactam, cefotaxima, ceftazidima y cefoperazona, pasando en estos casos de sensible a resistente con incremento de sus CIM₉₀ de cuatro diluciones dobles progresivas o más (de 8/4 $\mu\text{g/mL}$ a $>256/4$ $\mu\text{g/mL}$, de 4 $\mu\text{g/mL}$ a 128 $\mu\text{g/mL}$, de 4 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$, de 16 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Todas las cepas incrementaron su CIM inicial de sensible a resistente, excepto 1034-D, que frente a piperacilina-tazobactam y ceftazidima no cambio su nivel de sensible.

Frente a la cefuroxima, la CIM₉₀ aumentó en 2 diluciones dobles progresivas (256 $\mu\text{g/mL}$ a 1024 $\mu\text{g/mL}$); con este antibiótico el cambio fue de intermedio a resistente en cuatro cepas. En dos cepas (1000-D y 1036-D), el cambio fue de 8 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$. Para la cepa 1245-D, el cambio de CIM fue mayor aún (16 $\mu\text{g/mL}$ a >1024 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla 17 Patrón de sensibilidad de 5 cepas (en negro) y sus isogénicas (en azul) de *Escherichia coli*, productoras de β -lactamasas SHV-2 seleccionadas con cefotaxima

CEPA	AMP	AMC	TIC	PIP	TZP	CXM	FOX	CTX	CAZ	CPD	CFP	FEP	ATM
907-D	512	8/4	1024	64	8/4	32	8	1	2	16	8	1	0,5
907-D Sel	>1024	8/4	>1024	>1024	>256/4	1024	8	512	256	1024	1024	128	128
1000-D	256	4/2	1024	32	4/4	8	4	1	1	8	4	0,125	0,5
1000-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	>256/4	256	4	128	32	256	256	16	16
1034-D	1024	4/2	>1024	256	4/4	16	8	4	4	8	8	1	1
1034-D Sel	>1024	8/4	>1024	1024	4/4	64	8	32	8	64	64	4	4
1036-D	1024	8/4	>1024	512	4/4	8	8	1	1	8	8	0,25	0,25
1036-D Sel	>1024	32/16	>1024	>1024	>256/4	256	8	128	32	256	256	32	16
1245-D	512	4/2	1024	32	4/4	16	8	1	1	8	2	0,25	0,125
1245-D Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	>256/4	>1024	16	32	16	256	128	8	8
CIM ₅₀	1024	8/4	>1024	256	4/4	16	8	1	1	8	8	0,5	0,5
CIM₅₀ Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	>256/4	256	8	128	32	256	256	16	16
CIM ₉₀	>1024	8/4	>1024	>1024	8/4	256	8	4	4	32	16	1	4
CIM₉₀ Sel	>1024	16/8	>1024	>1024	>256/4	1024	8	128	32	256	256	32	16
Concentraciones	256	4/2	1024	32	4/4	8	2	1	0,25	8	2	0,125	0,125
Extremas	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	1024	16/8	>1024	>1024	>256/4	256	8	32	16	128	128	8	8
Concentraciones	>1024	8/4	>1024	>1024	4/4	64	4	32	8	64	64	4	4
Extremas	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	32/16				>256/4	>1024	16	512	256	1024	1024	128	128

3.3 Cepas de *E. coli* productoras de BLEA tipo TEM

Patrón de resistencia a β -lactámicos: La cepa 1365-D, presenta resistencia a la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y cefuroxima. Es sensible a la amoxicilina-ácido clavulánico, cefepime y cefotaxima con CIM para el último antibiótico de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cefoxitina, ceftazidima y cefpodoxima, presentan valores intermedios de CIM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). La cefoperazona, es sensible (CIM=16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con aztreonam se observa valores de CIM sensible (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La cepa mostró sinergia con los cuatro antibióticos evaluados y el ácido clavulánico (Figura 11).

La cepa 1401-D también presenta resistencia a la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y cefuroxima. Además es sensible frente a amoxicilina-ácido clavulánico, cefepime y cefotaxima con CIM para el último antibiótico de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con cefoxitina, ceftazidima y cefpodoxima, tiene valores de CIM como resistente (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Respecto a la cefoperazona, tiene sensibilidad intermedia (CIM = 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Con aztreonam se observa valores de CIM resistente (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La cepa mostró sinergia con los cuatro antibióticos evaluados.

Los patrones de resistencia tanto de la cepa 1365-D como 1401-D, se encuentran recogidos en la tabla 18.

Isoelectroenfoque: La cepa 1365-D mostró dos valores de pI: 5,2 y 5,4. En el revelado iodométrico usando como sustrato ceftriaxona, no mostraron actividad. Cuando se usó penicilina en el gel de revelado, ambas bandas pudieron visualizarse.

La cepa 1401-D tuvo pI de 5,6 y presentó actividad en el revelado iodométrico usando como sustrato ceftriaxona.

En la figura 12, se muestran los pI de ambas cepas.

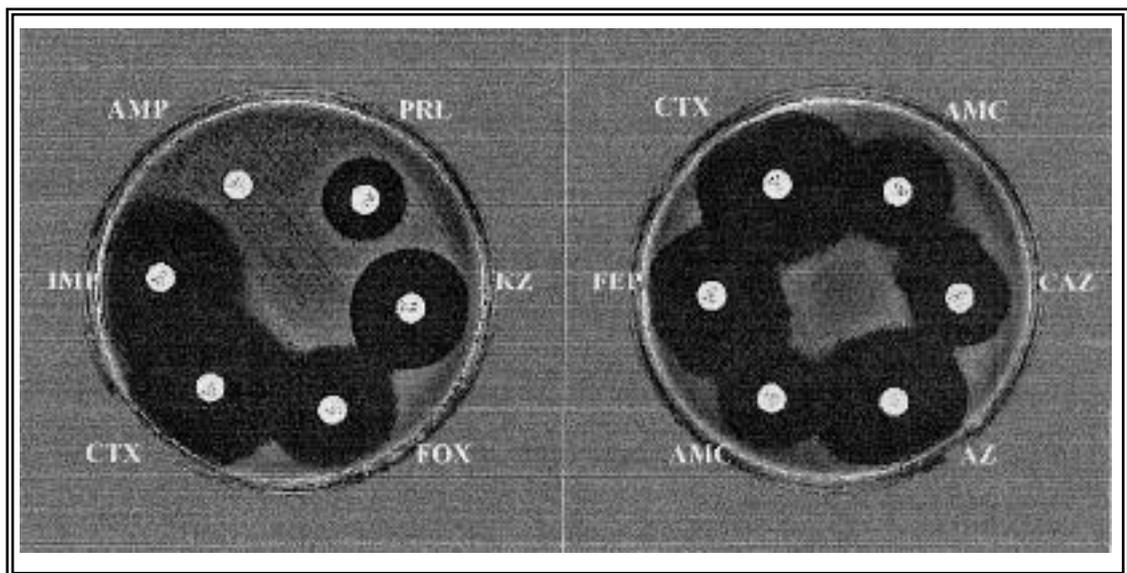


Fig. 11: Antibiograma de una cepa de *E. coli* productora de TEM-12

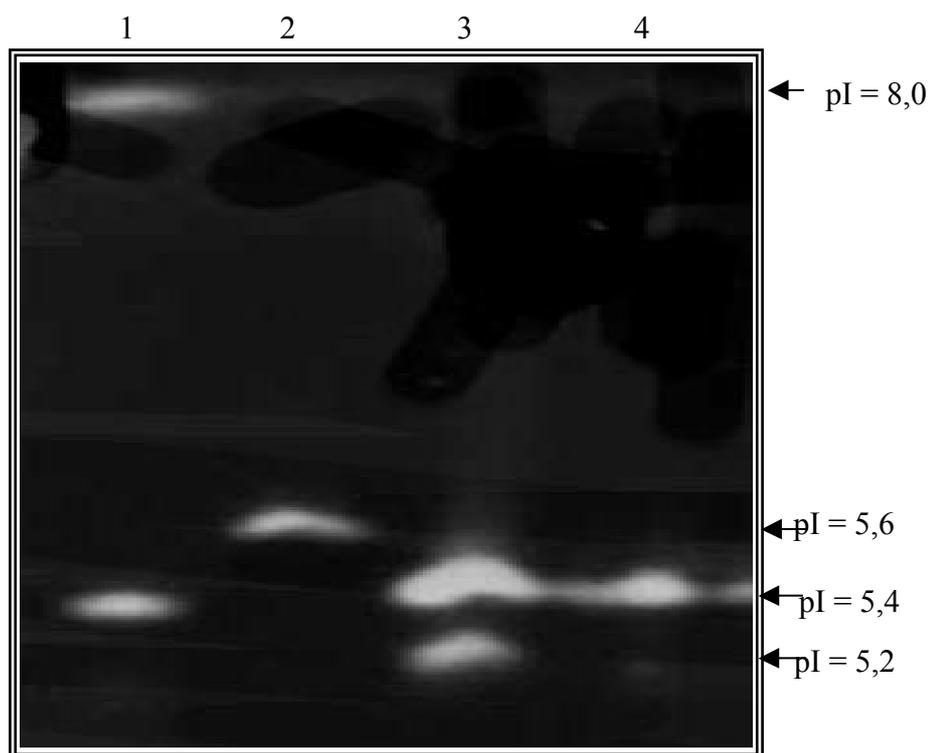


Fig. 12: Gel de isoelectroenfoque de cepas portadoras de TEM-10 y TEM-12. Carril 1 cepa control de *E. coli* portadora de CTX-M-9 (785-D) con pI de 8,0 y de TEM-1 con pI de 5,4. Carril 2, cepa de *E. coli* 1401-D portadora de TEM-10 con pI de 5,6. Carril 3, cepa de *E. coli* 1365-D portadora de TEM-12 y TEM-1 con pI de 5,2 y 5,4. Carril 4, cepa control de *E. coli* TEM-1 (RL 111) con pI de 5,4.

Tabla 18 Patrón de sensibilidad de 2 cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasa tipo TEM

CEPA	AM	TIC	PIP	TZ	CXM	FO	CTX	CA	CPD	CFP	FEP	AT	SER.	BI	
P	C		P	X	Z						M			OT	
1365-	>102	8/4	>102	102	8/4	32	16	0,5	16	4	16	1	1	ND	767
D ¹	4	4	4	4											1
1401-	>102	8/4	>102	512	32/	256	>6	8	128	32	32	4	64	ND	767
D ¹	4	4	4	4	4	4	4								1

¹Ambas cepas se aislaron en el mismo paciente. La cepa 1365-D presentaba una β -lactamasa de pI 5,2 y 5,4; mientras que la cepa 1401-D presentaba una de pI 5.6.

Relación epidemiológica de la cepa: Ambas muestras tuvieron el mismo biotipo 7671, procedían del mismo paciente (paciente A), pero fueron aisladas en fechas distantes (mayo y octubre de 1999).

PCR: Se analizaron dos cepas cuyo patrón de resistencia y pI sugerían ser productoras de β -lactamasas tipo TEM. Se usaron un par de iniciadores capaces de identificar a todo el grupo de β -lactamasas TEM. En ambas cepas se encontró un segmento con el tamaño esperado (938pb). En la figura 13, observamos la electroforesis de los amplificados de la PCR de las dos cepas del paciente A.

Secuenciación: Para identificar el tipo de TEM producido por ambas cepas, se secuenció a partir del producto amplificado. Se obtuvo una secuencia correspondiente a TEM-10 para la cepa 1401-D. En el producto amplificado de la cepa 1365-D se encontraron dos secuencias correspondientes a TEM-12 y TEM-1.

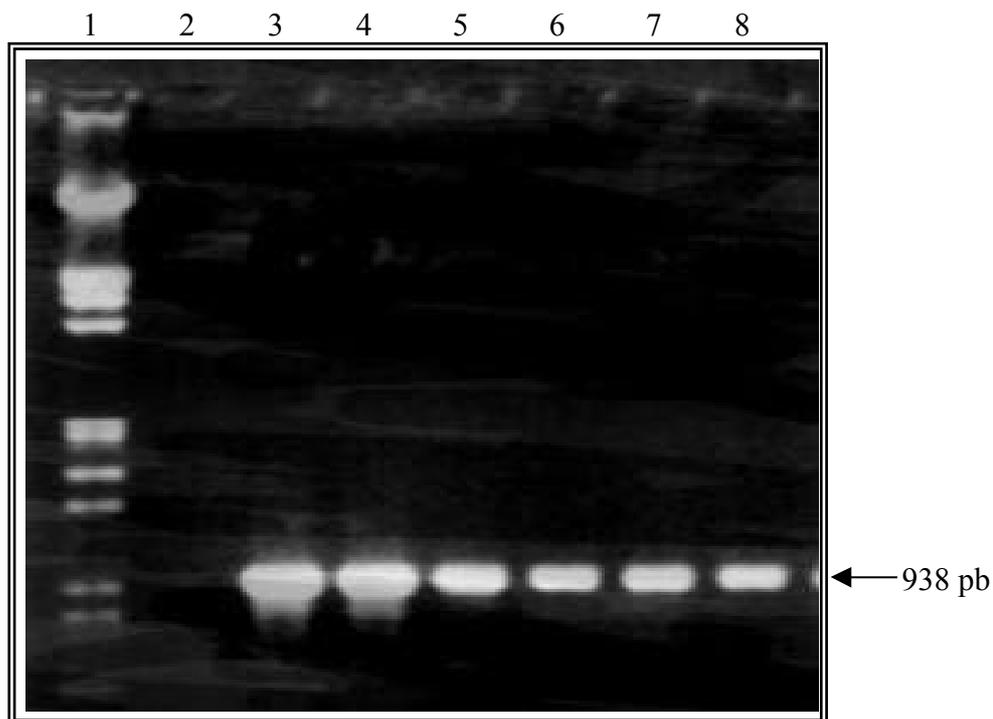


Fig. 13: Electroforesis de los amplificados de la PCR para *bla*_{TEM}. Carril 1, marcador de peso molecular (Marker III, Roche). Carril 2, control negativo *E. coli* SHV-1 (J53 R1010). Carril 3, control positivo *E. coli* TEM-1 (RL 111). Carriles 4, 5 y 6, cepas de *E. coli* 876-D, 1290-D y 1406-D. Carriles 7 y 8, cepas de *E. coli* del paciente A 1365-D y 1401-D.

4) β -lactamasas detectadas en *Klebsiella pneumoniae*

De las 11 cepas inicialmente seleccionadas de *K. pneumoniae*, sólo 9 fueron incorporadas en este estudio ya que los amplicones obtenidos con los iniciadores SHVA y SHVB en las otras dos mostraron un patrón de no restricción con *NheI* característico de la β -lactamasa cromosómica SHV-1 de *K. pneumoniae* (a partir de ahora nos referiremos sólo a estas 9 cepas). De estas 9 cepas, 8 fueron sospechosas de ser portadoras de BLEAS por su sensibilidad disminuida a C3G y por la sinergia observada entre éstas y el ácido clavulánico. Tras estudiar el pI de estas cepas, obtuvimos un valor de 7,6, lo que sugería la presencia de una familia de BLEAS: las SHV. Para confirmarlo se realizaron PCRs con iniciadores específicos. Estas PCRs resultaron positivas con iniciadores para SHV, y el amplificado fue digerido por la enzima de restricción *NheI*, razón por la cual se las consideró portadoras de una BLEA compatible con SHV-2.

La cepa restante fue sospechosa de ser portadora de una cefamicinasa por su sensibilidad disminuida a la cefoxitina, amoxicilina-ácido clavulánico y C3G y ausencia de sinergia entre las C3G y el ácido clavulánico. Se detectaron tres β -lactamasas con valores de pI 5,4, 7,6, y 9 (valor dado por extrapolación). La β -lactamasa con pI 9, sugería la presencia de una cefamicinasa y se realizó la PCR con iniciadores de un fragmento de los genes de la β -lactamasa cromosómica de *Citrobacter* y *Enterobacter* así como para las derivadas de éstas (ver apartado de materiales y métodos). Esta PCR fue positiva y también fue positiva la PCR con los iniciadores para CMY-2, por lo cual se procedió a confirmar este resultado secuenciando del producto de la amplificación.

A continuación se detallan los resultados obtenidos tanto fenotípicos como genotípicos de las diferentes cepas estudiadas.

Se presentan los patrones de resistencia a los β -lactámicos de las cepas portadoras de las dos β -lactamasas detectadas (SHV-2 y CMY-2), los valores de CIM obtenidos y las características de sinergia o antagonismo observado. Posteriormente, se detalla las peculiaridades de estas cepas al determinar el pI del conjunto de β -lactamasas presentes en las mismas.

Además se presentan las características genotípicas de la β -lactamasa implicada que se realizó mediante PCR y como ya se ha mencionado, si procede, secuenciación.

Para verificar la localización plasmídica de la β -lactamasa compatible con CMY-2, se realizó con éxito un ensayo de conjugación.

Las cepas de *K. pneumoniae* se distribuyeron de la siguiente manera: 240 cepas aisladas en 1997; 235 cepas aisladas en 1998; y 214 aisladas en 1999. La β -lactamasa plasmídica mayoritariamente encontrada fue SHV-2: se aislaron 2 cepas en 1998 (0,85% de las cepas analizadas este año); y en 6 cepas en 1999 (2,8% de las cepas analizadas este año), siendo ausente en 1997. Con menor frecuencia solo se ha observado una de *K. pneumoniae* productora de CMY-2: en 1999 (0,47%).

4.1 Cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEA compatible con SHV-2

Patrón de resistencia a β -lactámicos: Ocho cepas de *K. pneumoniae*, mostraron un patrón de sensibilidad homogéneo (Tabla 19). Todas resultaron resistentes a la ampicilina, ticarcilina, y piperacilina, siendo por el contrario todas las cepas sensibles a la amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima y cefepime. La mayoría resultaron resistentes a cefpodoxima, observándose sólo dos cepas con sensibilidad intermedia. Frente a cefuroxima había 4 cepas con sensibilidad intermedia y 4 resistentes. Por otro lado, la mayoría resultaron sensibles a piperacilina-tazobactam, con sólo una cepa de sensibilidad intermedia y una cepa resistente; aztreonam con dos cepas de sensibilidad intermedia; ceftazidima, con dos cepas de sensibilidad intermedia y una cepa resistente; y cefoxitina y cefoperazona fueron mayoritariamente sensibles, y en sólo tres cepas con sensibilidad intermedia.

Las cepas 145-Fb y 163-Fb por el método del doble disco difusión, mostraron sinergia entre el ácido clavulánico y los cuatro antibióticos del ensayo. La cepa 156-Fb con cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Dos cepas (162-Fb y 165-Fb), mostraron sinergia con cefotaxima y ceftazidima; mientras que otras dos cepas (135-Fb y 154-Fb) con cefotaxima y aztreonam; la cepa 155-Fb sólo con cefotaxima.

Tabla 19 Patrón de sensibilidad de 8 cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de -lactamasa SHV-2

CEP	C			M			M						
	AMP	AM	TIC	PIP	TZP	CX	FOX	CTX	CAZ	CPD	CFP	FEP	AT
135-	1024	8/4	>102	128	8/4	8	4	2	2	4	4	0,5	1
Fb			4										
145-	>102	8/4	>102	>102	16/4	64	4	8	16	64	32	8	8
Fb	4		4	4									
154-	>102	8/4	>102	128/	64	16	16	8	32	64	32	4	16
Fb	4		4	4									
155-	>102	8/4	>102	512	8/4	16	4	4	2	16	8	1	1
Fb	4		4										
156-	>102	4/2	>102	512	16/4	32	16	4	8	16	16	1	1
Fb	4		4										
162-	>102	8/4	>102	1024	4/4	16	4	8	4	32	16	2	1
Fb	4		4										
163-	>102	8/4	>102	1024	64/4	64	16	8	16	64	32	8	16
Fb	4		4										
165-	>102	8/4	>102	512	8/4	8	4	4	1	4	4	0,5	0,5
Fb	4		4										
CIM ₅	>102	8/4	>102	512	8/4	16	4	4	4	16	16	1	1
₀	4		4										
CIM ₉	>102	8/4	>102	16/4	64	16	16	8	16	62	32	8	16
₀	4		4										
Cons.	1024	4/2	>102	128	4/4	8	4	2	2	4	4	0,5	0,5
Extre	h	h	4	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
m.	>102	8/4	>102	128/	64	16	16	8	32	64	32	8	16
₄	4		4	4									

Isoelectroenfoque: Las β -lactamasas presentes en el extracto crudo de todas las cepas mostraron pI de 7,6.

PCR: Para amplificar el gen correspondiente se utilizaron los iniciadores para *bla*_{SHV} obteniéndose en todos los casos el fragmento amplificado de interés (1017pb); este producto fue digerido con la enzima de restricción *NheI*, lo cual demuestra la presencia de una β -lactamasa SHV-2, en estas cepas. Aún así, siempre está presente una cierta cantidad de amplificado no digerido correspondiente a la SHV-1 cromosómica de *K. pneumoniae* (Figura 14).

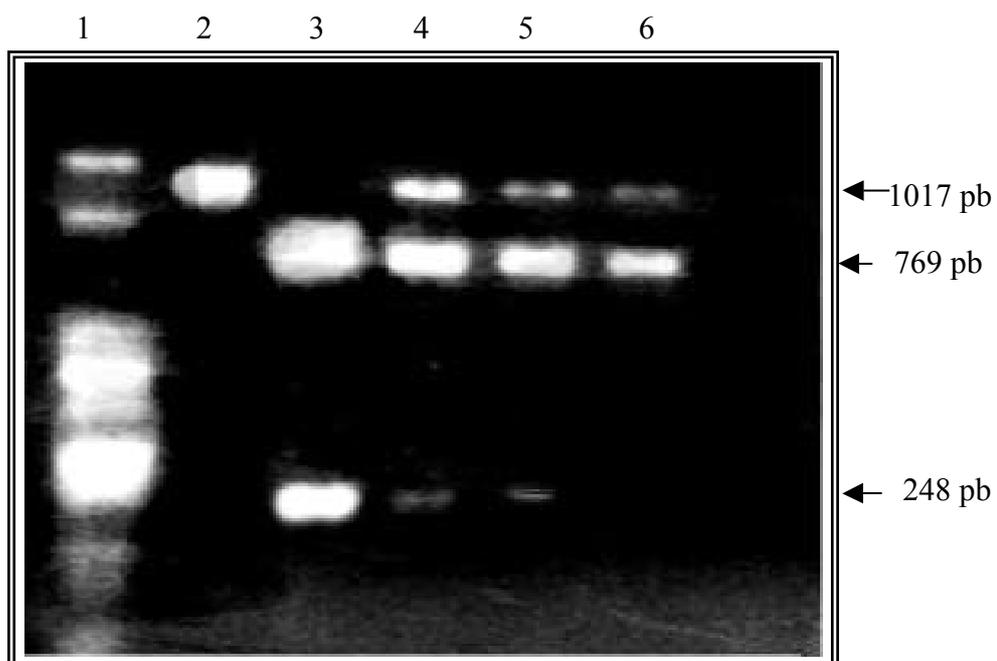


Fig. 14: Electroforesis de la digestión de los amplificadores de la PCR para *bla_{SHV}* de *K. pneumoniae*. Carril 1, marcador de peso molecular (Marker VIII, Roche). Carril 2, control negativo de digestión *E. coli* SHV-1 (J53 R1010). Carril 3, control positivo de digestión *E. coli* SHV-2 (DH5x, MPB-2). Carriles 4-6, digestión de las cepas de *K. pneumoniae* 135 Fb, 145 Fb y 154 Fb.

4.2 Cepa de *K. pneumoniae* productora de cefamicinasa CMY-2

Patrón de resistencia a los β -lactámicos: El estudio de la sensibilidad se realizó mediante la técnica de microdilución (Tabla 20). La cepa 175-Fb mostró resistencia a amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina, cefuroxima y cefoxitina. Por el contrario, fue sensible a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam.

No se observó sinergia con ninguno de los antibióticos de la prueba. Tampoco se observó antagonismo.

Isoelectroenfoque: En el gel para determinar el punto isoeléctrico se observaron tres bandas: 5,4, 7,6 y \approx 9. El último valor fue estimado por extrapolación; ésta β -lactamasa mostró actividad en el revelado iodométrico en presencia de ceftriaxona como sustrato, mientras que ni la primera β -lactamasa (pI de 5,4), ni la segunda (pI de 7,6) dieron actividad con este sustrato. En la figura 15, se muestra el gel de isoelectroenfoque para esta cepa.

Conjugación: El transconjugante (MSP496) mostró valores de CIM muy similares a los de la cepa donadora, no cambiando en ningún caso su categoría de resistente o sensible. El efecto inhibitorio de la cefotaxima y ceftazidima en combinación con el ácido clavulánico, fue determinado por E-test (AB biodisk, Solna, Sweden), y no se observó ninguna actividad inhibitoria. La cepa transconjugante MSP496, presentó dos β -lactamasas una de pI \approx 9 y otra con pI de 5,4. No se observó en el transconjugante, la banda correspondiente a pI 7,6 de la cepa salvaje, que correspondía a la SHV-1 cromosómica.

Tabla 20 CIM de los β -lactámicos y resistencias asociadas de la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, su transconjugante y de la cepa receptora *Escherichia coli* BM694CIa

CEPA	AM	A	PIP	CX	FO	CT	CA	AT	CTX/C	CAZ/C	Resistencia asociadas
	X	M		M	X	X	Z	M	LA	LA	
175-Fb	>32	>3	>64	>16	>64	4	8	<8	>1	>4	GEN KAN NEO TOB STR TET CHL
T175-Fb (MSP496)	>32	32	>64	16	32	4	8	<8	>1	>4	GEN KAN NEO TOB STR TET CHL NAL
<i>E. coli</i> BM694CI	1	1	<16	<8	1	<0, 5	<0, 5	<8	<0,064	0,016	NAL

a

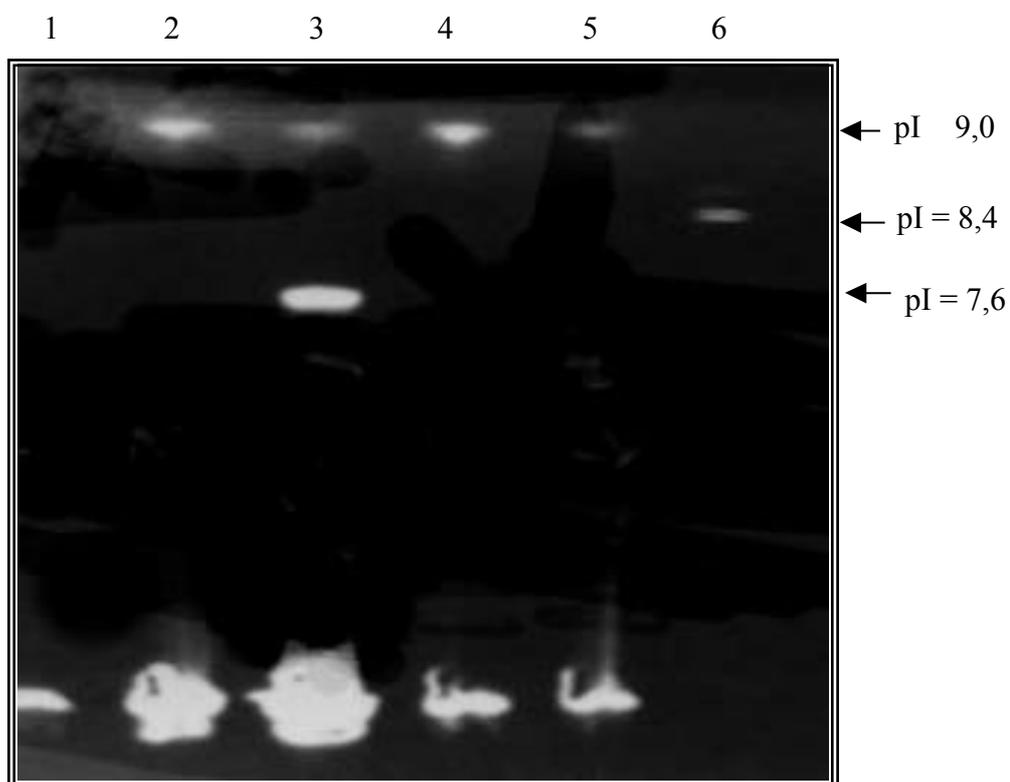


Fig. 15: Gel de Isoelectroenfoque con cepas portadoras de CMY-2. Carril 1, cepa control *E. coli* TEM-1 (RL 111). Carril 2, cepa de *S. enterica* con pI 5,4 y pI aprox. 9,0. Carril 3, cepa de *K. pneumoniae* 175 Fb con pI de 5,4, pI de 7,6 y pI aprox. 9,0. Carril 4, cepa de *P. mirabilis* 89 Hb con pI de 5,4 y pI aprox. 9,0. Carril 5, transconjugante de cepa de *S. enterica* con pI de 5,4 y pI aprox. 9,0. Carril 6, cepa control *E. coli* CTX-M-4 (R893) con pI de 8,4.

PCR: En la cepa 175-Fb de *K. pneumoniae*, y en su transconjugante (MSP496), se determinó la presencia de la cefamicinasa mediante PCR con iniciadores degenerados, resultando positivo; en ambos casos se obtuvo un fragmento de 461pb (Figura 16). Se realizó una PCR para la búsqueda del gen *ampR* con iniciadores diseñados a partir de la secuencia descrita para este gen, disponibles en el GenBank; no se logró amplificar ningún fragmento.

En este caso, así como en las cepas de *S. enterica* y *P. mirabilis* productoras de esta enzima (véase más adelante) mediante PCR (iniciadores 5CS y 3CS) se detectó integrones con una región variable interna de aproximadamente 3Kb; sin embargo, cuando se utilizaron en forma cruzada 5CS y 3CS, con los iniciadores ampC1 y ampC2, no se obtuvieron productos amplificados. Se probó la localización del gen CMY-2 al interior de un integrón compuesto mediante una PCR con iniciadores específicos para la secuencia del ORF341 presente en los integrones In6 e In7, sin obtener ningún producto amplificado.

En esta cepa y en su transconjugante se había observado otra β -lactamasa con pI de 5,4 por lo cual se realizó PCR específica para β -lactamasas tipo TEM, logrando amplificar en ambos casos el segmento esperado (938pb). De esta manera, esta enzima fue identificada como una β -lactamasa compatible con una TEM-1.

La cepa salvaje de *K. pneumoniae* también producía una banda de pI 7,6, la cual no fue transferida a su transconjugante, por lo que esta enzima era compatible con la β -lactamasa cromosómica SHV-1. La PCR positiva y la no digestión del producto amplificado, confirmaron este hecho.

Secuenciación: El producto amplificado (461pb) con los iniciadores degenerados fue secuenciado y presentó una homología de 100% con el gen que codifica para la β -lactamasa CMY-2. Basándonos en la secuencia ya descrita para CMY-2 (Gen Bank número de acceso X91840), se diseñaron un par de iniciadores con los cuales amplificó y secuenció un fragmento de 1143pb, cuya homología con la β -lactamasa CMY-2 previamente descrita, fue de 100%.

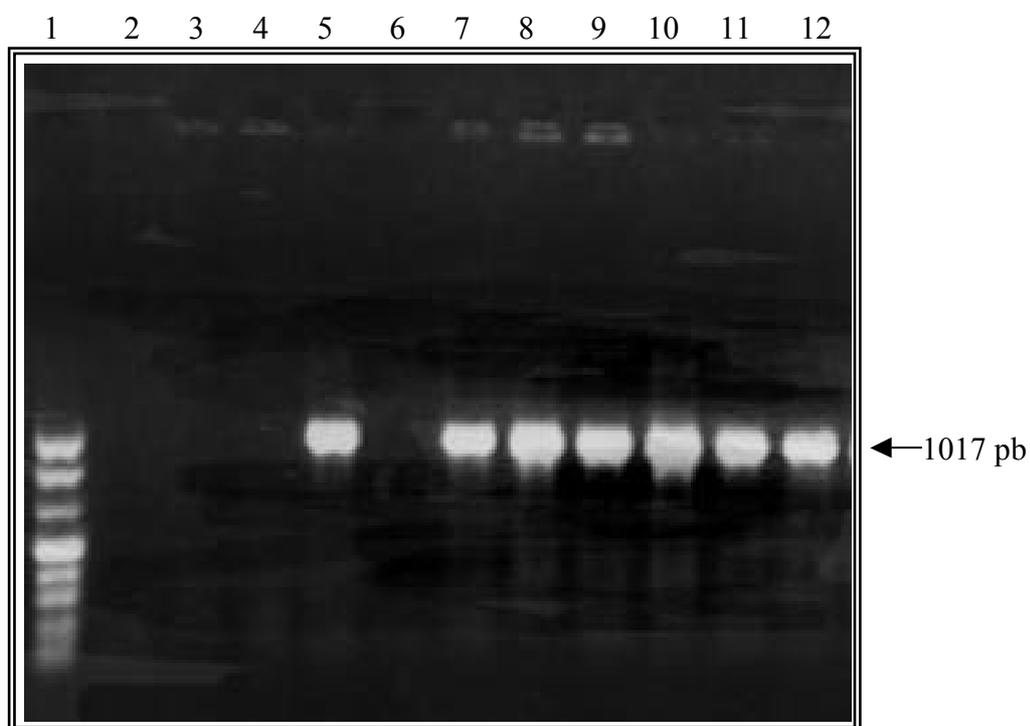


Fig. 16: Electroforesis de los amplificados de la PCR con iniciadores CMY-2. Carril 1, marcador de peso molecular (Marker VIII, Roche). Carriles 2-4, controles negativos *E. coli* SHV-1 (J53 R1010), *E. coli* BM694 Cla y *E. cloacae* (73Cc). Carril 5, control positivo de *C. freundii* (70 Lb). Carril 6, control negativo *C. koseri*. Carriles 7 y 8, *S. enterica* (170 Ma) y transconjugante (MSP 494). Carriles 9 y 10, *P. mirabilis* (89Hb) y transconjugante (MSP 495). Carriles 11 y 12, *K. pneumoniae* (175 Fb) y transconjugante (MSP 496).

5) β -lactamasas detectadas en las dos cepas de *Salmonella enterica*

De las dos cepas aisladas, una perteneciente al serotipo Virchow (144 Ma) fue sospechosa de ser portadora de BLEA por su sensibilidad disminuida a C3G y por su sinergia entre éstas y el ácido clavulánico. Tras estudiar el pI de esta cepa, obtuvimos un valor de 8. La PCR de la cepa, resultó positiva con iniciadores para CTX-M-9, razón por la cual se la consideró portadora de una BLEA compatible con CTX-M-9.

La otra cepa perteneciente al serotipo Mikawasima (170 Ma), mostró dos β -lactamasas con valores de pI: 5,4 y 9. Además, presentó sensibilidad disminuida a la cefoxitina, amoxicilina-ácido clavulánico y C3G. No se observaron sinergia ni antagonismo.

Durante el período de tiempo evaluado se aislaron 913 cepas de *S. enterica*; 242 en 1997, 316 en 1998 y 355 en 1999. En 1997 se aisló una cepa portadora de β -lactamasa CTX-M-9 y en 1999 una de CMY-2.

5.1 Cepa de *S. enterica* productora de BLEA compatible con CTX-M-9

Patrón de resistencia a β -lactámicos: La cepa 144-Ma fue resistente a ampicilina, ticarcilina, cefuroxima, cefotaxima, cefoperazona y cefpodoxima. Mostró sensibilidad intermedia frente a amoxicilina-ácido clavulánico (16/8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Fue sensible a piperacilina-tazobactam (4/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefoxitina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ceftazidima (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aztreonam (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cefepime (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El ácido clavulánico mostró sinergia únicamente con la cefotaxima.

Isoelectroenfoque: En el gel de isoelectroenfoque se observó una banda de pI de 8,0 con actividad en el revelado iodométrico con ceftriaxona.

PCR: Al realizarse la PCR, se usaron dos pares de iniciadores CTX-M-9_{IATG} - CTX-M-9_{ISTOP} y CTX-M-9_{EATG} y CTX-M-9_{ESTOP}, el primero específico para la parte interna del gen y el último que incluye todo el gen y regiones vecinas. Se obtuvieron los

fragmentos esperados de 0,85Kb y 1,5Kb, lo cual confirmó la presencia del gen *bla*_{CTX-M-9} - lactamasa compatible con la CTX-M-9.

5.2 Cepa de *S. enterica* productora de cefamicinasa CMY-2

Patrón de resistencia a β -lactámicos: Este parámetro fue estimado mediante la técnica de microdilución (Tabla 21). La cepa 170Ma fue resistente a la amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina, cefuroxima y cefoxitina; mostró sensibilidad intermedia a cefotaxima y ceftazidima; y fue sensible al aztreonam. No se observó sinergia, así como tampoco antagonismo con el ácido clavulánico (Figura 17).

Isoelectroenfoque: Se observaron dos bandas: 5,4 y $\text{pI} \approx 9$ (valor estimado por extrapolación); solo la banda $\text{pI} \approx 9$ mostró actividad en el revelado iodométrico con ceftriaxona. En la figura 15, se muestra el gel de isoelectroenfoque tanto para esta cepa como para su transconjugante.

PCR: La presencia de CMY-2 en la cepa 170-Ma y su transconjugante (MSP494), se confirmó mediante PCR, con resultados similares a los descritos en el punto 4.2 (Figura 16).

Conjugación: El transconjugante (MSP494) mostró valores de CIM similares a los de la cepa donadora (170-Ma), excepto para aztreonam que pasó de sensible a intermedio. El efecto inhibitorio de la cefotaxima y ceftazidima en combinación con el ácido clavulánico, fue determinado por E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). En el revelado iodométrico, el transconjugante mostró dos bandas con $\text{pI} \approx 9$ y pI de 5,4 (Figura 15).

Tabla 21 CIM de los -lactámicos y resistencias asociadas de la cepa de *Salmonella enterica*, su transconjugante y de la cepa receptora *Escherichia coli* BM694CIa

CEPA	AM	A	PIP	CX	FO	CT	CA	AT	CTX/C	CAZ/C	Resistencia Asociadas
	X	M	M	M	X	X	Z	M	LA	LA	
	C										
170-Ma	>32	>3	>64	>16	32	16	16	<8	>1	>4	GEN KAN NEO TOB STR TET CHL
T170-Ma (MSP494)	>32	32	>64	>16	>64	32	>16	16	>1	>4	GEN KAN NEO TOB STR TET CHL NAL
<i>E.coli</i> BM694CI	1	1	<16	<8	1	<0,	<0,	<8	<0,064	0,016	NAL
a				5	5	5					

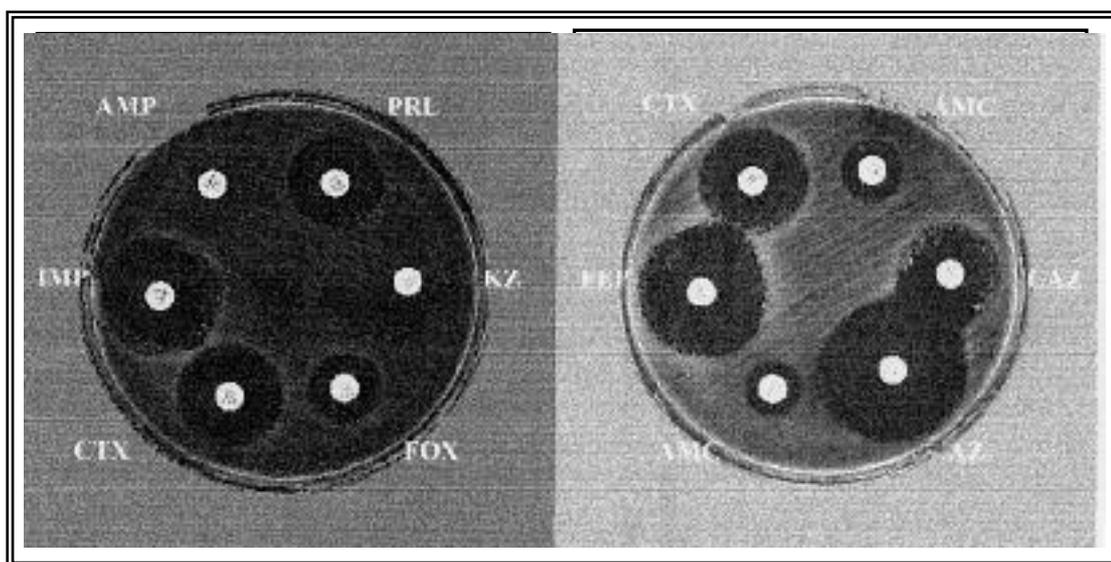


Fig. 17: Antibiograma de una cepa de *S. enterica* productora de CMY-2

6) β -lactamasa detectada en una cepa de *Proteus mirabilis*

La cepa fue sospechosa de ser portadora de una cefamicinasa, por su sensibilidad disminuida a cefoxitina, ácido clavulánico y C3G. No se detectó sinergia entre las C3G y el ácido clavulánico ni antagonismo entre C3G y β -lactámicos inductores. Tras determinar el pI de las β -lactamasas esta cepa, se obtuvieron dos valores: 5,4 y 9. Las PCR con los extractos de ADN de esta cepa resultaron positivas con iniciadores para *ampC*, y también con iniciadores para CMY-2.

Durante el período de estudio se aislaron 948 cepas de *P. mirabilis* (1997: 350 cepas; 1998: 318 cepas y 1999: 280 cepas), aislandose solamente una cepa productora de una β -lactamasa, con acción sobre C3G que fue identificada como CMY-2.

6.1 Cepa de *P. mirabilis* productora de cefamicinasa CMY-2.

Patrón de resistencia a β -lactámicos: La cepa 89-Hb mostró resistencia a la amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina, cefuroxima, cefoxitina; frente a cefotaxima mostró sensibilidad intermedia; mientras que fue sensible ceftazidima y aztreonam (Tabla 22). No se observó sinergia ni antagonismo.

Isoelectroenfoque: El revelado mostró dos bandas: 5,4 y 9. La segunda se reveló con ceftriaxona. En la figura 15, se muestra el gel de isoelectroenfoque tanto para esta cepa.

PCR: La presencia de la β -lactamasa plasmídica, CMY-2, fue confirmada mediante PCR, tanto en la cepa salvaje como su transconjugante, con resultados semejantes a los descritos en el punto 4.2 (Figura 16).

Conjugación: El transconjugante (MSP495) mostró similares valores de CIM que la cepa donadora, excepto frente al aztreonam, pasando de la categoría de sensible a tener una sensibilidad intermedia. Las β -lactamasas presentes en el transconjugantes presentaban un pI de 9 y de 5,4.

Tabla 22 CIM de los β -lactámicos y resistencias asociadas de la cepa de *Proteus mirabilis*, su transconjugante y de la cepa receptora *Escherichia coli* BM694CIa

CEPA	AM	A	PIP	CX	FO	CT	CA	AT	CTX/C	CAZ/C	Resistencias Asociadas
	X	M		M	X	Z	M	LA	LA		
89-Hb	>32	>3	>64	>16	64	16	8	<8	>1	>4	GEN KAN NEO TOB STR TET CHL
T89-Hb (MSP495)	>32	32	>64	>16	>64	32	16	>16	>1	>4	GEN KAN NEO TOB STR TET CHL NAL
<i>E.coli</i> BM694CI	1	1	<16	<8	1	<0,5	<0,5	<8	<0,064	0,016	NAL

a

Como resumen en la tabla 23, se recoge el total de cepas portadoras de BLEAs y cefamicinasas aisladas en el período estudiado.

Tabla 23 Número total de cepas y porcentajes de sensibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación y/o aztreonam por producción de BLEAs y cefamicinasas aisladas en el trienio 1997-99

	1997	1998	1999	TOTAL
<i>Escherichia coli</i>	n = 2816	n = 2606	n = 2283	n = 7705
TEM-12	0	0	1 (0,04)	1 (0,01)
TEM-10	0	0	1 (0,04)	1 (0,01)
SHV-2	4 (0,14)	1 (0,04)	1 (0,04)	6 (0,08)
CTX-M-9	4 (0,14)	14 (0,54)	9 (0,39)	27 (0,35)
Sub Total	8 (0,28)	15 (0,58)	12 (0,53)	35 (0,45)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n = 240	n = 235	n = 214	n = 491
SHV-2	0	2 (0,85)	6 (2,80)	8 (1,63)
CMY-2	0	0	1 (0,47)	1 (0,47)
Sub Total	0	2 (0,85)	7 (3,27)	9 (1,83)
<i>Salmonella enterica</i>	n = 242	n = 316	n = 355	n = 913
CTX-M-9	1 (0,42)	0	0	1(0,10)
CMY-2	0	0	1 (0,28)	1 (0,10)
Sub Total	1 (0,42)	0	1 (0,28)	2 (0,20)
<i>Proteus mirabilis</i>	n = 350	n = 318	n = 280	n = 948
CMY-2	0	0	1 (0,36)	1 (0,11)
Sub Total	0	0	1 (0,36)	1 (0,11)
TOTAL	3648	3475	3122	10057
TEM-12	0	0	1 (0,03)	1 (0,01)
TEM-10	0	0	1 (0,03)	1 (0,01)
SHV-2	4 (0,11)	3 (0,09)	7 (0,22)	14 (0,14)
CTXM-9	5 (0,16)	14 (0,40)	9 (0,29)	28 (0,28)
CMY-2	0	0	3 (0,10)	3 (0,03)
Total	9	17	21	47