



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

GENES CODIFICADORES DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO
TIPOS CTX-M, TEM Y SHV EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* AISLADAS
DE PACIENTES CON INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA
(Modalidad: Investigación)

CARMEN VICTORIA CARPIO TRUJILLO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

Cumaná, julio de 2010

GENES CODIFICADORES DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO
TIPOS CTX-M, TEM Y SHV EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* AISLADAS
DE PACIENTES CON INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA

APROBADO POR:



Profa. Miliza Guzmán Lista
Asesora Académica



ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Muestras	7
Reactivación de las cepas.....	7
Confirmación bacteriológica.....	7
Susceptibilidad antimicrobiana.....	8
Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	9
Detección de los genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} y <i>bla</i> _{CTX-M}	10
Extracción de ADN.....	10
Amplificación de los genes que codifican β -lactamasas de espectro extendido tipo 2be (TEM, SHV y CTX-M).....	10
Genes <i>bla</i> _{SHV}	10
Genes <i>bla</i> _{TEM}	11
Genes <i>bla</i> _{CTX-M}	11
Electroforesis.....	12
Control de calidad	12
Análisis Estadístico	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXO.....	34
HOJA DE METADATOS	36

DEDICATORIA

A:

Mis padres, Adoración y Ramón, por siempre estar conmigo cada vez que los necesito, este esfuerzo es por ustedes y para ustedes, los quiero mucho.

Mi hermano José, espero servirle como inspiración y ejemplo a seguir para alcanzar sus sueños y metas.

Mi esposo Jhonny, por brindarme su amor y apoyo incondicional en todo momento, nunca es tarde para terminar de realizar nuestras metas y sueños mi amor, te amo.

Mis amigos, Karol Bottaro, Marielys González, Rita Loero, Olymar Marchán, Jesús Rodríguez, Saray Ortiz, Antonieta Hernández, Candy Patiño y Dairene Moreno, esta vida no sería igual sin ustedes.

AGRADECIMIENTO

A:

Mi Dios, por darme paciencia y fortaleza para superar todos los momentos difíciles y por guiarme a mí y a mi asesora hacia el logro de esta gran meta.

Mi asesora, la Dra. Militza Guzmán Lista, por brindarme su incondicional ayuda, apoyo y dedicación para la realización de esta investigación, nuestra investigación.

Mi amigo Eliosmar Rodríguez, por asistirme incontables veces con sus conocimientos y consejos a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colocaron un granito de arena para que este sueño se hiciera realidad.

Mil gracias

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , obtenidos en diferentes áreas de hospitalización del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, junio 2003 - marzo 2004.....	8
Tabla 2. Resistencia a β -lactámicos y producción de β -lactamasas de espectro extendido en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , provenientes de pacientes con infección intrahospitalaria, recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.....	15
Tabla 3. Genes codificadores de β -lactamasas de espectro extendido detectados en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes de pacientes con infección nosocomial, recluidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.	18
Tabla 4. Características de las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, recluidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”	19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje de resistencia a β -lactámicos en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria. ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriazona, CTX: cefotaxima, TZP: piperacilina/tazobactan FEP: cefepima. 14
- Figura 2.** Distribución de genes codificadores de enzimas β -lactamasas de espectro extendido, detectados en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. *bla*_{SHV}: β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV, *bla*_{TEM}: β -lactamasas de espectro extendido tipo TEM, *bla*_{CTX-M}: β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M..... 16
- Figura 3.** Productos de la amplificación del gen *bla*_{SHV}, en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **A.** Líneas 1 a 13. *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo), 01, 02, 03, 04, 05, 06,07,08, 09, 10, *E. coli* J62-2 (Control negativo), Control negativo sin ADN. **B.** Líneas 1 a 12. *E. coli* J62-2 (Control negativo), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo), 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20. M: Marcador de peso molecular. 16
- Figura 4.** Productos de amplificación del gen *bla*_{TEM} en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **A.** Líneas 1 a 17. *E. coli* J62-2 (Control negativo), 06, 07,08,09,11,10,12,14,18, 13, 15,16,17,19, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo). **B.** Líneas 1 a 7. *E. coli* J62-2 (Control negativo), 01, 02, 03, 04, 05, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo). M: Marcador de peso molecular. 17
- Figura 5.** Productos de amplificación del gen *bla*_{CTX-M} en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Líneas 1 a 22: *E. coli* J62-2 (Control negativo), 01, 02, 03, 05, 09, 06, 11, 13, 07, 15, 08, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, *E. coli* 2944NR (Control positivo). M: Marcador de peso molecular. 17

RESUMEN

Con el propósito de identificar molecularmente la presencia de genes codificadores de enzimas β -lactamasas tipo TEM, SHV y CTX-M, se estudiaron 20 cepas bacterianas identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en Cumaná, estado Sucre. La susceptibilidad a los β -lactámicos y la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto Estándar de Laboratorios Clínicos (2008). La detección de genes codificadores de BLEE se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El estudio de la susceptibilidad mostró que el 90,00% de las cepas estudiadas fue resistente a ceftazidima y aztreonam, y 65,00% a cefotaxima y ceftriazona, mientras que a piperacilina/tazobactam y cefepima, mostraron un porcentaje de resistencia de un 25,00% y 20,00%, respectivamente. La frecuencia de cepas productoras de BLEE fue de 90,00%. Un 70,00% de los aislados mostró la presencia de los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, sólo en un 15,00% se detectó la presencia de los tres genes (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}) simultáneamente, a su vez se reveló la presencia del gen *bla*_{SHV} en un 10,00% y en un 5,00% mostró los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}. La presencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de enzimas β -lactamasas representan un riesgo para el centro hospitalario, ya que este mecanismo de resistencia puede diseminarse hacia otros géneros e incluso a otras familias, comprometiéndose el éxito terapéutico que pudieran tener las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y cefepima.

Palabra y/o Frases Claves: *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamasas de espectro extendido, Cefalosporinas de tercera y cuarta generación, Reacción en cadena de la polimerasa.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrahospitalarias causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos constituyen un problema de salud pública de carácter mundial que se ha agudizado, en los últimos años, en los diferentes centros hospitalarios, reflejándose con mayor incidencia en las áreas de hospitalización, especialmente, en las unidades de cuidados intensivos, situación que se ve reflejada en los altos costos hospitalarios, complicaciones médicas y en las tasas de morbilidad y mortalidad (Livermore *et al.*, 2007).

El uso indiscriminado e inadecuado de los antimicrobianos en los centros hospitalarios ha conllevado a la aparición de bacterias patógenas resistentes y, por consiguiente, a la desaparición de cepas sensibles, razón por la cual, las bacterias que se aíslan normalmente de pacientes hospitalizados presentan, con frecuencia, resistencia a diferentes tipos de antimicrobianos (Gobernado, 2005).

Un gran número de especies de la familia *Enterobacteriaceae* presentan variabilidad en sus patrones de resistencia, condición que es generada por la transferencia de genes que se encuentran codificados en elementos genéticos como plásmidos conjugativos, transposones e integrones, condición que facilita su diseminación, no sólo entre cepas de la misma especie, sino también entre bacterias de distintos géneros y grupos (García, 2008).

Los β -lactámicos, por ser altamente eficaces, tener baja toxicidad y ser de amplio espectro, son los antimicrobianos de primera línea empleados en el tratamiento de las infecciones intrahospitalarias causadas por bacilos Gram negativos; sin embargo, la efectividad de los mismos ha sido afectada por los distintos mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias (Giamanellou, 2005; Denton, 2007).

Los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y, del mismo modo, un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos en diversas especies bacterianas. El intercambio de material genético entre poblaciones bacterianas, permite la adquisición de características fenotípicas que originan la aparición de cepas bacterianas con nuevos fenotipos, lo que puede resultar ventajoso, especialmente, si el ADN adquirido codifica resistencia a los agentes antimicrobianos (Ariffin *et al.*, 2004; Byarugaba, 2004).

En las bacterias Gram negativas existen diferentes mecanismos que confieren resistencia a este grupo de antimicrobianos, entre los más comunes se encuentran, alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa, disminución en la afinidad de los sitios blancos de la droga o de las proteínas fijadoras de penicilinas y la producción de enzimas β -lactamasas (Venezia *et al.*, 2005).

La producción de enzimas β -lactamasas constituye el principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos expresado entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, siendo *Klebsiella pneumoniae* uno de los patógenos intrahospitalarios prevalentes, capaz de resistir a la acción de un gran número de antibióticos β -lactámicos, situación que conlleva a importantes repercusiones clínicas y terapéuticas (Owens y Rice, 2006; Paterson, 2006).

Las β -lactamasas son un grupo complejo de enzimas con propiedades diferenciales de acuerdo al sustrato que hidrolizan, dependiendo de la localización del gen que codifica, la β -lactamasa puede ser cromosómica o plasmídica. Las β -lactamasas cromosómicas son universales en una bacteria específica, ya que forman parte del genoma bacteriano y se mantienen presentes en bacterias de una misma especie, mientras que las codificadas por plásmidos pueden encontrarse en diferentes especies

bacterianas, además, poseen la potencialidad de diseminarse mediante el proceso de conjugación bacteriana a cepas relacionadas o no, confiriéndole de esta manera a otros microorganismos un perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana múltiple (Gniadkouski, 2001).

Las enzimas β -lactamasas han sido clasificadas en base a su punto isoeléctrico, especificidad de sustrato y secuencia de aminoácidos, actualmente la clasificación más utilizada para estas enzimas ha sido la propuesta por Bush *et al.* (1995), donde se emplean los criterios de funcionalidad clásicos con los aspectos moleculares. El grupo 2b de la clasificación Bush, Jacoby y Medeiros, incluye a las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, también conocidas como β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), presentes generalmente en bacilos Gram negativos, las cuales, debido a mutaciones puntuales ocurridas en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de amplio espectro y a los monobactámicos, dando origen a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE, por tanto, pertenecen a la clase molecular A de Ambler y se incluyen dentro del grupo 2be propuesto en la clasificación (Ambler *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 2007).

Las BLEE presentan de 1 a 4 sustituciones de aminoácidos comparados con las enzimas originales, estas mutaciones puntuales provocan cambios en la configuración alrededor del sitio activo de la enzima, aumentando el espectro de su actividad hidrolítica y reduciendo la actividad de un amplio rango de β -lactámicos de espectro extendido, que incluyen a las cefalosporinas de tercera generación, al aztreonam y a cefepima, no siendo activas contra los carbapenemas (Bradford, 2001; Rice, 2001).

Actualmente, se han descrito más de 100 variantes de BLEE tipo TEM y SHV (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>), lo que da una idea de la gran diversidad evolutiva que han sufrido estas enzimas. Otros tipos de BLEE (CTX-M, PER, GE y OXA) han sido reportados en enterobacterias, las cuales presentan orígenes diferentes y

una escasa relación estructural con las TEM y SHV (Walsh *et al.*, 2005; Máttar y Martínez, 2007).

Las BLEE se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico (AC), propiedad que ha permitido su detección fenotípica a través de la producción de un fenómeno sinérgico, al aproximar los discos de cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima) a 15 mm del AC. Aún cuando la técnica fenotípica empleada para el tamizaje de las BLEE en los laboratorios clínicos, es la aproximación de discos, por ser un método rápido, económico y sensible para la detección de enterobacterias productoras de BLEE, la confirmación definitiva se realiza a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permitan identificar ampliamente los genes presentes que confieren a las bacterias resistencia a distintos antimicrobianos (Blásquez *et al.*, 1993; Murria *et al.*, 2003).

Hernández *et al.* (2003) realizaron una investigación en España, con el propósito de determinar la producción de BLEE en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de 40 hospitales ubicados en distintas áreas geográficas. Los resultados mostraron que el 16,70% de las cepas fueron productoras de estas enzimas.

Espinal *et al.* (2004), en Colombia, reportaron un 80,00% de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. El diagnóstico molecular reveló la presencia simultánea de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, resultando que el 93,30% de las cepas presentó la enzima SHV-5.

Así mismo, Hernández *et al.* (2006), en una investigación realizada en la unidad de terapia intensiva de un hospital de La Habana, encontraron que el 63,50% de las cepas eran productoras de BLEE, siendo *Klebsiella pneumoniae* el principal microorganismo aislado de las infecciones intrahospitalarias. Por otro lado, Mantilla *et al.* (2006), en Colombia, reportaron cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria portadoras del gen *bla*_{CTX-M}.

Araque *et al.* (2000), en la ciudad de Mérida-Venezuela, realizaron un estudio con 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de la unidad de cuidados intensivos del Hospital de la Universidad de los Andes. Los resultados revelaron la presencia de un plásmido de 87 kb que porta el gen *bla*_{SHV-5}, el cual codifica resistencia para cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación.

Por su parte, Guzmán *et al.* (2004) en estudio fenotípico realizado a cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en Cumaná, estado Sucre, reportaron un elevado porcentaje (76,40%) de cepas multirresistentes productoras de BLEE.

Torres *et al.* (2006) realizaron la detección fenotípica y molecular de BLEE a 224 aislados de enterobacterias provenientes de ocho centros de salud en Caracas. El 91,10% de las cepas analizadas fueron productoras de BLEE. El análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM) para ceftazidima, cefotaxima, cefepima y aztreonam mostró una mayor proporción de cepas productoras de BLEE con actividad ceftazidimasa.

Perozo y Castellano (2009) estudiaron la producción de BLEE en cepas de enterobacterias aisladas en el centro de referencia bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo. *Klebsiella pneumoniae* fue la especie que presentó mayor frecuencia en cuanto a la producción de BLEE. Al correlacionar la producción de BLEE con el servicio de atención del paciente, se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la producción de BLEE y la unidad de cuidados intensivos.

La diseminación de la resistencia antimicrobiana es considerada como un problema creciente a nivel mundial, que trae como consecuencia limitaciones en el tratamiento de los pacientes hospitalizados. Teniendo en consideración, que la producción de BLEE en enterobacterias es el principal mecanismo de resistencia contra

los β -lactámicos, el presente trabajo permitirá identificar, desde el punto de vista molecular, los genes codificadores de los tipos de BLEE del grupo 2be y el espectro hidrolítico presente en aislados intrahospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de pacientes asistidos en diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná.

METODOLOGÍA

Muestras

El presente estudio se realizó en 20 cepas bacterianas identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, recolectadas de pacientes con diagnóstico de infección intrahospitalaria e indicación de cultivo y antibiograma atendidos en las áreas de cirugía, retén, unidad de cuidados intensivos y medicina, del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA), durante el periodo comprendido entre junio del 2003 y marzo de 2004 (tabla 1). A cada cepa se le llenó una hoja informativa donde se representaban datos de interés (anexo 1). Para el momento del estudio, las cepas seleccionadas se encontraban preservadas en agar Luria Bertani (LB) (Sigma, USA) en el laboratorio de Bacteriología Molecular del Departamento de Bioanálisis, en la Universidad de Oriente, núcleo de Sucre.

Reactivación de las cepas

A partir del agar LB, se procedió a inocular las cepas en 2 ml de caldo LB a 37°C, durante un periodo de 18 a 24 horas en aerobiosis, posteriormente, se sembraron en agar MacConkey (AMC) (Himedia, India) con la finalidad de verificar la pureza y observar las características macroscópicas de las colonias, así como también, los cambios producidos en el mismo, el cual refleja la fermentación o no de la lactosa por parte de algunos microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Confirmación bacteriológica

El género y la especie se confirmaron mediante el protocolo de identificación convencional para enterobacterias (Koneman *et al.*, 2008), incluyendo las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de azúcares (medio Kligler), utilización del citrato (medio citrato de Simmon), producción de la enzima ureasa (agua peptonada), vía de fermentación de la glucosa (caldo rojo de metilo-Voges Proskauer), motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina (agar MIO) y descarboxilación de la lisina (caldo lisina).

Tabla 1. Características de los aislados de *Klebsiella pneumoniae*, obtenidos en diferentes áreas de hospitalización del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, junio 2003 - marzo 2004.

Cepa	Género	Estadía (Días)	Muestra	Terapia Previa	Servicio
01	F	48	Sangre	AMK, TCY, GEN, CAZ	UCI
02	F	41	Sangre	AMK, GEN, CAZ	UCI
03	M	39	Sangre	Ninguno	UCI
04	F	18	Secreción	Ninguno	Cirugía
05	M	28	Secreción	AMK, GEN	UCI
06	F	37	Secreción	Ninguno	Retén
07	M	45	Orina	AMK, TCY, CIP	UCI
08	F	53	Sangre	AMK, TCY, IPM	UCI
09	F	27	Sangre	AMK, GEN, CAZ	UCI
10	M	64	Sangre	AMK, TCY, IPM	UCI
11	M	46	Sangre	AMK, GEN, CAZ	UCI
12	F	35	Secreción	AMK, GEN	Cirugía
13	M	32	Secreción	AMK, GEN, CAZ	UCI
14	F	47	Secreción	AMK, GEN, CAZ	Cirugía
15	M	59	Sangre	AMK, GEN, IPM	UCI
16	F	61	Secreción	AMK, GEN, CAZ	Medicina
17	M	54	Secreción	AMK, GEN, CAZ	UCI
18	F	24	Secreción	AMK, GEN, CAZ	UCI
19	M	34	Orina	GEN, CAZ	Medicina
20	F	12	Sangre	Ninguno	Retén

M: masculino, F: femenino, AMK: amikacina, TCY: tetraciclina, GEN: gentamicina, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, IPM: imipenen, UCI: unidad de cuidados intensivos.

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión del disco (Bauer *et al.*, 1966), y siguiendo los lineamientos para enterobacterias propuestos por el Instituto Estándar de Laboratorios Clínicos, del inglés “Clinical and Laboratory

Standard Institute” (CLSI, 2008). Para ello, se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica, a partir de un crecimiento de 18 horas sembrado en agar tripticosa de soya (ATS), ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a $1,50 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Una vez que se obtuvo la turbidez respectiva, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión y se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Mueller Hinton (Himedia, India) contenido en placas de Petri, se dejó secar por 5 minutos y se procedió a colocar los discos de los siguientes agentes antimicrobianos: cefotaxima (30 μ g), ceftadizima (30 μ g), ceftriazona (30 μ g), aztreonam (30 μ g), cefepima (30 μ g) y piperaciclina-tazobactam (100/10 μ g), todos marca OXOID. Las placas fueron incubadas a 37°C, durante 18 horas, en ambiente de aerobiosis y, posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición empleando una regla milimetrada.

Los halos de inhibición presentados por cada antimicrobiano se interpretaron siguiendo los criterios de interpretación en la tabla del CLSI (2008), y se reportaron las categorías de acuerdo a los resultados obtenidos como sensible, intermedio y resistente (Crespo, 2002).

Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

La detección de BLEE se realizó mediante la técnica de sinergismo de doble disco, propuesta por Jarlier *et al.* (1988) y siguiendo los lineamientos establecidos por el CLSI (2008), M100-S18 (M2). Se procedió a inocular una placa de agar Mueller Hinton con una suspensión bacteriana preparada en 4,5 ml de solución salina fisiológica y ajustada al patrón 0,5 de MacFarland. Luego, se colocó en el centro de la placa un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 μ g), posteriormente, se colocaron discos de cefotaxima (30 μ g), y ceftazidima (30 μ g), a una distancia lineal de 15 mm del disco de ácido clavulánico. La presencia de un efecto sinérgico entre alguna de las cefalosporinas de tercera generación y el ácido clavulánico, se interpretó como producción de BLEE.

Detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}

Extracción de ADN

La extracción del ADN total se realizó por el método de lisis bacteriana, propuesto por Levesqué *et al.* (1995), para ello se tomaron 200 µl de un cultivo bacteriano, crecido durante 18 horas en caldo LB a 37°C y se mezclaron en un tubo Eppendorf con 800 µl de agua estéril, posteriormente, la suspensión se dejó hervir durante 15 minutos y luego se centrifugó a 12 000 g durante 2 minutos. El sobrenadante con el contenido de ADN total se guardó a -20°C hasta su uso.

Amplificación de los genes que codifican β-lactamasas de espectro extendido tipo 2be (TEM, SHV y CTX-M)

La presencia de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} se determinó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando juegos de oligonucleótidos específicos para cada gen.

Para cada reacción de PCR se emplearon 25 µl de mezcla de PCR, la cual contenía: 12,50 µl de la polimerasa LPU (2X, Fundaim), que contiene desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) para una concentración final de 200 µmol l⁻¹; la enzima *Taq* ADN polimerasa, para una concentración final de 25 U ml⁻¹, cloruro de magnesio (MgCl₂), para una concentración final de 1,50 mmol l⁻¹, 2,50 µl de cada uno de los oligonucleótidos específicos, para una concentración final de 0,40 mmol l⁻¹, 2 µl del ADN molde y 5,50 µl de agua purificada estéril en cada caso (Guzmán, 2006).

Genes bla_{SHV}

La amplificación de los genes *bla*_{SHV} se realizó empleando el siguiente par de oligonucleótidos, SHV-F: 5`-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3`y SHV-R: 5`-CGT TTC CCA GCG GTC AAG G-3`, que permitieron amplificar un producto de 471

pb (Brisse y Verhoef, 2001). Este par de oligonucleótidos hibridan en las posiciones 1 a 20 (SHV-F) de la cadena 3'→5' y 489 a 471 (SHV-R) de la cadena 5'→3' del gen *bla_{SHV12}*. Número de acceso en GenBank AY293070.

Las condiciones de reacción empleadas fueron las siguientes: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 72°C por 10 minutos (Brisse y Verhoef, 2001).

Genes bla_{TEM}

Los genes *bla_{TEM}* se identificaron utilizando los siguientes oligonucleótidos TEM-F: 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3' y TEM-R: 5'-CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG-3', los cuales permitieron amplificar un producto de 867 pb (Eckert *et al.*, 2004). Este par de oligonucleótidos hibridan en las posiciones 181 a 201 de la cadena 3'→5' (TEM-F) y 1040 a 1020 de la cadena 5'→3' (TEM-R) del gen *bla_{TEM}*. Número de acceso en GenBank AY394610.

Las condiciones de reacción empleadas fueron las siguientes: 95°C por 5 minutos durante 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 72°C por 10 minutos (Eckert *et al.*, 2004).

Genes bla_{CTX-M}

Los oligonucleótidos empleados para identificar los genes *bla_{CTX-M}* fueron CTX-M/F: 5'-TTT GCG ATG TGC AGT ACC AG-3' y CTX-M/R: 5'-GAT ATC GTT GGT GGT GCC AT-3', que permitieron amplificar un producto de 544 pb (Eldestein *et al.*, 2003). Este par de oligonucleótidos hibridan en las posiciones 205 a 227 (CTX-M/F) de la cadena 3'→5' y 748 a 727 (CTX-M/R) de la cadena 5'→3' del gen *bla_{CTX-M}*. Número de acceso en GenBank AY293071.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 94°C por 5 minutos durante 35 ciclos de 94°C por un minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 72°C por 10 minutos (Eldestein *et al.*, 2003).

Electroforesis

Los productos de la PCR amplificados se visualizaron mediante una corrida electroforética. Para esto, se preparó un gel de agarosa a una concentración de 1,50% en buffer TBE 1X (Stock 10X: tris base 0,89 mol l⁻¹, ácido bórico 0,89 μmol l⁻¹, EDTA 0,02 mol l⁻¹). Este buffer se utilizó además en la realización de las migraciones electroforéticas (60 voltios durante una hora, aproximadamente) de los productos amplificados.

Para evaluar el tamaño del fragmento de ADN amplificado, se utilizó el marcador ADN Ladder (GeneRuler™) de 10 000 pb de longitud. A continuación, los gels fueron coloreados con una solución de bromuro de etidio 0,50 μg ml⁻¹, durante 10 minutos y el exceso se eliminó lavando con agua durante unos segundos. Los productos amplificados se revelaron en el gel mediante la observación a través de un transiluminador de luz ultravioleta (UVP) para finalmente ser fotografiados con una cámara digital.

Control de calidad

Como control negativo para todas las reacciones de PCR, se empleó un lisado celular de la cepa *Escherichia coli* J62-2, la cual no presenta los genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} ni *bla*_{CTX-M}. Un segundo control negativo consistió en mezclar todos los componentes requeridos para la amplificación pero sin ADN molde, utilizando agua purificada para completar el volumen (control de reactivos).

El control positivo utilizado en las reacciones de PCR para la búsqueda de los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} fue un lisado de la cepa ATCC 700603, la cual presenta las β-lactamasas SHV-18 y TEM-1. Y como control positivo de los genes *bla*_{CTX-M} se empleó un lisado celular de la cepa *Escherichia coli* 2944NR, la cual presenta una β-lactamasa

tipo CTX-M-1, donada gentilmente por el Licenciado Luis Torres (Escuela de Bioanálisis UCV).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron tratados a través de un análisis porcentual y expresados en tablas y figuras (Dawson y Robert, 1997).

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los porcentajes de resistencia obtenidos en cepas intrahospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* frente a los antimicrobianos ensayados, el 90,00% resultó resistente a aztreonam (ATM) y ceftazidima (CAZ). Un 65,00% mostró resistencia a ceftriazona (CRO) y cefotaxima (CTX). Por otro lado, se observó un 25,00% de resistencia contra piperacilina/tazobactan (TZP) y 20,00% para cefepima (FEP).

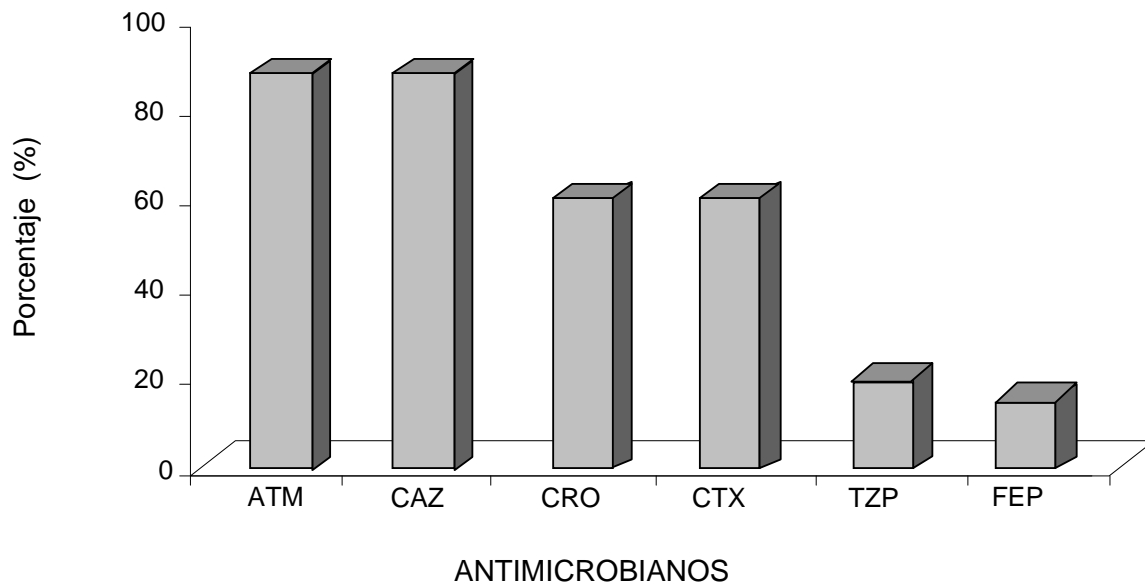


Figura 1. Porcentaje de resistencia a β -lactámicos en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en pacientes con infección intrahospitalaria. ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriazona, CTX: cefotaxima, TZP: piperacilina/tazobactan FEP: cefepima.

La tabla 2 muestra el perfil de resistencia de cada cepa luego del análisis de los resultados de susceptibilidad antimicrobiana, indicando que 18 de 20 aislados presentaron resistencia simultánea a aztreonam y ceftazidima, cinco (5), fueron resistentes adicionalmente a piperacilina/tazobactan y cuatro (4) a cefepima. Por su

parte, las cepas Kp 04 y Kp 12 no presentaron resistencia frente a ninguno de los antibióticos ensayados.

Tabla 2. Resistencia a β -lactámicos y producción de β -lactamasas de espectro extendido en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, provenientes de pacientes con infección intrahospitalaria, recluidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.

Cepas	Perfil de resistencia	BLEE
01	ATM, CAZ	+
02	ATM, CAZ	+
03	ATM, CAZ	+
04	-----	-
05	ATM, CAZ, CTX, CRO	+
06	ATM, CAZ	+
07	ATM, CAZ, CTX, CRO	+
08	ATM, CAZ	+
09	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+
10	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO	+
11	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+
12	-----	-
13	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+
14	ATM, CAZ, CTX, CRO	+
15	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+
16	ATM, CAZ, CTX, CRO	+
17	ATM, CAZ, CTX, CRO	+
18	ATM, CAZ, CTX, CRO	+
19	ATM, CAZ, CTX, CRO	+
20	ATM, CAZ, CTX, CRO	+

ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, CRO: ceftriazona, TZP: piperacilina/tazobactan, FEP: cefepima, BLEE: β -lactamasas de espectro extendido.

El método de sinergismo del doble disco reveló que el 90,00% de las cepas estudiadas, fueron productoras de β -lactamasas de espectro extendido (tabla 2).

La detección molecular de los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*, reveló la presencia del gen *bla_{SHV}* en los veinte aislados de *Klebsiella pneumoniae*. El gen *bla_{TEM}* estuvo presente en 17 cepas y el gen *bla_{CTX-M}* en 4 cepas (figuras 2, 3, 4 y 5).

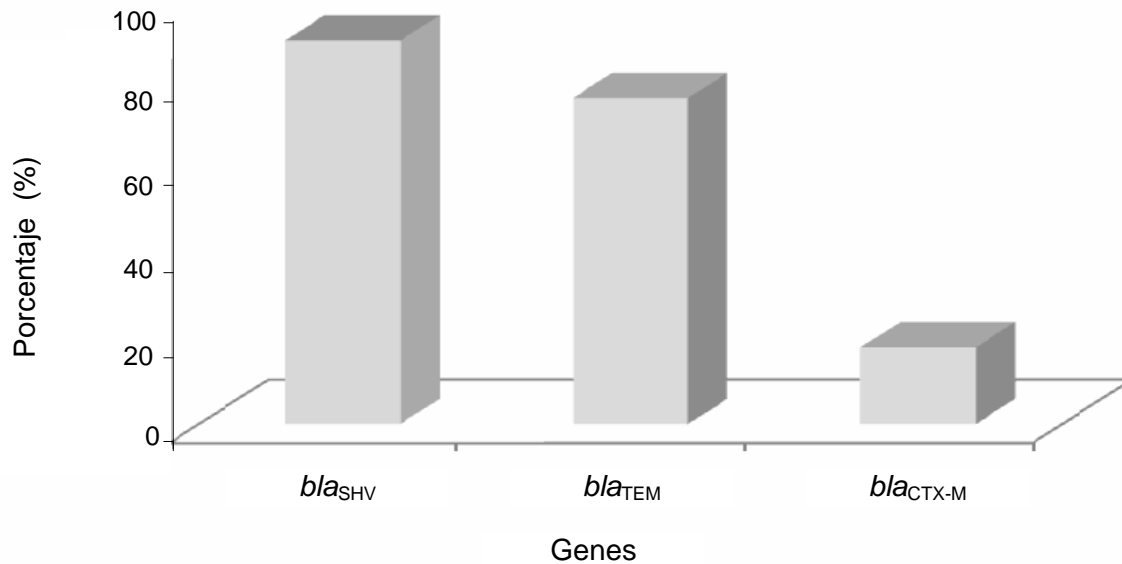


Figura 2. Distribución de genes codificadores de enzimas β -lactamasas de espectro extendido, detectados en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, reclusos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. *bla*_{SHV}: β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV, *bla*_{TEM}: β -lactamasas de espectro extendido tipo TEM, *bla*_{CTX-M}: β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M.

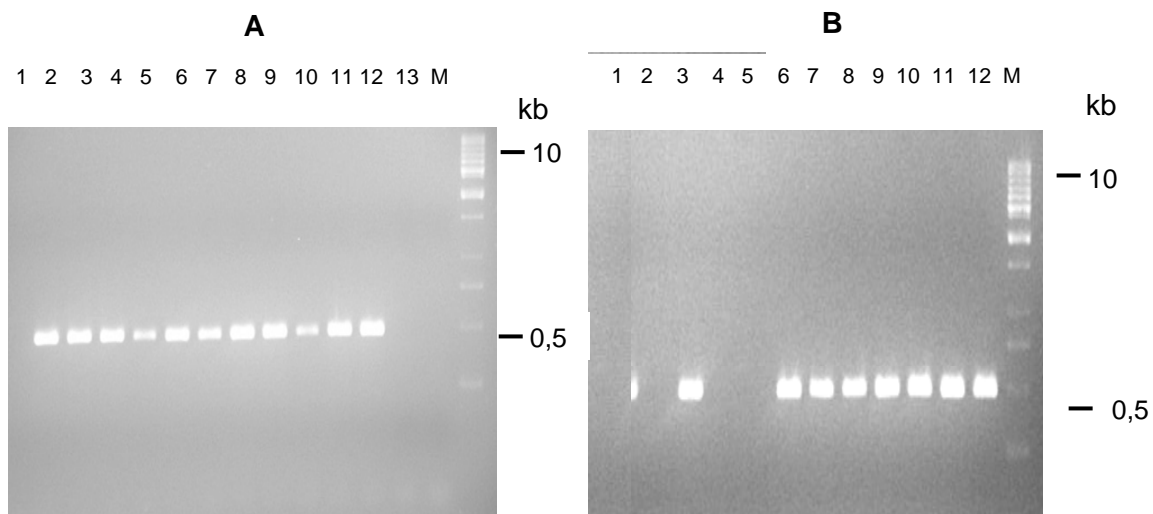


Figura 3. Productos de la amplificación del gen *bla*_{SHV}, en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **A.** Líneas 1 a 13. *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo), 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, *E. coli* J62-2 (Control negativo), Control negativo sin ADN. **B.** Líneas 1 a 12. *E. coli* J62-2 (Control negativo), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo), 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20. M: Marcador de peso molecular.

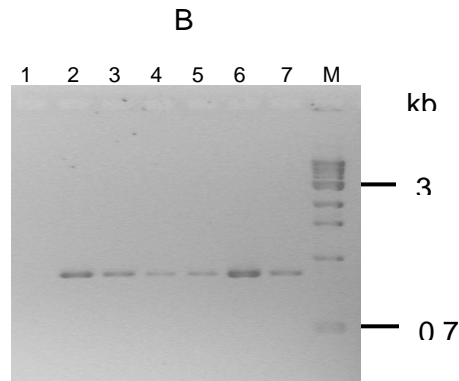
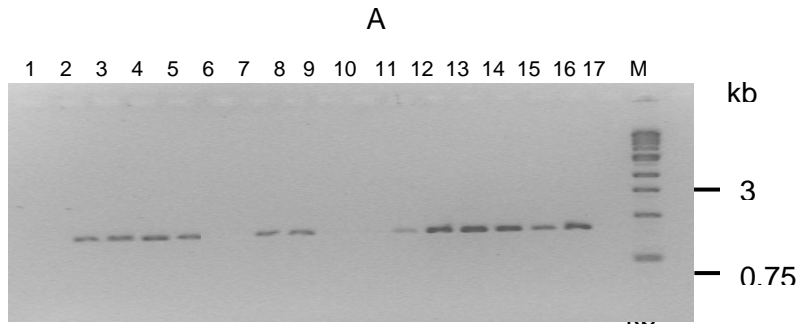


Figura 4. Productos de amplificación del gen *bla*_{TEM} en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. A. Líneas 1 a 17. *E. coli* J62-2 (Control negativo), 06, 07, 08, 09, 11, 10, 12, 14, 18, 13, 15, 16, 17, 19, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo). B. Líneas 1 a 7. *E. coli* J62-2 (Control negativo), 01, 02, 03, 04, 05, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Control positivo). M: Marcador de peso molecular.

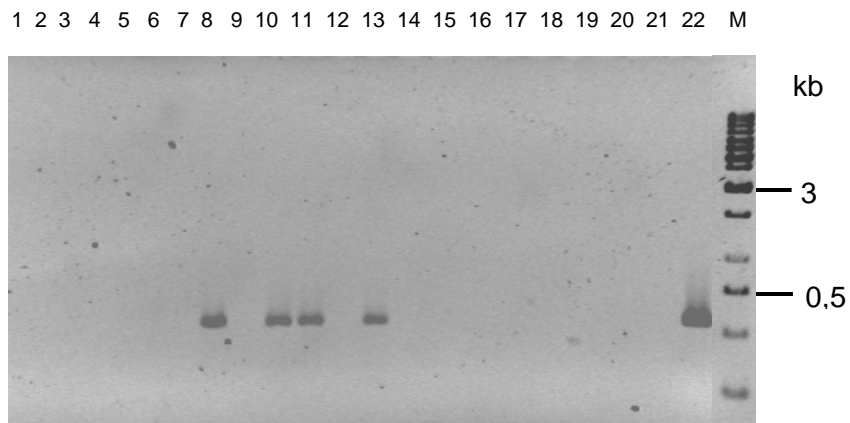


Figura 5. Productos de amplificación del gen *bla*_{CTX-M} en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Líneas 1 a 22: *E. coli* J62-2 (Control negativo), 01, 02, 03, 05, 09, 06, 11, 13, 07, 15, 08, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, *E. coli* 2944NR (Control positivo). M: Marcador de peso molecular.

La tabla 3, muestra que varias cepas de *Klebsiella pneumoniae* presentaron más de un gen. Un total de 14 cepas (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 12, 16, 17, 19, 20) presentaron los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}. Las cepas 09, 13 y 15 contenían simultáneamente los tres genes, mientras que en la cepa 11 se encontraron los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}.

Tabla 3. Genes codificadores de β -lactamasas de espectro extendido detectados en cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes con infección nosocomial, recluidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.

Cepas	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}
01	+	+	-
02	+	+	-
03	+	+	-
04	+	+	-
05	+	+	-
06	+	+	-
07	+	+	-
08	+	+	-
09	+	+	+
10	+	+	-
11	+	-	+
12	+	+	-
13	+	+	+
14	+	-	-
15	+	+	+
16	+	+	-
17	+	+	-
18	+	-	-
19	+	+	-
20	+	+	-

*bla*_{SHV}: gen que codifica a la β -lactamasa de espectro extendido tipo SHV, *bla*_{TEM}: gen que codifica a la β -lactamasa de espectro extendido tipo TEM, *bla*_{CTX-M}: gen que codifica a la β -lactamasa de espectro extendido tipo CTX-M.

Al correlacionar la resistencia a los β -lactámicos con la producción de BLEE, se observó que doce (12) cepas resistentes a ATM y CAZ presentaron los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, dos (2) cepas resistentes a ATM, CAZ, CTX y CRO presentaron el gen *bla*_{SHV}, y en tres (3) cepas resistentes a ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP y TZP, se encontraron los

tres genes; mientras que en una se encontró *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* (tabla 4). Igualmente, en ella se muestran las áreas de donde fueron aisladas las cepas, donde se puede observar que once (11) cepas procedentes de UCI productoras de BLEE, presentaron más de un gen a la vez; sin embargo, dos (2) cepas provenientes de cirugía no presentaron BLEE pero si se detectaron la presencia de los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*. En las áreas de retén y medicina también se encontraron los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*.

Tabla 4. Características de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, recluidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”.

Cepa	Servicio	Fenotipos	BLEE	Genes <i>bla</i>
01	UCI	ATM, CAZ	+	SHV, TEM
02	UCI	ATM, CAZ	+	SHV, TEM
03	UCI	ATM, CAZ	+	SHV, TEM
04	Cirugía	-----	-	SHV, TEM
05	UCI	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV, TEM
06	Retén	ATM, CAZ	+	SHV, TEM
07	UCI	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV, TEM
08	UCI	ATM, CAZ	+	SHV, TEM
09	UCI	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+	SHV, TEM, CTX-M
10	UCI	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV, TEM
11	UCI	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+	SHV, CTX-M
12	Cirugía	-----	-	SHV, TEM
13	UCI	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+	SHV, TEM, CTX-M
14	Cirugía	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV
15	UCI	TZP, ATM, CAZ, CTX, CRO, FEP	+	SHV, TEM, CTX-M
16	Medicina	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV, TEM
17	UCI	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV, TEM
18	UCI	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV
19	Medicina	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV, TEM
20	Retén	ATM, CAZ, CTX, CRO	+	SHV, TEM

ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, CRO: ceftriazona, FEP: cefepima, TZP: piperacilina/tazobactan, BLEE: β-lactamasas de espectro extendido, *bla_{SHV}*: gen que codifica a la enzima β-lactamasa de espectro extendido tipo SHV, *bla_{TEM}*: gen que codifica a la enzima β-lactamasa de espectro extendido tipo TEM, *bla_{CTX-M}*: gen que codifica a la enzima β-lactamasa de espectro extendido tipo CTX-M.

DISCUSIÓN

Las infecciones intrahospitalarias representan un importante problema de salud pública, debido a que son consideradas una de las principales causas de morbimortalidad en los centros hospitalarios, aunado a las implicaciones económicas que traen para el sistema sanitario. La gran mayoría de las infecciones intrahospitalarias son producidas por bacterias que forman parte de la flora normal del individuo y que normalmente residen en el ambiente hospitalario. Entre los principales agentes causantes de infecciones intrahospitalarias se encuentran: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., entre otros (Silva *et al.*, 2001).

Klebsiella pneumoniae es un importante patógeno intrahospitalario que puede causar elevados porcentajes de morbimortalidad en la población, especialmente, en pacientes de edad pediátrica (Cartelle *et al.*, 2004). Aunque las klebsiellas no constituyen un componente significativo de la flora saprófita humana, la hospitalización y el empleo de antimicrobianos favorecen su capacidad de colonización, pudiendo desencadenar un proceso infeccioso, debido a su condición de agente oportunista (Gupta *et al.*, 2003). Entre los factores que favorecen la colonización bacteriana en el hombre se destacan: el estado físico del individuo, la edad, la estancia hospitalaria, la administración de antimicrobianos, y el empleo de técnicas exploratorias y terapéuticas agresivas/invasoras (intubación, cateterismos, implantes, entre otros) (Girlich *et al.*, 2001).

El estudio de susceptibilidad a los antibióticos β -lactámicos, en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, reveló un alto porcentaje de resistencia a ceftazidima (90,00%) y cefotaxima (65,00%). La resistencia a ambos antimicrobianos puede ser la consecuencia del empleo empírico, amplio y generalizado, de estos antibióticos en el centro hospitalario, lo cual, se soporta con los datos clínicos y epidemiológicos obtenidos de los pacientes de las diferentes áreas de cirugía (15,00%), retén (10,00%), medicina (10,00%) y la unidad de cuidados intensivos (65,00%) (tabla 1), donde el 80,00% de los mismos estaban recibiendo terapia antimicrobiana con, al menos, una cefalosporina

de tercera generación, hecho que pudo haber contribuido en parte a la selección de cepas resistentes. Al respecto, el uso continuo e indiscriminado de los antimicrobianos en los hospitales y la falta de control para su uso por la población en general, ha llevado a la selección de microorganismos resistentes y, por consiguiente, a la desaparición de cepas sensibles, razón por la cual, las bacterias que normalmente residen en los hospitales presentan resistencia a diferentes tipos de antimicrobianos (Barrier, 2000; Casellas, 2001).

Cortés *et al.* (2006) defienden que el factor de riesgo más asociado a la producción de β -lactamasas de espectro extendido es el tiempo prolongado de hospitalización en un servicio médico quirúrgico o en UCI, así como el empleo de múltiples esquemas de antibióticos, particularmente, cefalosporinas de tercera generación.

Con respecto a cefepima, un bajo porcentaje de cepas mostró resistencia (20,00%), sin embargo, aun cuando *in vitro* este pudiera ser una opción terapéutica, hay que descartar la presencia de algunas BLEE que puedan hidrolizar a este compuesto, además, hay que considerar que *in vivo* algunas infecciones cursan con inóculos bacterianos elevados, y cefepima puede ser hidrolizado con mayor afinidad y velocidad, conduciendo al fracaso terapéutico (Paterson *et al.*, 2001; Melano *et al.*, 2003).

En relación a combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, se observó que un 25,00% de las cepas mostraron resistencia a piperacilina/tazobactam, sin embargo, cabe destacar, que todas estas combinaciones sufren igualmente del efecto inóculo, por tanto, se debe evaluar cuidadosamente el tipo de infección donde pueden ser empleadas (Torres *et al.*, 2006).

En este estudio, los carbapenemas se mantienen como la mejor opción terapéutica para los microorganismos productores de BLEE, no obstante, el uso indiscriminado de estos antibióticos puede conllevar a cambios en los patrones de sensibilidad de la población bacteriana (Sanders, 1997; Prada, 2002).

Martínez *et al.* (2005), en su trabajo sobre la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de BLEE, en el Hospital San Jerónimo de Montería, Colombia, reportaron que 91,10% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam, pero sensibles a imipenem y meropenem. Por su parte, García *et al.* (2009), en su publicación, susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de enterobacterias intrahospitalarias productoras de β -lactamasas de espectro extendido en Cumaná, estado Sucre, identificaron a *Klebsiella pneumoniae* como la especie mayormente aislada (51,80%), con los porcentajes más elevados de resistencia antimicrobiana a β -lactámicos, específicamente a ceftazidima (77,70%), cefotaxima (70,30%) y cefepima (40,70%).

El principal mecanismo de resistencia contra los β -lactámicos descrito en esta bacteria es la producción de β -lactamasas, denotándose como el principal problema clínico la producción de BLEE (Zamora *et al.*, 1998; Comegna *et al.*, 2000; Bonnet, 2004). Los resultados de las pruebas fenotípicas del presente estudio, realizadas mediante el método de sinergismo del doble disco, reveló que el 90,00% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* son productoras de BLEE (tabla 2).

En el ámbito hospitalario y extrahospitalario, las BLEE son consecuencia de la elevada presión selectiva derivada del empleo masivo de los antimicrobianos. El alto porcentaje de cepas productoras de BLEE en los centros hospitalarios representa un marcador importante, que debe conducir a la toma de decisiones para intervenir y prevenir los índices de morbilidad y mortalidad que generan estos microorganismos en los pacientes hospitalizados (Castro *et al.*, 2008).

En los últimos años, la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE ha sufrido una serie de cambios, debido a la aparición de nuevas enzimas que tienen hidrólisis sobre un marcador fenotípico específico (CAZ) o varios de ellos (CAZ, CTX, FEP) (Tofteland *et al.*, 2007).

Al analizar los resultados obtenidos del perfil de resistencia en las cepas productoras de BLEE, se observó que en el 90,00% de los casos el sustrato más afectado fue aztreonam y ceftazidima (ATZ y CAZ) y en un 65,00% cefotaxima y ceftriazona (CTX y CRO). Al respecto, Bonnet *et al.* (2001) señalan que desde el punto de vista clínico, la detección de las BLEE es importante, porque de su reporte depende el éxito terapéutico al utilizar ceftazidima, cefotaxima, aztreonam o cefepima y desde el punto de vista fenotípico, se pueden predecir los posibles tipos de β -lactamasas generadas por las bacterias. Por ejemplo: una cepa resistente a piperacilina-tazobactan y cefepima, posiblemente, produzca β -lactamasas tipo TEM y SHV.

Las enzimas BLEE tipo TEM y SHV pueden ser tipo ceftazidimasas, ya que hidrolizan con mayor eficacia ceftazidima y aztreonam, sin embargo, un porcentaje representativo de ellas son cefotaximasas, razón por la cual, la hidrólisis del sustrato no es un argumento evidente para caracterizar una BLEE. Las enzimas CTX-M son cefotaximasas que hidrolizan cefotaxima y ceftriazona, sin embargo, se han reportado cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de CTX-M (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27 y CTX-M-19) que hidrolizan ceftazidima (Bonnet, 2004; Walsh *et al.*, 2005).

Según los resultados obtenidos, la mayoría de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, fenotípicamente, son sensibles a piperacilina/tazobactan y a cefepima, y resistentes a aztreonam y ceftazidima, lo que induce a pensar que posiblemente la enzima β -lactamasa responsable de la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en estas cepas sea una enzima tipo SHV o TEM, no obstante, hay que considerar que en cuatro (4) cepas de *Klebsiella pneumoniae* también se encontró resistencia para cefotaxima y cefepima sugiriendo este fenotipo la presencia conjunta de una enzima CTX-M.

La investigación de genes codificadores de BLEE, reveló la presencia de enzimas de las familias SHV, TEM y CTX-M. Veinte (20) cepas presentaron el gen *bla*_{SHV}, 17 el

gen *bla*_{TEM} y sólo cuatro el gen *bla*_{CTX-M}. En este estudio, se observaron cepas con genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} que resultaron sensibles a las cefalosporinas de tercera generación, lo que sugiere que los genes pertenecen al grupo 2b (codificantes de BLEA), debido a que los oligonucleótidos empleados en esta investigación presentan regiones conservadas con genes codificantes de enzimas tipo BLEA, es difícil diferenciar cuales serían las enzimas BLEE específicas presentes en este estudio, para poder llegar a la identificación definitiva se tendría que secuenciar los diferentes genes encontrados. Los resultados obtenidos revelaron que las cepas aisladas de los diferentes servicios médicos presentaron más de un gen a la vez, lo que podría indicar la permanencia y diseminación de estos genes entre las diversas áreas del mismo centro hospitalario (tabla 4).

La mayoría de las BLEE detectadas en este estudio, son del tipo TEM y SHV y, en menor proporción, del tipo CTX-M, estas últimas se han reportado de manera incrementada en bacilos Gram negativos en numerosos estudios a nivel mundial. Gaitán y Espinal (2008), en Colombia, sugieren que las enzimas CTX-M, especialmente del grupo 1, se están reportando con mayor frecuencia, y su distribución entre las BLEE confirma la variabilidad en la epidemiología de estos determinantes de resistencia y evidencia la necesidad de un monitoreo constante.

Morales *et al.* (2005), en Perú, reportaron 44,40% de cepas *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, la mayoría mostró resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam, además identificaron la presencia de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en 6 cepas. La secuenciación de los correspondientes genes confirmó la existencia de las BLEE TEM-10 y SHV-5, respectivamente.

Mantilla *et al.* (2006), en un estudio molecular realizado en 11 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, en Colombia, reportaron que el 100,00% de los aislados fueron productores de BLEE, portando específicamente el gen *bla*_{CTX-M-12}, presentando un perfil de resistencia para cefotaxima, ceftrizona y aztreonam. Oliver *et al.* (2008), en

España, analizaron 32 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, de las cuales 100,00% fueron productoras de BLEE. Del total de cepas, en 20 casos (62,50%), se detectaron genes *bla*_{CTX-M}, en 11 (34,40%), *bla*_{SHV} y en sólo 1 (3,10%), *bla*_{TEM}.

Todo lo anteriormente expuesto, sugiere que las cepas de *Klebsiella pneumoniae* pueden expresar más de un tipo de β -lactamasa a la vez, lo cual puede complicar el panorama terapéutico dentro de una institución sanitaria, ya que las β -lactamasas del tipo 2be son principalmente codificadas por moléculas plasmídicas, lo que facilita su diseminación en un ambiente hospitalario.

Los resultados de esta investigación indican que en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” existen cepas de *Klebsiella pneumoniae* que portan una amplia variedad de genes de resistencia que codifican para enzimas tipo BLEE y, posiblemente BLEA, y que son consideradas factores fundamentales de riesgo para la diseminación de la resistencia a antibióticos, debido a que normalmente están codificados en elementos genéticos transferibles.

CONCLUSIONES

En el 90,00% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ceftazidima y aztreonam se comprobó fenotípicamente la producción de enzimas BLEE.

El 65,00% de las cepas productora de BLEE, también mostraron resistencia a ceftriazona y cefotaxima.

Todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae* portaron el gen *bla_{SHV}*, mientras que 17 cepas tenían adicionalmente el gen *bla_{TEM}*.

Se encontró la presencia simultánea de los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}* en 3 de las cepas estudiadas (15,00%).

RECOMENDACIONES

Mantener el control epidemiológico de las infecciones nosocomiales, promoviendo la caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia y la tipificación molecular, las cuales, son herramientas útiles para conocer el comportamiento de las poblaciones bacterianas en procesos específicos relacionados con la infección intrahospitalaria y las características de la resistencia a antibióticos, de tal manera que permitan a las instituciones hospitalarias aplicar medidas tempranas y dirigidas a optimizar los esfuerzos en el control de infecciones, contribuyendo a evitar su progreso y propagación.

BIBLIOGRAFÍA

Ambler, R.; Coulson, A.; Frere, J.; Ghuysen, J.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R.; Tiraby, G. y Waley, S. 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemical*, 276: 269-270.

Araque, M.; Nieves, B.; Lauretti, L. y Rossolini, G. 2000. Molecular bases of extended-spectrum β -lactamases production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15: 37-42.

Ariffin, H.; Navaratnam, P.; Kee, T. y Balan, G. 2004. Antibiotic resistance patterns in nosocomial Gram-negative bacterial infections in units with heavy antibiotic usage. *Journal Pediatric*, 50(1): 26-31.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

Barrier, S. 2000. Bacterial resistance to betalactams, and its prevention with combination antimicrobial therapy. *Pharmacotherapy*, 12(5): 397-402.

Blásquez, J.; Blaquero, M.; Cantón, R.; Alos, I. y Blaquero, F. 1993. Characterization of a new TEM-type β -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 2059-2063.

Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48: 1-14.

Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J.; Chanal, C.; Sirot, D. y Labia, R. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45(8): 2269-2275.

Bradford, P. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Infection Microbiology Clinical*, 14: 933-935.

Brisse, S. y Verhoef, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* gene sequencing and automated ribotyping. *Institution Systemic Evolution and Microbiology*, 51: 915-924.

Bush, K.; Jacoby, G. y Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for

β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.

Byarugaba, D. 2004. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 105-110.

Cartelle, M.; Del Mar Tomas, M.; Pertega, S.; Beceiro, A.; Domínguez, M.; Velasco, D.; Molina, F.; Villanueva, R. y Bou, G. 2004. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *Journal Clinical Microbiology*, 42: 4242-4249.

Casellas, J. 2001. Resistencia bacteriana por producción de β -lactamasas de espectro extendido: La perspectiva global y latinoamericana en el escenario hospitalario. Reunión de consenso. La aparición de microorganismos productores de ESBL en América Latina: Recomendaciones para su control y tratamiento (Sao Pablo, Brasil). *Clinical Infections Diseases*, 8: 12-16.

Castro, N.; Carrión, E.; Moreno, M. y Alarcón, L. 2008. Caracterización molecular de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *E. coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 28(3): 114-120.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Performance standards for Antimicrobial Susceptibility testing*. Fifteenth Informational Supplement M100-S18. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA.

Comegna, M.; Guzmán, B.; Carmona, O.; Molina, M. y colaboradores del grupo venezolano de resistencia bacteriana. 2000. Resistencia a los antimicrobianos en Venezuela, nuevos hallazgos. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*, 20(1): 58-63.

Cortés, J., Urdaneta, A., Potdevin, G., Cuervo, S., Bermúdez, D., Molina, C. y Arroyo, P. 2006. Impacto de las betalactamasas de espectro extendido en pacientes con cáncer. *Revista Colombiana de Cancerología*, 10(3):183-196.

Crespo, M. 2002. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Medicina en Colombia*, 33: 179-193.

Dawson, S. y Robert G. 1997. *Bioestadística Médica*. Editorial el Manual Moderno S. A.

Denton, M. 2007. Enterobacteriaceae. *International Journal Antimicrobiology Agents*, 29(3): 9-22.

Eckert, C.; Gautier, V.; Saladin-Allaard, M.; Hidri, N.; Verdet, C.; Ould-Hocine, Z.; Barnaud, G.; Delisle, F.; Rossier, A.; Lambert, T.; Philippon, A. y Arlet, G. 2004. Dissemination of CTX-M- type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1249-1255.

Eldestein, M.; Pimkin, M.; Palagin, I.; Eldestein, I. y Stratchounski, L. 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 3724-3732.

Espinal, P.; Mantilla, J.; Saavedra, C.; Leal, A.; Alpuche, C. y Valenzuela, E. 2004. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*, 24: 252-261.

Gaitán, S. y Espinal, P. 2008. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 26(3): 239-246.

García, J.; Rodríguez, E.; Carpio, C.; Albarado, L.; Salazar, E.; Flores, E.; Betancourt, J.; Araque, Y. y Guzmán, M. 2009. Susceptibilidad Antimicrobiana *in vitro* de enterobacterias nosocomiales productoras de betalactamasas de espectro expandido, Cumaná, estado Sucre. *Kasmera*, 37(1): 38-50.

García, P. 2008. Resistencia Bacteriana en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 20(1): 11-23.

Giamanellou, H. 2005. Multidrug resistance in Gramnegative bacteria that produce Extended-Spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology Infections*, 11(4): 1-16.

Girlich, D.; Poirel, L.; Leelaporn, A.; Karin, A.; Tribuddharat, C. y Fennewald, M. 2001. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended spectrum β -lactamases in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *Clinical Microbiology*, 39: 175-182.

Gniadkouwski, M. 2001. Evolution and epidemiology of extended - spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL, producing microorganisms. *Infection Microbiology Clinical*, 7: 597-608.

Gobernado, M. 2005. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. Servicio de Microbiología Hospital Universitario La Fe, Valencia. *Revista Española Química*, 18(2): 115-117.

Gupta, A.; Ampolo, K.; Rubenstein, D. y Shaiman, L. 2003. Extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: A review of the literature.

Journal of perinatology, 23: 439-443.

Guzmán, M.; Alonso, G. y Rodríguez, V. 2004. Resistencia antimicrobiana en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*. En: <http://congresomicrobiología.ucv.ve>. (14/03/2005).

Guzmán, M. 2006. Caracterización de los determinantes que codifican β -lactamasas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*, en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela.

Hernández, J.; Pascual, A.; Cantón, R.; Martínez-Martínez, L. y Grupo de Estudio Infección Hospitalaria (GEIH). 2003. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas y Clínicas*, 21: 77-82.

Hernández, W.; Ramos, A.; Nodarse, R.; Padrón, A. y De Armas, E. 2006. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). **Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergente**, 5: 27-44.

Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G. y Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infections Diseases*, 10: 867-878.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Washington W. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana.

Levesqué, C.; Piche, L.; Larose, C. y Roy, P. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 185-191.

Livermore, D.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.; Arlet, G. y Woodford, N. 2007. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2): 165-174.

Mantilla, J.; Reguero, M.; González, E.; García, I.; Leal, A.; Espinal, P.; Alpuche, C.; Valderrama, I.; Garzón, M. y Olarte, N. 2006. Caracterización molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano. *Biomédica*, 3: 20-26.

Martínez, P.; Espinal, P.; Bustos, A. y Máttar, S. 2005. Prevalencia de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Universidad Autónoma de Bucaramanga*, 8:15-22.

Máttar, S. y Martínez, P. 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): Detección, impacto clínico y epidemiología. *Asociación Colombiana de Infectología*, 11(1): 23-35.

Melano, R.; Corso, A.; Petroni, A.; Centron, D.; Orman, B. y Pereyra, A. 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamasas in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 52:36-42.

Morales, J.; Reyes, K.; Monteghirto, M.; Roque, M. y Irey, J. 2005. Presencia de β -lactamasas de espectro extendido en dos hospitals de Lima, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina en Lima*, 66(1): 24-32.

Murria, P.; Baron, E. y Jorgensen, J. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. Octava edición. ASM USA.

Oliver, A.; Moya, B.; Nicolau, C.; Miró, E.; Navarro, F.; Oteo, J, Campos, J, Diestra, K, Vázquez, M.; Cantón, R.; Coque, T. y Curiao, T. 2008. Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26: 404-410.

Owens, R. y Rice, L. 2006. Hospital based strategies for combating resistance. *Clinical Infections Diseases*, 42: 173-181.

Paterson, D. 2006. Resistance in Gramnegative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal Medicine*, 119: 20-28.

Paterson, D.; Ko, W. y Von Gottberg, A. 2001. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamasas. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 2206-2212.

Perozo, A. y Castellano, M. 2009. Detección de β -lactamasas de espectro extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Kasmera*, 37(1): 12-15.

Prada, G. 2002. β -lactamasas de espectro extendido: Perspectivas y Tratamientos. *Revista de Infecciones Panamericana*, 5: 41-46.

Rice, L. 2001. Evolution and clinical importance of extended spectrum β -lactamasas. *Chest*, 119: 391-396.

Sanders, C. 1997. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Journal Clinical Microbiology*, 41: 573-93.

Silva, G.; Aguilar, C.; Becerra, Z.; Garza, U. y Velásquez, M. 2001. Outbreak of

infection with extended spectrum β -lactamase-producing *K. pneumoniae* in a Mexican hospital. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 3193-3196.

Tofteland, S.; Haldorsen, B.; Dalh, K.; Simonsen, S.; Steinbakk, M.; Walsh, T.; y Sundsfjord, A. 2007. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* in Norway. *Journal Clinical Microbiology*, 45(1): 199-205.

Toledo, L.; Montes, A.; Reyes, E. y Perozo, A. 2007. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela. *Kasmera* 53(3): 134-142.

Torres, L.; Gagliotta, V.; Torres, O.; Benítez, M.; Domínguez, M. y Pedroza, R. 2006. β -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26: 1315-2356.

Venezia, R.; Scarano, F.; Preston, K.; Steele, L.; Root, T. y Limberger, R. 2005. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clinical Infections Diseases*, 21:915-23.

Walsh, T.; Toleman, M., Poirel, L. y Nordman, P. 2005. Metallo- β -lactamasas: the quiet before the storm?. *Clinical Microbiology Review*, 18: 306-325.

Zamora, R.; Areu, A.; Gundián, J.; Manresa, R.; Sanchez, J. y Morales, R. 1998. Cefalosporinas. *Acta Médica*, 8(1): 40-47.

ANEXO

ANEXO 1

GENES CODIFICADORES DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO
TIPOS CTX-M, TEM Y SHV EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* AISLADAS DE
PACIENTES CON INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA

Nº Cepa _____ Especie _____

Muestra _____

Servicio _____

Tratamiento antimicrobiano recibido _____

Sexo del paciente de donde se aisló la cepa _____

Edad del paciente de donde se aisló la cepa _____

Tiempo de hospitalización del paciente _____

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	GENES CODIFICADORES DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO TIPOS CTX-M, TEM Y SHV EN CEPAS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> AISLADAS DE PACIENTES CON INFECCIÓN INTRAHOSPITALARIA
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Carpio T., Carmen V.	CVLAC
e-mail		victoriact1@hotmail.com
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Klebsiella pneumoniae</i>
β -lactamasas de espectro extendido
Cefalosporinas de tercera y cuarta generación
Reacción en cadena de la polimerasa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Microbiología	Bacteriología

Resumen (abstract):

Con el propósito de identificar molecularmente la presencia de genes codificadores de enzimas β -lactamasas tipo TEM, SHV y CTX-M, se estudiaron 20 cepas bacterianas identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en Cumaná, estado Sucre. La susceptibilidad a los β -lactámicos y la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto Estándar de Laboratorios Clínicos (2008). La detección de genes codificadores de BLEE se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El estudio de la susceptibilidad mostró que el 90,00% de las cepas estudiadas fue resistente a ceftazidima y aztreonam, y 65,00% a cefotaxima y ceftriazona, mientras que a piperacilina/tazobactam y cefepima, mostraron un porcentaje de resistencia de un 25,00% y 20,00%, respectivamente. La frecuencia de cepas productoras de BLEE fue de 90,00%. Un 70,00% de los aislados mostró la presencia de los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*, sólo en un 15,00% se detectó la presencia de los tres genes (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*) simultáneamente, a su vez se reveló la presencia del gen *bla_{SHV}* en un 10,00% y en un 5,00% mostró los genes *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}*. La presencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de enzimas β -lactamasas representan un riesgo para el centro hospitalario, ya que este mecanismo de resistencia puede diseminarse hacia otros géneros e incluso a otras familias, comprometiéndose el éxito terapéutico que pudieran tener las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y cefepima.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Guzmán, Militza	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	miltzaguz@yahoo.com
	e-mail	
Salazar, Elsa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	elsazul2003@yahoo.com
	e-mail	
Albarado, Luzmila	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	07	21

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_CVCT.doc	Aplication/ Word.doc

Alcance:

Espacial: Universal

Temporal: Intemporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

El autor garantiza en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir, por cualquier medio, contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar a la Universidad de Oriente una suma destinada a recuperar parcialmente los costos involucrados. El autor se reserva los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.

Autor
Carpio T., Carmen V.

Asesora
Guzmán, Militza

Jurado
Salazar, Elsa

Jurado
Alvarado, Luzmila

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS: