

Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela

Daniel Marcano,¹ Andreína De Jesús,² Luis Hernández² y Luis Torres²

Forma de citar

Marcano D, De Jesús A, Hernández L, Torres L. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):529-34.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la frecuencia de los mecanismos enzimáticos asociados a sensibilidad disminuida a los antibióticos betalactámicos de amplio espectro en aislados de enterobacterias obtenidos de centros hospitalarios de Caracas, Venezuela.

Métodos. Se realizó un estudio transversal con enterobacterias aisladas de pacientes de ocho centros hospitalarios de Caracas, Venezuela, desde el 15 de octubre de 2009 al 15 de enero de 2010. La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales, y la susceptibilidad a los antimicrobianos mediante antibiograma (Kirby-Bauer), según las normas de 2010 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. La detección de los genes de resistencia a betalactámicos se realizó mediante amplificación por reacción en cadena de polimerasa.

Resultados. De 1 235 aislados, 207 (16,8%) mostraron resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación o a carbapenemes o a ambos. De esos, 93,8% presentaron fenotipo betalactamasa de espectro extendido (BLEE); 4,3%, fenotipo AmpC dereprimido, y 1,9%, fenotipo carbapenemasa. La caracterización de los dos primeros fenotipos determinó que 36,7% eran tipo SHV; 22,3%, grupo CTX-M-1; 21,7%, tipo TEM; 5,2%, grupo CTX-M-1 + impermeabilidad; 4,5%, combinación de dos enzimas; 4,3%, grupo CTX-M-2; 3,4%, tipo PER, y 1,9%, tipo KPC. Se observó un predominio del tipo SHV en las cepas obtenidas de hospitales públicos y del grupo CTX-M-1, en los privados.

Conclusiones. De los mecanismos enzimáticos investigados, el tipo SHV fue el más frecuente, seguido del grupo CTX-M-1 y tipo TEM. Asimismo, se encontró un alto porcentaje de carbapenemasas tipo KPC. Este es uno de los pocos estudios multicéntricos realizados en Venezuela donde se evalúa la frecuencia de este tipo de mecanismo de resistencia a los antimicrobianos, incluida la caracterización fenotípica y molecular. Se demostró que los métodos de detección requieren una interpretación adecuada de los perfiles de sensibilidad y la confirmación molecular del mecanismo presente.

Palabras clave

Enterobacteriaceae; resistencia beta-lactámica; beta-lactamasas; Venezuela.

¹ Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela. La correspondencia debe dirigirse a: danielmarcano2000@yahoo.com

² Universidad Central de Venezuela, Cátedra de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, Caracas, Venezuela.

Durante las últimas décadas se han descrito enzimas que aumentaron la resistencia de las enterobacterias a los fármacos betalactámicos, entre ellas las betalactamasas tipo TEM, SHV, CTX-

M, OXA, VEB, KPC, VIM y GES (1). La gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto período y la aparición de nuevas enzimas han cambiado de forma importante la

epidemiología de la resistencia a los betalactámicos en las cepas de la familia Enterobacteriaceae (2), por lo tanto, es importante examinar la frecuencia de estos tipos de betalactamasas, su distribución epidemiológica en el medio hospitalario y la difusión de los mecanismos de resistencia (3-4). Esta investigación tuvo como objetivo determinar la frecuencia de los mecanismos enzimáticos de las enterobacterias implicados en la reducción de la sensibilidad a los antibióticos betalactámicos de amplio espectro y describir la distribución de estos mecanismos en la familia Enterobacteriaceae y la posible asociación de estos aislados con hospitales y tipo de servicio.

MÉTODO

Recolección de aislados

Se realizó un estudio transversal en el que se analizaron 207 aislados de enterobacterias obtenidos de muestras clínicas provenientes de ocho centros de salud de Caracas: Hospital Universitario, Hospital de Clínicas, Hospital Vargas, Instituto Médico la Floresta, Centro Médico Docente la Trinidad, Hospital Domingo Luciani, Hospital de Niños y Laboratorio Clínico Urológico San Román. El criterio de selección de las cepas de enterobacterias fue susceptibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación (resistencia intermedia o resistente) o carbapenemes (halos de 21 mm o menores, en el caso del imipenem), obtenidas entre el 15 de octubre de 2009 y el 15 de enero de 2010. Los datos epidemiológicos se obtuvieron del registro interno de cada centro hospitalario, y las muestras fueron irreversiblemente anonimizadas.

Ensayos de susceptibilidad

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de Kirby-Bauer según las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) (5). Los antibióticos evaluados fueron: amoxicilina/ácido clavulánico, 20 µg; cefotaxima, 30 µg; ceftazidima, 30 µg; piperacilina/tazobactam, 30 µg; imipenem, 10 µg; ertapenem, 10 µg; cefpodoxima, 10 µg; aztreonam, 30 µg; cefepima, 30 µg; ampicilina, 10 µg; cefoxitina 30 µg, y meropenem, 10 µg. Todos los discos y el agar Mueller-Hinton empleados fueron

marca Oxoid®. La detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó mediante el método de difusión de doble disco (5) con amoxicilina/ácido clavulánico a una distancia de 25 mm de discos de cefotaxima y ceftazidima. La detección de carbapenemasas se realizó mediante el método de doble difusión de disco con imipenem y meropenem a una distancia de 15 mm de un disco con 300 µg de ácido 3-aminofenilborónico (Sigma-Aldrich®) para las carbapenemasas 2f y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich®) para las metalobetalactamasas (6). Para la detección de betalactamasas tipo AmpC en cepas de *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Citrobacter freundii* se observó el achatamiento del halo de inhibición de cefalosporinas de tercera generación dispuestas a una distancia de 25 mm de un carbapenem (6).

Confirmación de patrones fenotípicos

Se utilizó la prueba de Hodge para confirmar la producción de betalactamasas mediante la inoculación de una placa

de agar Mueller-Hinton con una suspensión 0,5 estándar de turbidez de McFarland de *Escherichia coli* ATCC 25922; se colocó el betalactámico que se evaluaría en el centro de la placa, y se inoculó una estría de la cepa en estudio desde el disco hasta el borde de la placa. Los resultados se interpretaron como positivos si se observaba alteración en forma de trébol del borde del halo de inhibición en el área cercana al crecimiento de la cepa en estudio (7).

Caracterización genotípica

Se confirmó la presencia de genes codificantes para la producción de diferentes enzimas asociadas con resistencia a betalactámicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Los iniciadores empleados se muestran en el cuadro 1 (8-14).

El ADN bacteriano se obtuvo mediante lisis celular por ebullición de una suspensión de dos colonias de la cepa en estudio en 100 µl de agua calidad PCR durante 20 minutos y centrifugadas posteriormente por 2 minutos. Las

CUADRO 1. Iniciadores empleados para la detección de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en enterobacterias, Caracas, Venezuela, octubre de 2009 a enero de 2010

Enzima	Secuencia	Amplicon (pares de bases)	Referencia
16S Forward	5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'	370	8
16S Reverse	5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'		
PER Forward	5'-GTAGTATCAGCCCAATCCCC-3'	739	9
PER Reverse	5'-CCAATAAAGGCCGCGTCCATCA-3'		
OS(SHV) Forward	5'-TCGGGCCGCGTAGGCATGAT-3'	626	10
OS(SHV) Reverse	5'-GCAGGGCCACAATCCCAGC-3'		
OT(TEM) Forward	5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTTA-3'	504	10
OT(TEM) Reverse	5'-TAATTGTTGCCGGGAAGCTA-3'		
Grupo CTXM-2 Forward	5'-CGGAATTCATGATGACTCAGAGCATTTCG-3'	900	9
Grupo CTXM-2 Reverse	5'-GCTCTAGATTATTGCATCAGAAACCGTG-3'		
SME Forward	5'-AACGGCTTCATTTTTGTTAG-3'	831	11
SME Reverse	5'-GCTTCCGCAATAGTTTTATCA-3'		
GES Forward	5'-GAAAAGCAGCTCAGATCG-3'	580	9
GES Reverse	5'-CAACAACCAATCTTTAGCA-3'		
Grupo CTXM-1 Forward	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	551	12
Grupo CTXM-1 Reverse	5'-ACCGGATATCCTTGGT-3'		
Grupo CTX-M-8 Forward	5'-TGAATACCTCAGCCACACG-3'	923	12
Grupo CTX-M-8 Reverse	5'-TAGAATTAATAACCGTCGGT-3'		
Grupo CTX-M-9 Forward	5'-GTGACAAAGAGAGTGCAACGG-3'	857	12
Grupo CTX-M-9 Reverse	5'-ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC-3'		
Grupo CTX-M-10 Forward	5'-CCGCGCTACACTTTGTGGC-3'	962	12
Grupo CTX-M-10 Reverse	5'-TTACAAACCGTTGGTGACG-3'		
VIM F	5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'	261	13
VIM R	5'-ATGAAAGTGCCTCCAGAC-3'		
IMP F	5'-TCGTTTGAAGAAGTTAACG-3'	527	14
IMP R	5'-TTGGAACAACCAAGTTTTGC-3'		
KPC F	5'-ATGTCAGTATCGCCGTCT-3'	893	14
KPC R	5'-TTTTCCAGAGCCTTACTGCC-3'		

reacciones de amplificación se realizaron con: 35,2 µl de agua calidad PCR, 5 µl de tampón de PCR sin MgCl₂ (10X), 1,5 µl de MgCl₂ (25 milimolar (mM), 1 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) (10 picomol/µl), 1 µl de iniciador 1 (10 picomol/µl), 1 µl de iniciador 2 (10 picomol/µl), 0,3 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl) y 5 µl de templado. Todos los reactivos empleados fueron marca Invitrogen® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). El programa empleado en el miniciclador térmico de gradiente personal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) contempló un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, y la amplificación se llevó a cabo por 30 ciclos, con pasos de desnaturalización (30 segundos a 94 °C), alineación (30 segundos a 53 °C para IMP; 55 °C para TEM, grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-8, grupo CTX-M-9, grupo CTX-M-10, GES, KPC y PER; 57 °C para SME y VIM, y a 59 °C para SHV) y extensión (30 segundos a 72°C), y un paso final de extensión de 5 minutos a 72° C. Para verificar que la extracción del ADN bacteriano se realizó en condiciones adecuadas, se amplificó con primer universal 16S (15). Los productos finales de amplificación fueron detectados en gel de agarosa 1,2% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA), teñido con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de ji al cuadrado (χ^2) mediante el programa SPSS® 12.0.

Aspectos bioéticos

El estudio se realizó con cepas derivadas de muestras clínicas tomadas para procedimientos diagnósticos y anonimizadas de manera irreversible. La investigación cumple con los principios fundamentales de la bioética y los establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (16), la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (17), las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica (18), la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela (19) y la Ley Orgánica de Salud de Venezuela (20).

CUADRO 2. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en enterobacterias por centro de salud, Caracas, Venezuela, octubre 2009–enero 2010

Centro de salud	No. total de aislados de enterobacterias	No. de aislados seleccionados	Frecuencia (%)
HVC	142	23	16.2
HUC	360	62	17.2
HDL	193	32	16.6
HJMDLR	147	23	15.6
HCC	110	17	15.5
LAICUT	35	05	14.3
IMLF	116	20	17.2
CMDLT	132	25	18.9
TOTAL	1 235	207	16.8

HVC: Hospital Vargas de Caracas, HUC: Hospital Universitario de Caracas, HDL: Hospital "Dr. Domingo Luciani", HJMDLR: Hospital "J. M. De los Ríos", HCC: Hospital de Clínicas Caracas, LAICUT: Laboratorio Clínico Urológico San Román, IMLF: Instituto Médico La Floresta, CMDLT: Centro Médico Docente La Trinidad.

RESULTADOS

Recolección de aislados

De 1 235 enterobacterias aisladas entre el 15 de octubre de 2009 y el 15 de enero de 2010 en los hospitales seleccionados, sólo 207 cumplieron los criterios de selección. La frecuencia de cepas que presentaban enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos fue 16,8%, tal como figura en el cuadro 2.

Estudio fenotípico y susceptibilidad

Del total de cepas seleccionadas, 100% fueron resistentes a ampicilina, 95,7% a cefpodoxima y 24,6% a cefoxitina. Con respecto a las cefalosporinas de amplio espectro, se observó 82,1% de resistencia a ceftazidima, 91,8% a cefotaxima y 26,6% a cefepima. Asimismo, 71,0% de los aislados presentaron resistencia al aztreonam. Con relación a los carbapenems, se encontró 14,0% de resistencia a ertapenem, 3,8% a meropenem y 0,5% a imipenem. En cuanto a las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, 20,8% de los aislados fueron resistentes a piperacilina/tazobactam y 67,0% a amoxicilina/ácido clavulánico.

La frecuencia de mecanismos enzimáticos capaces de hidrolizar betalactámicos de amplio espectro fue de 16,8%, que se distribuyó como sigue: fenotipo BLEE, 93,8%; fenotipo AmpC derreprimido, 4,3%, y fenotipo carbapenemasa 1,9%. En la mayoría de los centros de salud participantes, estas enzimas estuvieron presentes en un alto porcentaje de aislados de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Los 12 aislados que presentaron perfil de resistencia por carbapenemasa fueron evaluados mediante la prueba de Hodge con imipenem y meropenem y mediante combinación de carbapenems con inhibidores (EDTA y ácido 3-aminofenilborónico). De estos 12 aislados, 62,5% dieron resultados positivos para la prueba de Hodge, y 100% presentaron sinergia con el ácido 3-aminofenilborónico; ningún aislado presentó sinergia con EDTA.

Estudios moleculares

La caracterización de los fenotipos BLEE y carbapenemasa dio como resultado que 36,7% eran tipo SHV; 22,3%, grupo CTX-M-1; 2,7%, tipo TEM; 5,2%, grupo CTX-M-1% + impermeabilidad; 4,5%, combinación de dos enzimas; 4,3%, grupo CTX-M-2; 3,4% tipo PER, y 1,9%, tipo KPC. En los hospitales públicos prevaleció el mecanismo enzimático tipo SHV, mientras que en las clínicas privadas fue el grupo CTX-M-1, como se aprecia en el cuadro 3. El estudio estadístico mostró una relación estadísticamente significativa entre el mecanismo enzimático y el tipo de institución ($P < 0,05$). Los aislados que presentaron dos enzimas simultáneamente se distribuyeron de la siguiente manera: PER + TEM, 28,4%; KPC+SHV, 14,2%; KPC + CTX-M-1, 14,2%; AmpC + SHV, 13,1%; AmpC + TEM, 13,1%; CTX-M-1 + SHV, 7,5; CTX-M-1 + CTX-M-2, 7,3%; TEM + SHV, 1,6%, y TEM + CTX-M-2, 0,6%.

Al evaluar cada mecanismo enzimático en relación con el género y especie de los aislados (cuadro 4), observamos que la BLEE tipo SHV se presentó con más

CUADRO 3. Principales mecanismos enzimáticos de resistencia a betalactámicos en enterobacterias distribuidos por centro de salud, Caracas, Venezuela, octubre 2009–enero 2010

Centro de salud	Tipo de centro	Mecanismo enzimático (%)		
		1°	2°	3°
HVC	Público	Tipo SHV (43.5)	Grupo CTX-M1 (30.4)	Tipo TEM (8.7)
HUC	Público	Tipo SHV (24.2)	Tipo TEM (21.0)	Tipo AmpC (17.7)
HDL	Público	Tipo SHV (28.1)	Tipo TEM (21.8)	Grupo CTX-M1 (15.6)
HJMDLR	Público	Tipo SHV (30.4)	Tipo TEM (26.1)	Grupo CTX-M1 (21.7)
HCC	Privado	Grupo CTX-M1 (29.4)	Tipo TEM (23.5)	Tipo SHV (11.7)
LAICUT	Privado	Grupo CTX-M1 (33.3)	Tipo TEM (33.3)	Grupo CTX-M2 (33.3)
IMLF	Privado	Grupo CTX-M1 (30.0)	Tipo SHV (25.0)	Tipo TEM (20.0)
CMDLT	Privado	Grupo CTX-M1 (37.1)	Tipo SHV (22.9)	Tipo TEM (8.5)

HVC: Hospital Vargas de Caracas, HUC: Hospital Universitario de Caracas, HDL: Hospital "Dr. Domingo Luciani", HJMDLR: Hospital "J. M. De los Ríos", HCC: Hospital de Clínicas Caracas, LAICUT: Laboratorio Clínico Urológico San Román, IMLF: Instituto Médico La Floresta, CMDLT: Centro Médico Docente La Trinidad.

frecuencia en cepas de *E. coli*, mientras que la BLEE tipo TEM fue más frecuente en especies del género *Klebsiella*. Las carbapenemasas se presentaron principalmente en aislados de *E. cloacae*, y AmpC derreprimido, en los de *S. marcescens*. La relación entre la presencia del mecanismo enzimático y las especies aisladas es estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Se analizaron por separado las cepas obtenidas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados. Se encontró que 71,9% de los aislamientos provenían de pacientes hospitalizados y 28,1% de la comunidad. La relación entre el mecanismo enzimático y la proveniencia de las cepas fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la proporción (16,8%) de cepas con susceptibilidad disminuida a betalactámicos de espectro extendido no difiere demasiado de lo descrito en otros informes acerca de la prevalencia de BLEE en enterobacterias (21). Al ca-

racterizar la resistencia de estas cepas a nivel fenotípico, encontramos que las BLEE clásicas que se pueden inhibir con ácido clavulánico son el principal mecanismo involucrado, seguido del fenotipo AmpC derreprimido. Sin embargo, un porcentaje mayor de lo esperado correspondía a la resistencia conferida por serinocarbenemasas, sobre todo, si se toma en cuenta que estudios anteriores reflejaban 100% de sensibilidad a los carbapenemes en Caracas (21). Esto demuestra cuán variante puede ser la situación en diferentes cortes en el tiempo, en relación con el uso de antibióticos y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.

La caracterización genotípica de estos mecanismos indicó que las dos principales BLEE encontradas fueron tipo SHV y grupo CTX-M-1; esto es compatible con los porcentajes de resistencia a ceftazidima y cefotaxima encontrados, en vista de que las variantes tipo SHV pueden aumentar de manera uniforme la resistencia a ambos antibióticos o tener actividad cefotaximasa, también

presente en el genotipo CTX-M. Esto explicaría que, aunque no existe gran diferencia entre la resistencia a ceftazidima y cefotaxima encontrada, la última es un poco más alta. También es importante destacar que todos los fenotipos compatibles con serinocarbenemasas encontrados correspondían a enzimas tipo KPC, genotipo que ha estado adquiriendo importancia a nivel mundial en relación con la resistencia de las enterobacterias a carbapenemes en los dos años más recientes (22). Vale la pena resaltar que se encontraron enzimas tipo KPC con mayor frecuencia en aislados de *E. cloacae* que en los de *K. pneumoniae*.

Al analizar los datos concernientes a la distribución por género y especie de las cepas BLEE, observamos que las de *E. coli* son las más frecuentes en la mayoría de los centros asistenciales estudiados, lo cual es compatible con la alta frecuencia que presenta tradicionalmente este tipo de genes de resistencia en esta especie (23). En segundo lugar como productoras de BLEE se encuentran las cepas de *K. pneumoniae*. En este estudio se ha encontrado un porcentaje importante (8,2%) de aislados de *E. cloacae* con BLEE, por lo que cabe hacer un llamado de atención sobre los lineamientos de las pruebas de tamizaje de BLEE en enterobacterias, para no pasar por alto la detección de estas enzimas que podrían ser causa de falla terapéutica.

La frecuencia de los distintos genotipos en hospitales y clínicas señala que en las instituciones públicas es más frecuente el genotipo SHV, mientras que en las privadas es el genotipo grupo CTX-M-1. Esto probablemente se deba a diferencias entre los esquemas terapéuticos empleados en ambos tipos de instituciones, lo cual podría determinar fenómenos de presión selectiva. Por otro

CUADRO 4. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en enterobacterias por género y especie, Caracas, Venezuela, octubre 2009–enero 2010

Microorganismo	No.	Tipo de enzima (%)						
		Tipo SHV	Tipo TEM	Grupo CTX-M-1	Grupo CTX-M-2	Tipo PER	Tipo KPC	Tipo AmpC
<i>Escherichia coli</i>	108	54,4	0	38,6	2,0	0	0	5,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	47	0	63,8	12,8	6,4	14,9	2,1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	100	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0	100	0	0	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0	1(10)	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	13,3	66,7	0	0	0	20	0
<i>Serratia marcescens</i>	20	30	10	5	5	0	0	50
<i>Proteus mirabilis</i>	8	33,4	0	33,3	33,3	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1(2)	0	0	1(2)	0	0	0

lado, cuando se analiza la distribución de BLEE según especie, se aprecia que, con la excepción del genotipo AmpC asociado a géneros particulares, como *Enterobacter* y *Serratia*, al tratarse de una mutación de un mecanismo cromosómico, podemos encontrar el resto de los genotipos BLEE en casi todas las demás especies de enterobacterias. Por ello es importante determinar la frecuencia genotípica de estas enzimas en las especies circulantes en cada centro para optimizar las pautas terapéuticas. De estas cepas, la mayoría provenía de pacientes hospitalizados, lo cual es de esperar, debido a la presión selectiva a la que son sometidas en el ambiente nosocomial. Sin embargo un porcentaje importante (26,1%) fueron aislamientos de pacientes ambulatorios, lo cual debe tomarse en cuenta al elegir el tratamiento empírico para un paciente de la comunidad.

Limitaciones

El tiempo de recolección de muestras, la distribución geográfica de los centros hospitalarios y por ende el tamaño muestral fueron las mayores limitaciones de este trabajo, que surgieron principalmente por la complejidad logística de trabajar simultáneamente con varias instituciones hospitalarias y un número creciente de aislamientos. Otra limitación importante fue la falta de un servicio de secuenciación para hacer una

mayor caracterización de los genes de resistencia encontrados.

Conclusiones y recomendaciones

Este es uno de los pocos estudios multicéntricos realizados en Venezuela donde se evalúa la frecuencia de los mecanismos de resistencia, incluido el estudio fenotípico y molecular. Se encontró un porcentaje importante de cepas productoras de BLEE, principalmente, los genotipos SHV y CTX-M; además, se destacó la aparición de carbapenemasas tipo KPC en nuestro país. Estos hallazgos, sumados al hecho de que la distribución de las cepas productoras de BLEE en los servicios de hospitalización es mayoritaria, demuestra que existen factores inherentes a cada centro hospitalario que podrían favorecer la presencia de estas enzimas. Además, se demostró que los métodos de detección de BLEE requieren una interpretación adecuada de los perfiles de sensibilidad y la confirmación molecular del mecanismo presente, debido a sus implicaciones terapéuticas y epidemiológicas.

Por último, a partir de los resultados obtenidos en el estudio y las limitaciones encontradas se ofrecen las siguientes recomendaciones:

1. Ampliar el muestreo a otros centros hospitalarios y por un período más largo.

2. Continuar el trabajo de vigilancia epidemiológica, de modo que sirva para realizar el seguimiento del comportamiento de la resistencia bacteriana a betalactámicos en los diferentes centros de atención de la salud de Caracas, para así establecer medidas de prevención de la propagación de dichos mecanismos.

Agradecimientos. Este estudio ha sido posible gracias al apoyo financiero del Comité de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) mediante el proyecto grupal N° 09.00.6795.2007. La captación de los aislados en estudio fue posible gracias a la colaboración del personal de las diferentes secciones de bacteriología: Sandra Fernández (Centro Médico Docente La Trinidad), Evelyns Villaroel (Hospital Universitario de Caracas), Carolina Macero (Instituto Médico La Floresta), Ninoska Montilla (Hospital Dr. Domingo Luciani), Juana Papatzikos (Hospital de Clínicas Caracas), Nirvia Cuaical (Hospital J.M. de los Ríos), Doryana Correa (Hospital Dr. José María Vargas) y Adriana Lugo (Laboratorio Clínico Urológico San Román). Estos agradecimientos también se extienden al personal docente y técnico de la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, por su apoyo técnico y logístico durante la realización de este estudio.

REFERENCIAS

1. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 8ª Ed. American Society for Microbiology. ASM Press, Washington, DC 2003.
2. García J, Rodríguez E, Carpio C, et al. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de enterobacterias nosocomiales productoras de betalactamasas de espectro expandido, Cumaná, estado Sucre. *Kasmera*. 2009;37(1):38-50.
3. Salyers A, Cuevas C. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Chemother.* 1997;41(11):2321-5.
4. Lennette E. Manual of Clinical Microbiology 4ª ed. Pp. 206-10. Washington D.C. Editorial American Society for Microbiology.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Documento M100-S20. CLSI, Wayne, PA, 2010.
6. Martínez D. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2009;29(2):78-83.
7. Fernandez E, Bustamante Z, Zamora J, et al. Determining carbapenemas and its relationship to genetic structures in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* at hospitals in the city of Cochabamba. *Biofarbo*. 2009;17(1):30-8.
8. Greisen K. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994;32:335-35.
9. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace M, Bru A, Rossi A, et al. Plasmidic extended-spectrum -Lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1462-8.
10. Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiology Letters.* 1991;19:19-26.
11. Queenan AM, et al. SME-type carbapenem-hydrolysing class A -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:3035-9.
12. González-Mejía E, Valenzuela E, Mantilla-Anaya J, Leal-Castro A, Saavedra-Trujillo C, Eslava-Schmalbach J, et al. Resistencia a cefepime en aislamientos de *Enterobacter cloacae* provenientes de hospitales de Bogotá, Colombia. *Rev de Salud Publica.* 2006;8(2):191-9.
13. Miriagou V, et al. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:395-7.
14. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM- and SHV- derived extended-spectrum -lactamase: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35:7-22.
15. Perozo A, Castellano M. Detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. *Kasmera*. 2009;37(1):25-37.
16. OMS. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 1990. Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10polices/b3/index.html> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
17. ONU, UNESCO. Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos. Artículos

- 19, 22 y 23. 2006. Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001461/146180s.pdf> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
18. OMS. Guías operacionales para Comités de Ética que evalúan Investigación Biomédica. 2000. Disponible en: http://www.fhi.org/NR/rdonlyres/e3yk6pi242riyvoz6kqk3273pebj2ojun7poy3hsfymhr553yqoknbcbj3pc7i2k756ljwjjtnp/OMS_GuiasoperacioSP.pdf Acceso el 1 de septiembre de 2011.
19. Constitución de la República Bolivariana de Venezuela. Gaceta Oficial Número 36.860. 1999. Disponible: <http://web.pnuma.org/gobernanza/cd/Biblioteca/Gobernanza%20Ambiental/normativa%20venezolana/CONSTITUCION.doc> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
20. Ley Orgánica de Salud. República Bolivariana de Venezuela. Gaceta Oficial Número 36.579. 1998. <http://www.defiendete.org/html/de-interes/LEYES%20DE%20VENEZUELA/LEYES%20DE%20VENEZUELA%20II/LEY%20ORGANICA%20DE%20SALUD.htm> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
21. Torres L, Gagliotta V, Torres O, et al. -lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2006;26(2):80-8.
22. Lartigue M, Poirel L, Poyart C. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:315-7.
23. Giamarellou H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(Supl. 4):1-16.

Manuscrito recibido el 4 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 31 de octubre de 2011.

ABSTRACT

Frequency of enzymes associated with reduced sensitivity to beta-lactam antibiotics in enterobacteria isolates, Caracas, Venezuela

Objective. To determine the frequency of enzymatic mechanisms associated with reduced sensitivity to broad-spectrum beta-lactam antibiotics in enterobacteria isolates obtained at hospital centers in Caracas, Venezuela.

Methods. A cross-sectional study was conducted on enterobacteria isolated from patients at eight hospital centers in Caracas, Venezuela, from 15 October 2009 to 15 January 2010. The species were identified using conventional biochemical tests, and their susceptibility to antimicrobial drugs was assessed by antibiogram (Kirby-Bauer method), using the 2010 performance standards published by the Clinical and Laboratory Standards Institute. Beta-lactam-resistant genes were detected using an enhanced polymerase chain reaction assay.

Results. Of 1 235 isolates, 207 (16.8%) exhibited resistance to third- and fourth-generation cephalosporins, carbapenems, or both. They presented the following phenotypes: extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), 93.8%; depressed AmpC, 4.3%; and carbapenemase, 1.9%. Further characterization of the first two phenotypes yielded the following breakdown of types: SHV, 36.7%; CTX-M-1 group, 22.3%; TEM, 21.7%; CTX-M-1 group with impermeability, 5.2%; two-enzyme combinations, 4.5%; CTX-M-2 group, 4.3%; PER, 3.4%; and KPC, 1.9%. The SHV type was predominant in the public hospital strains, whereas the CTX-M-1 group was most common in the strains from the private hospitals.

Conclusions. Of the enzymatic mechanisms investigated, the SHV type was the most frequent, followed by the CTX-M-1 group and the TEM type. Also, a high percentage of type KPC was found. The research reported here is one of only a few multicenter studies that have been conducted in Venezuela to evaluate the frequency of this type of antimicrobial resistance mechanism, including phenotypical and molecular characterization. It was shown that the detection methods require proper interpretation of sensitivity profiles and molecular confirmation of the mechanism present.

Key words

Enterobacteriaceae; beta-lactam resistance; beta-lactamases; Venezuela.