

## CAPÍTULO 3

---

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS RESISTENTES A COMBINACIONES DE BETA-LACTÁMICOS/INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASAS EN COLOMBIA

---

**Adriana María Correa Bermúdez\***

<https://orcid.org/0000-0003-2024-6975>

**Elsa De La Cadena Vivas\*\***

<https://orcid.org/0000-0003-0361-7893>

**Resumen.** Los beta-lactámicos son el grupo de antibióticos que más se utilizan desde los años veinte cuando apareció la benzilpenicilina. Sin embargo, rápidamente aparecieron enzimas que eran capaces de hidrolizar estos antibióticos, lo que llevó al desarrollo de nuevos beta-lactámicos que eran más estables a estas penicilinasas. Posterior al uso de las cefalosporinas de tercera generación aparecieron las Beta-lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs) que eran capaces de hidrolizar las cefa-

---

\* Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia

✉ [adriana.corea@usc.edu.co](mailto:adriana.corea@usc.edu.co)

\*\* Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia

✉ [ecadenav@unbosque.edu.co](mailto:ecadenav@unbosque.edu.co)

#### **Para citar este capítulo:**

Correa Bermúdez, A. y De La Cadena Vivas, E. Caracterización molecular de aislamientos resistentes a combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas en Colombia. En: Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2020). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas*. (pp. 63- 88). Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

losporinas hasta de tercera generación y el aztreonam. Esto impulsó el desarrollo de los inhibidores de beta-lactamasas, agentes estables contra las BLEEs y que se combinaron a un betalactámico tradicional. Fue así como aparecieron las combinaciones de ampicilina-sulbactam, amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam. Seguido al incremento en el uso de estos últimos, empezaron a aparecer aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a estas combinaciones. Estos beta-lactámicos más inhibidores tienen un espectro de acción hacia las beta-lactamasas de espectro reducido y las BLEEs con excepción de las AmpC y las carbapenemasas. La resistencia a los inhibidores reduce las opciones terapéuticas en infecciones por microorganismos productores de beta-lactamasas de espectro reducido y BLEEs, lo que obliga en mayor medida al uso de carbapenémicos con su consecuente aumento de resistencia. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el mecanismo de resistencia en aislamientos resistentes a las combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas. Para esto se procesaron 24 aislamientos, 10 *K. pneumoniae*, 1 *Klebsiella oxytoca* y 13 *E. coli*. Se confirmó la concentración inhibitoria mínima por E-test, microdilución en caldo y disco difusión. Se realizó PCR para  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{OXA-1}$  y  $bla_{KPC}$ . Adicionalmente se determinó la expresión de genes tipo TEM y SHV por RT-PCR en tiempo real. Los resultados mostraron que el fenotipo de resistencia a los inhibidores estaba asociado a mecanismos como la hiper-expresión de  $bla_{TEM}$  o  $bla_{SHV}$ , la presencia de  $bla_{OXA-1}$  o  $bla_{KPC}$ , y no a la producción de mutantes de tipo TEM-1 o SHV-1 (IRT/IRS) asociados a la resistencia a los inhibidores de beta-lactamasas.

**Palabras claves:** *Enterobacteriales, inhibidores de beta-lactamasas, resistencia a inhibidores.*

**Abstract.** Beta-lactams are the antibiotics group that have been used since the 1920s when benzylpenicillin appeared. However, enzymes that easily hydrolyzed these antibiotics quickly emerged, leading to the development of new beta-lactams that were more stable to these penicillinases. With the development and use of third generation cephalosporins, appeared the Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) that were capable of hydrolyzing cephalosporins up to third generation. This allowed the introduction of commercial beta-lactamase inhibitors with high affinity for beta-lactamases, acting as 'suicide substrates' of these enzymes, such as sulbactam, clavulanic acid, and tazobactam, stable agents against ESBLs. Nevertheless, bacteria have developed beta-lactamase variants that are able to resist the action of suicide inhibitors. Within this group are the so-called inhibitor-resistant TEM/SHV (IRT/IRS) beta-lactamases. They have been associated with clinical failure with the use of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. Further, reduces the therapeutic options in infections by microorganisms that produce low-spectrum beta-lactamases and ESBLs, which increase the use of carbapenems and its resistance. The objective of this work was to characterize the resistance mechanisms to beta-lactam/beta-lactamases inhibitor combinations. For this, 24 isolates, 10 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca* and 13 *E. coli* were processed. The minimum inhibitory concentration was confirmed by E-test, broth microdilution, and disc diffusion. PCR was performed for  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{OXA-1}$  and  $bla_{KPC}$ . Furthermore, the hyperexpression of  $bla_{TEM}$  and  $bla_{SHV}$  was determined by real-time PCR. The results showed that the inhibitor resistance phenotype was associated with mechanisms such as  $bla_{TEM}$  or  $bla_{SHV}$  hyperexpression,  $bla_{OXA-1}$  or  $bla_{KPC}$ , and not with the production of IRT/IRS.

## **1. Introducción**

Desde 1983, año en que se describió por primera vez una beta-lactamasa de espectro extendido (BLEEs), los reportes fueron aumentando considerablemente en prácticamente todo el mundo (Knothe et al., 1983). Diversos estudios han permitido obtener datos acerca de la prevalencia de las infecciones causadas por *Enterobacteriales* productores de BLEEs (Coque et al., 2008). En general lo que se observa es que las BLEEs en Europa son por mucho, menos frecuentes en relación con Asia y América Latina, no obstante, son más comunes que en Norteamérica. Estas enzimas se han diseminado tanto en infecciones de origen en la comunidad, como asociadas a la atención en salud. Sin embargo, no se ha establecido una diferenciación clara entre los aislamientos que producen infecciones provenientes de la comunidad o nosocomiales (Coque et al., 2008).

El reporte del *European Antibiotic Resistance Surveillance System* (EARSS) del 2006, en el que participaron alrededor de 800 laboratorios de 31 países, mostró un continuo incremento en los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación desde el año 2000, con prevalencias superiores al 10% en la mitad de los países participantes (Coque et al., 2008). Adicionalmente, este reporte permitió observar diferencias geográficas importantes entre los países participantes, por ejemplo, en algunas áreas, los aislamientos de *E. coli* portadores de BLEEs estaban por debajo del 1% (Estonia), mientras en otras estaba alrededor del 41% (Rumania); para *K. pneumoniae* estaban entre el 0% (Islandia) hasta el 91% (Rumania) (Coque et al., 2008).

Durante los años noventa en Europa se reportaron brotes hospitalarios por aislamientos de *K. pneumoniae* portadoras de BLEEs, y se encontró que correspondían principalmente a enzimas derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Actualmente, se reconoce que ha habido un cambio en

la distribución de las BLEEs debido a un aumento en la aparición de enzimas tipo CTX-M sobre las derivadas de TEM y SHV (Coque et al., 2008; Correa et al., 2015). La emergencia y amplia diseminación de la variante CTX-M 15 asociada al clon de alto riesgo ST131 en la mayoría de países europeos es uno de los aspectos más relevantes asociados a la epidemiología de las BLEEs en Europa (Cantón et al., 2012; Mathers et al. 2015). Esta beta-lactamasa ha sido asociada a infecciones producidas por microorganismos de origen en la comunidad como se ha documentado en diferentes estudios (Dautzenberg et al., 2016; Peirano et al., 2010). Otras variantes de CTX-M son importantes en algunos países, como CTX-M 9 y CTX-M 10 en España, CTX- 14 en Portugal y España, CTX-M 3 en los países del este y CTX-M 5 en Rusia. Dentro de las enzimas tipo SHV la más prevalente es SHV-12 la cual se ha asociado a aislamientos nosocomiales de *K. pneumoniae* en Italia, Polonia y España. En cuanto a las enzimas derivadas de TEM, son importantes TEM-3 y TEM-4 que están asociadas a clones epidémicos de *K. pneumoniae* en Francia y España, mientras TEM-24 está asociado a cepas de *Klebsiella aerogenes* en Bélgica, Francia Portugal y España. Actualmente estas enzimas han sido, además, caracterizadas en aislamientos de *P. mirabilis* causantes de infecciones proveniente de la comunidad (Coque et al., 2008).

Aunque existen pocos estudios sobre la prevalencia y distribución de las BLEEs en Asia, algunos de ellos reportan que las BLEEs se han distribuido ampliamente entre los enterobacteriales. En el estudio SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* (1998-2002), se demostró que la prevalencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs fue más alta en Singapur y China (35,6% y 30,7% respetivamente), seguida por Filipinas, Taiwán, Hong Kong y Japón. Los aislamientos de *E. coli* productora de BLEEs se presentaron en China principalmente con un 24,5%, seguidos por Hong Kong (14,3%), Singapur (11,3%), Taiwán, Filipinas y Japón (Sader et al., 2019).

En Estados Unidos, los resultados obtenidos en el TEST (*Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*) entre los años 2005 a 2007 para aislamientos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *K. aerogenes*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* obtenidos de 172 centros, arrojaron como resultado que del total de aislamientos de *K. pneumoniae* (1486) el 7,3 % eran productores de BLEEs para el 2005, el 11,6% para el 2006 y 7,7% para el 2007, con una tasa media de 8,9% en los tres años (Coque et al., 2008). Muy pocas *K. oxytoca* fueron identificadas como productoras de BLEEs, tan solo el 3,8% (9/303), 1,8% (5/282) y 1,4% (3/216) para los años 2005, 2006 y 2007 respectivamente, con una tasa media de 2,1% para los tres años (Dowzicky et al., 2008).

El primer reporte de BLEEs en Latinoamérica se realizó en Chile, en el año 1985, y se debió a un aislado de *K. pneumoniae* con SHV-5 (Gutmann et al., 1989). En América Latina, estudios realizados por SENTRY y el TEST reportaron que la frecuencia de microorganismos productores de BLEEs es mucho más alta en esta zona que en el resto del mundo. Se ha reportado que aproximadamente el 45% de las *K. pneumoniae* y el 8,5% de *E. coli* presentan fenotipos característicos de BLEEs (Villegas et al., 2004; Casellas et al., 2003). En Argentina, por ejemplo, existen estudios que demuestran que la enzima más prevalente en infecciones hospitalarias es CTX-M 2, la cual corresponde al 67% de las beta-lactamasas presentes en los aislamientos; PER-2 fue detectada en un 18%, mientras las derivadas de SHV ocuparon el tercer lugar, pero se encontraron casi exclusivamente en aislamientos de *K. pneumoniae* (Casellas et al., 2003; Quinteros et al. 2003). En Colombia, las BLEEs han sido reportadas desde 1990, y se ha observado una alta prevalencia de estas enzimas en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, con tasas similares a las reportadas en otros países latinoamericanos, aunque en algunas regiones las tasas son significativamente más altas, 71,4% para *K. pneumoniae* y 16,7% para *E. coli* en unidades de cuidado intensivo (Villegas et al., 2004).

## Enzimas resistentes a inhibidores

Con la rápida diseminación e incremento en las infecciones por aislamientos productores de BLEEs se dio un incremento en el uso de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas; lo que llevó a la aparición de aislamientos resistentes a los inhibidores a principios de los 90s (Bradford PA, 2001). Esta resistencia se puede deber a la producción de mutantes de BLEEs tipo TEM o SHV que son resistentes a los inhibidores, pero tienen menor acción hidrolítica contra las cefalosporinas (Chaïbi et al., 1999). Otros mecanismos que pueden conferir resistencia a los inhibidores clásicos (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) incluyen la adquisición de AmpC plasmídico, hiper-producción de AmpC cromosomal intrínseca de *E. coli*, producción de algunas variantes de enzimas tipo OXAs resistentes a los inhibidores e incluso baja expresión de enzimas tipo KPC (Kaye et al., 2004).

Una de las principales funciones del laboratorio de microbiología es suministrar información al clínico respecto del perfil de susceptibilidad de los aislamientos causantes de la infección, que permita orientar una terapia acertada y oportuna. Un análisis detallado del perfil de susceptibilidad a los antibióticos ayuda a detectar posibles mecanismos de resistencia que pueden pasar inadvertidos o errores en la interpretación del fenotipo que pueden llevar a un reporte erróneo (Cantón et al., 2001). Aislamientos susceptibles a las cefalosporinas con fenotipo de resistencia a los inhibidores (IRT/IRS) están conformados por un grupo de variantes de TEM y SHV resistentes a las aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, e inhibidores de beta-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Pei-jun et al., 1995). Estas enzimas afectan más a ampicilina-sulbactam y amoxicilina-ácido clavulánico, pero en ocasiones pueden llegar a afectar incluso a piperacilina-tazobactam. Se han reportado con mayor frecuencia en aislamientos de *E. coli*, pero también en *K. pneumo-*

*niae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Shigella sonnei*. Este tipo de resistencia solo se puede inferir en aislamientos que naturalmente son sensibles a la combinación de beta-lactámico/inhibidor de beta-lactamasas, no en aislamientos que portan naturalmente AmpC cromosomal inducible como *E. cloacae* y *C. freundii*.

Los inhibidores de las beta-lactamasas de la clase A tienen una gran afinidad por estas enzimas, actuando como inhibidores suicidas y protegiendo de esta forma al antibiótico de ser hidrolizado (Bush et al., 2016). El aumento en el uso de estos inhibidores llevó a que aparecieran variantes de TEM resistentes a los inhibidores a los que se denominaron IRT (*inhibition resistant TEM*). Posteriormente aparecieron variantes de SHV (*Inhibition Resistant SHV- IRS*) y CTX-M que igualmente eran resistentes a los beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas. Cuando se detectan estos aislamientos con fenotipo IRT/IRS se debe evitar el uso de la combinación de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas, pero todavía podrían utilizarse otros beta-lactámicos dependiendo del resultado del antibiograma, el estado clínico del paciente y el sitio de infección. En aislamientos portadores de BLEEs y que adicionalmente presentan el fenotipo IRT/IRS se ven reducidas las opciones terapéuticas.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el mecanismo de resistencia en un grupo de aislamientos resistentes a las combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas provenientes de cinco ciudades de Colombia.

## **2. Materiales y métodos**

Se recibieron 24 aislamientos de seis hospitales en cinco ciudades de Colombia recolectados durante el 2010 con resistencia a alguna de las combinaciones de betalactámico/inhibidor de beta-lactamasas.

Los aislamientos fueron re-identificados por Vitek 2 (*BioMerieux, Marcy l' Etoile, France*) y se confirmó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por microdilución en caldo (Sensititre panels; TREK Diagnostic Systems, England). Se confirmó la CIM de amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, cefalotina y ceftioxin por E-test (*BioMerieux, Marcy l' Etoile, France*) y difusión con disco. Se realizó prueba fenotípica para descartar la producción de carbapenemasas y PCR para  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{OXA-1}$  y  $bla_{KPC}$ . Los genes positivos para  $bla_{SHV}$  y  $bla_{TEM}$  fueron secuenciados para identificar las variantes de TEM y SHV resistentes a los inhibidores (IRT/IRS). Se realizó RT-PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) para detectar el nivel de expresión de  $bla_{TEM}$  o  $bla_{SHV}$ . Como control de calidad se utilizaron cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922™ y *Escherichia coli* 35218™.

### 3. Resultados

En la tabla 4 se muestran las CIM de los 24 aislamientos. Todos los aislamientos eran susceptibles a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y ertapenem, excepto el aislamiento No 15 que tenía una CIM resistente a aztreonam (16 mg/l). El 37,5% (9/24) de los aislamientos eran no susceptibles a piperacilina/tazobactam, 96% (23/24) no susceptibles a ampicilina/sulbactam y 91,3% (21/23) no susceptible a amoxicilina/clavulanato. Al confirmarse la susceptibilidad, uno de los aislamientos fue susceptible a todas las combinaciones de beta-lactámico/inhibidor de beta-lactamasas. El 50% (12/24) de los aislamientos fueron resistentes a ampicilina/sulbactam y amoxicilina/clavulanato simultáneamente, y el 33,3% (8/24) fueron resistentes a los tres inhibidores (Fig. 4). Todos los aislamientos fueron susceptibles a ceftioxin mientras la cefalotina fue no susceptible en el 91,6% (22/24) de los aislamientos. La prueba de tamizaje para carbapenemasas resultó negativa para todos los aislamientos, excepto un aislamiento que resultó portador de  $bla_{KPC}$ . Dos aislamientos fueron positivos para  $bla_{OXA-1}$ .

Un total de 9/10 aislamientos de *K. pneumoniae* tenían  $bla_{SHV-1}$ , 4 de los cuales hiper-expresaban la beta-lactamasa, 12/13 aislamientos de *E. coli* tenían  $bla_{TEM-1}$ , al igual que uno de los aislamientos de *K. pneumoniae*. El otro aislamiento de *E. coli* solo fue positivo para  $bla_{OXA-1}$ . De los 13 aislamientos con  $bla_{TEM-1}$ , 5 hiper-expresaban la enzima. De los 9 aislamientos que hiper-expresaban  $bla_{TEM-1}$  o  $bla_{SHV-1}$ , 8 fueron resistentes a los tres inhibidores (Figura 5 - Tabla 5). Uno de los aislamientos de *E. coli* mostró una expresión de  $bla_{TEM-1}$  por debajo de lo normal, este aislamiento resultó portador de  $bla_{OXA-1}$ . En el caso del aislamiento de *K. pneumoniae* con baja expresión de  $bla_{SHV-1}$ , este aislamiento fue positivo para  $bla_{KPC}$ .

Al analizar las secuencias y compararlas con las secuencias reportadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) ninguno de estos aislamientos resultó ser una IRT/IRS.

#### 4. Discusión

El uso de la combinación de betalactámico/inhibidor de beta-lactamasas para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos Gram negativos productores de BLEEs es muy controversial hoy en día (Schuetz et al., 2018). El fenotipo IRT/IRS confiere resistencia a los inhibidores, en mayor grado a amoxicilina/clavulanato y ampicilina/sulbactam, y afecta en menor grado a piperacilina/tazobactam, mientras la actividad de las cefalosporinas no se ve afectada. Detectar estos mecanismos de resistencia es difícil y más cuando se presenta con otros mecanismos de resistencia como BLEEs, hiper-expresión de de TEM-1 o SHV-1, incluso las IRT/IRS cuando las bacterias también cierran porinas.

Tabla 4. Resultados del perfil de susceptibilidad antimicrobiana (mg/l)

No	ID	MUESTRA	SALA	TZP	AMS	AMC	FOT	AXO	CAZ	AZT	FEP	ERT
1	eco	ORINA	CEX	4	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
2	eco	ORINA	CEX	32	64	8	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
3	eco	ORINA	CEX	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
4	eco	SANGRE	UCIA	16	32	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
5	eco	ORINA	URG	4	32	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
6	kpn	TGI	H 6 P	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
7	kpn	ORINA	H 5 P OR	8	128	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
8	kpn	ORINA	H 4 P OR	2	16	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
9	kpn	HDA QX	H 4 P OR	>128	>256	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
10	kpn	ORINA	UCI A	16	64	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
11	eco	ORINA	UCI A	8	64	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
12	kpn	HDA QX	p9	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
13	kpn	SANGRE	H4P	4	64	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
14	kpn	ORINA	CEX	2	32	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
15	kox	HDA QX	P 3	>128	128	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
16	kpn	TEJODP	H2P	2	64	8	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
17	eco	ORINA	CEXT	2	8	8	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
18	eco	ORINA	URG	>128	>256	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
19	eco	ORINA	cext	2	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
20	eco	ORINA	CEXT	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
21	eco	ORINA	URG	>128	>256	32	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
22	eco	ORINA	URG	8	128	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
23	eco	SOT	UCI P	8	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5
24	kpn	ORINA	MI	2	64	16	<=1	<=1	<=2	<=2	<=1	<=0.5

**Abreviaturas:** TZP: Piperacilina/tazobactam, AMS: Ampicilina/Sulbactam, AMC: Amoxicilina/Clavulanato, FOT: Cefotaxime, CAZ: Ceftriaxona, AXO: Ceftriaxona, CAZ: Ceftriaxona, AZT: Aztreonam, FEP: Cefepime, ERT: Ertapenem. Eco: *E. coli*, Kpn: *K. pneumoniae*, Kox: *K. oxytoca*, TGI: Tracto Gastrointestinal, HDA QX: Herida Quirúrgica, SOT: Secreción Orotraqueal, CEX: Consulta Externa, URG: Urgencias, HOSP: Salas de Hospitalización General, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, UCIP: Unidad de Cuidados Pediátricos.

**Fuente:** Elaboración propia.

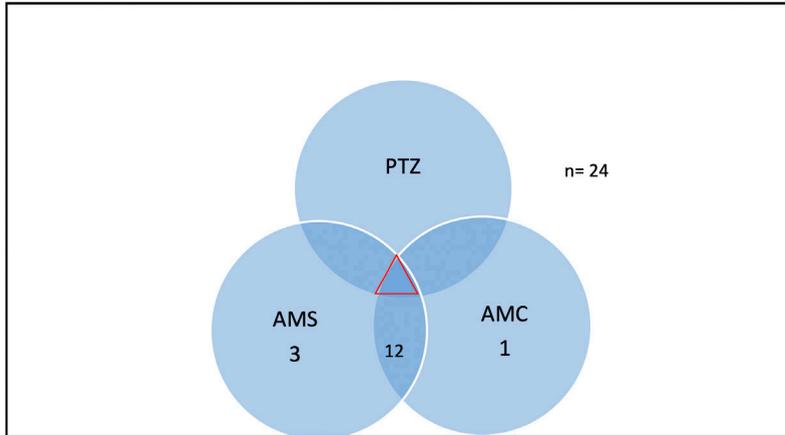
**Tabla 5. Resultados de las pruebas moleculares para  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{OXA-1}$  y  $bla_{KPC}$**

No	Ciudad	ID	CEF	TZP	AMS	AMC	FOX	TEM-1	SHV-1	CTX-M	OXA-1	KPC
1	Cali	kpn	I	4	64	16	S	-	+	-	-	-
2	Cali	kpn	R	32	64	8	S	-	+	-	-	-
3	Cali	kpn	R	>128	>256	32	S	-	+	-	-	-
4	Cali	eco	R	16	32	16	S	-	-	-	+	-
5	Cali	eco	R	4	32	16	S	+	-	-	-	-
6	Cali	kpn	R	>128	>256	32	S	-	+	-	-	-
7	Cali	eco	R	8	128	32	S	+	-	-	-	-
8	Cali	eco	R	2	16	16	S	+	-	-	-	-
9	Cali	eco	R	>128	>256	16	S	+	-	-	-	-
10	Cali	kpn	R	16	64	32	S	-	+	-	-	+
11	Cali	eco	R	8	64	32	S	+	-	-	-	-
12	Pereira	kpn	R	>128	>256	32	S	-	+	-	-	-
13	Pereira	eco	R	4	64	32	S	+	-	-	-	-
14	Barranquilla	kpn	R	2	32	16	S	-	+	-	-	-
15	Bogotá	kox	R	>128	128	32	S	-	-	-	-	-
16	Bogotá	kpn	R	2	64	8	S	+	-	-	-	-
17	Pereira	eco	R	2	8	8	S	+	-	-	-	-
18	Bucaramanga	kpn	S	>128	>256	16	S	-	+	-	-	-
19	Bogotá	eco	S	2	64	16	S	+	-	-	-	-
20	Bogotá	eco	R	>128	>256	32	S	+	-	-	-	-
21	Bogotá	eco	R	>128	>256	32	S	+	-	-	-	-
22	Bogotá	eco	R	8	128	16	S	+	-	-	+	-
23	Barranquilla	kpn	R	8	64	16	S	-	+	-	-	-
24	Bogotá	eco	I	2	64	16	S	+	-	-	-	-

**Abreviaturas:** TZP: piperacilina/tazobactam, CEF: cefalotina, AMS: ampicilina/sulbactam, AMC: amoxicilina/clavulanato, FOX: cefoxitin. Eco: *E. coli*, Kpn: *K. pneumoniae*, Kox: *K. oxytoca*.

**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 4. Distribución de los aislamientos resistentes

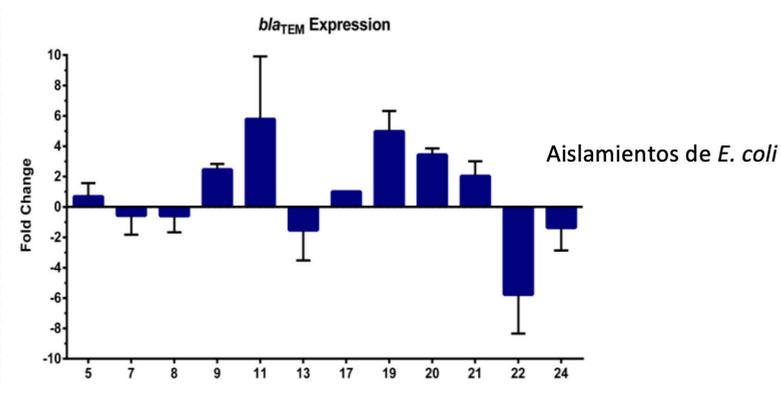


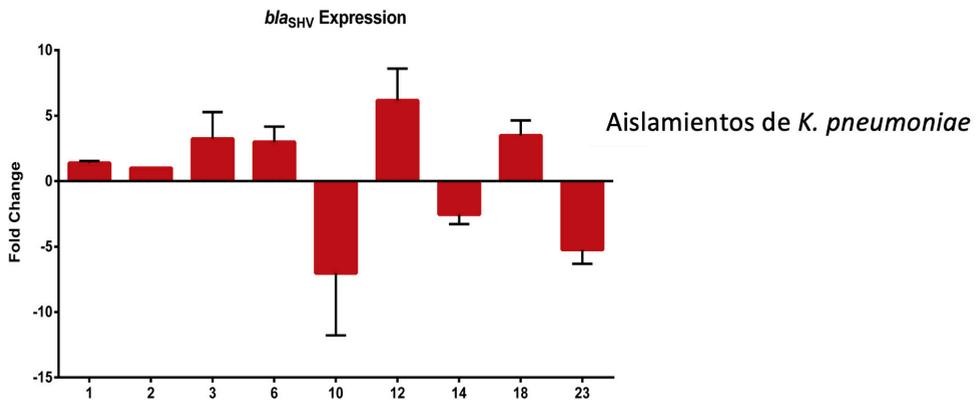
**Abreviaturas:** PTZ: piperacilina/tazobactam, AMS: Ampicilina/Sulbactam,

AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico

**Fuente:** Elaboración propia.

Figura 5. Expresión de  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$  por RT-qPCR en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*





Fuente: Elaboración propia.

Ninguno de los 24 aislamientos analizados en este estudio tenía enzimas tipo TEM o SHV asociadas al fenotipo IRT/IRS. Al igual que lo que se ha reportado en Europa el fenotipo de resistencia a inhibidores en nuestro país no está asociado a la presencia de IRT/IRS; se debe en mayor medida a la hiper-expresión de  $bla_{TEM-1}$  o  $bla_{SHV-1}$  y en menor medida a la presencia de enzimas tipo OXA-1 o KPC. En un estudio realizado en España con 3.556 aislamientos de *E. coli* encontraron que el 4,3% de estos eran resistentes a ampicilina-sulbactam. De estos, el 12% de esta resistencia se debía a la presencia de IRTs, el 61% se debía a la hiper- expresión de  $bla_{TEM-1}$ , portadores de BLEEs (15%), hiper-expresión de la AmpC constitutiva o AmpC adquirida (12%). Adicionalmente se encontraron discrepancias en la categorización de los inhibidores dependiendo de la metodología utilizada (Martín et al. 2010). En otro estudio realizado por Picazo et al., en el 2015 de 70 aislamientos de *E. coli* resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, el 40% tenía enzimas tipo IRT. Todos los aislamientos provenían de infección urinaria, de estos el 75% tenían origen en la comunidad, y el 25% eran infecciones hospitalarias (Ríos et al., 2015). En general la resistencia a los inhibidores se ha descrito mas en aislamientos de *E. coli* causantes de infección urinaria (Mukherjee et al.,

2018). Esto podría ser consecuencia del uso frecuente de la combinación de beta-lactámicos- inhibidores de beta-lactamasas.

De los 24 aislamientos, nueve (37,5%) hiper-expresaban  $bla_{TEM-1}$  o  $bla_{SHV-1}$ , lo que explica el fenotipo de resistencia a inhibidores. Promotores fuertes, además de mutaciones en estos promotores le permiten a la enzima extender su espectro de hidrólisis e incrementar la concentración inhibitoria mínima de los inhibidores, especialmente amoxicilina/ácido clavulánico y ampicilina/sulbactam (Robin et al., 2005). En aislamientos de *K. pneumoniae* se ha reportado que mutaciones en SHV-1, enzima cromosomal e intrínseca en *K. pneumoniae* y responsable de la resistencia natural a ampicilina en este microorganismo pueden aumentar la expresión de la enzima y conferir resistencia a los inhibidores (Dubois et al., 2008).

El aislamiento de *K. pneumoniae* portador de  $bla_{KPC}$  era resistente a ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico y cefalotina; y susceptible al resto de los antibióticos beta-lactámicos. Aislamientos portadores de  $bla_{KPC}$  pueden observarse fenotípicamente sensibles por una baja expresión del gen, presencia de promotores débiles o bajo número de copias del gen, pero pueden afectar la combinación con inhibidores confiriendo resistencia. Dos aislamientos de *E. coli* eran productores de OXA-1, estos aislamientos pueden tener adicionalmente susceptibilidad reducida a cefepime y pueden presentar discrepancias en el perfil de susceptibilidad e identificación del mecanismo de resistencia por los sistemas expertos de los equipos automatizados (Cantón et al., 2001). En aislamientos portadores de estos genes debería evitarse el uso de cefepime, especialmente si la enzima está hiper-producida y se observa susceptibilidad reducida en la CIM in vitro. Ninguno de los aislamientos tenía una AmpC adquirida. En el caso de los aislamientos de *E. coli*, son portadores de una AmpC intrínseca que se expresa normalmente en muy

bajo nivel, la hiper-expresión de esta enzima se ha asociado con resistencia a los inhibidores, sin embargo, en este estudio no se examinó la expresión de AmpC. El aislamiento No 15, *K. oxytoca* era resistente a los inhibidores y a aztreonam (Tabla 4). Este aislamiento dio negativo para todos los genes buscados. *K. oxytoca* es portador de una enzima denominada K1, que es intrínseca y le confiere resistencia natural a ampicilina. K1 tiene especial predilección por aztreonam, y su hiper-expresión podría elevar la CIM del mismo, sin embargo, en este estudio no se tamizó K1.

Veinte de los aislamientos resultaron no susceptibles a cefalotina, esta resistencia a las cefalosporinas de primera generación se ha asociado más a la resistencia a inhibidores debido a otros mecanismos distintos de IRT/IRS; aislamientos con fenotipo IRT/IRS tienden a ser susceptibles a cefalotina.

La piperacilina/tazobactam conserva la actividad inhibitoria contra la mayoría de aislamientos resistentes a los inhibidores, con contadas excepciones (Bonomo et al., 1997). Esta es una de las combinaciones más utilizadas contra estas infecciones, sin embargo, su eficacia ha sido muy discutida, y algunos estudios muestran resultados contradictorios. Mientras algunos muestran que tiene una buena actividad en infecciones urinarias, y podría tenerla en otro tipo de infecciones con CIM dentro del rango sensible, otros estudios han encontrado una eficacia reducida y altas tasas de mortalidad, especialmente en infecciones severas como bacteriemias. Adicionalmente a esto presenta discrepancias en los resultados de susceptibilidad (Esparza et al., 2019).

Las combinaciones de beta-lactámico/inhibidores de beta-lactamasas son muy usadas en infecciones urinarias, infecciones de piel y tejido blanco, neumonía adquirida en la comunidad y bacteriemia, especialmente cuando se sospecha de *E. coli*. Sin embargo, en los últimos años se ha visto un

aumento de la resistencia a inhibidores (Cantón et al., 2008). La presencia de microorganismos con fenotipo IRT/IRS se ha asociado con falla clínica, especialmente en infecciones urinarias. La opción terapéutica en estos aislamientos es mayor que en otros casos, excepto que se presente con otros mecanismos, como por ejemplo presencia de BLEEs. Un estudio en Estados Unidos encontró que el fenotipo IRT era producido por hiperproducción de TEM o AmpC más que por IRT. En este estudio se encontró que el uso previo de ampicilina/sulbactam era un factor de riesgo para desarrollar resistencia a los inhibidores (Waltner-Toews et al. 2011). Esto podría indicar que el uso de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas ha llevado al incremento en su resistencia, y que durante el uso de estas combinaciones en aislamientos previamente susceptibles la hiper-expresión de enzimas tipo TEM y SHV podría llevar a una falla terapéutica dependiendo de factores como el sitio de infección e inóculo.

## **5. Agradecimiento**

Al Grupo de Resistencia Bacteriana perteneciente al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) en donde fue desarrollado este trabajo.

## **Bibliografía**

- Bonomo, R. A.; S. A. Rudin y D. M. Shlaes (1997). "Tazobactam Is a Potent Inactivator of Selected Inhibitor-Resistant Class A  $\beta$ -Lactamases." *FEMS Microbiology Letters* 148 (1):59–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00013-X).
- Bradford ,PA. (2001). "Extended-Spectrum B-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threa." *Clinical Microbiology Reviews* 14 (4):933–51. <https://doi.org/10.1128 /CMR .14.4.933>.
- Bush, Karen y Patricia A. Bradford (2016). *B -Lactams and B -Lactamase Inhibitors: An Overview*, No. Table 1.
- Cantón, R.; M. I. Morosini; O. Martin; S. De La Maza & E. Gomez G. De La Pedrosa. (2008). "IRT and CMT  $\beta$ -Lactamases and Inhibitor Resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 14 (SUPPL. 1):53–62. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01849.x>.
- Cantón, R.; González-Alba, J. y Galán, J. (2012). "CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion." *Frontiers in Microbiology* 3 (APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>.
- Cantón, R.; Pérez-Vázquez, M.; Oliver, A.; Coque, TM.; Loza, E.; Ponz, F. & Baquero, F. (2001). "Validation of the VITEK2 and the Advance Expert System with a Collection of Enterobacteriaceae Harboring Extended Spectrum or Inhibitor Resistant  $\beta$ -Lactamases." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 41 (1–2):65–70. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00286-3).

- Casellas, JM.; Tomé, G.; Bantar, C.; Bertolini, P.; Blázquez, N.; Borda, N.; Couto, E.; et al. (2003). "Argentinean Collaborative Multicenter Study on the in Vitro Comparative Activity of Piperacillin-Tazobactam against Selected Bacterial Isolates Recovered from Hospitalized Patients." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47 (3):527–37. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00131-7).
- Chaïbi, E. B.; D. Sirot; G. Paul & R. Labia (1999). "Inhibitor-Resistant TEM  $\beta$ -Lactamases: Phenotypic, Genetic and Biochemical Characteristics." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43 (4):447–58. <https://doi.org/10.1093/jac/43.4.447>.
- Coque, T M; F Baquero y R Canton (2008). "Increasing Prevalence of ESBL - Producing Enterobacteriaceae in Europe." *Eurosurveillance* 13 (47):1–11.
- Correa, A., del Campo, R., Perenguez, M., Blanco, V. Rodríguez-Baños, M., Perez, F., Maya, J. et al. (2015). "Dissemination of High-Risk Clones of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* in Colombia." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (4):2421–25. <https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>.
- Dautzenberg, M. J.D., M. R. Haverkate, M. J.M. Bonten, & M. C.J. Bootsma. 2016. "Epidemic Potential of *Escherichia Coli* ST131 and *Klebsiella Pneumoniae* ST258: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BMJ Open* 6 (3). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009971>.
- Dowzicky, MJ & Park, CH. (2008). Update on antimicrobial susceptibility rates among gram-negative and gram-positive organisms in the United States: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) 2005 to 2007. *Clin Ther.* 2008;30(11):2040-2050.

- Dubois, V.; Poirel, L.; Demarthe, F.; Arpin, C.; Coulange, L.; Minarini, LA.; Bezian, MC.; Nordmann, P. & Quentin, C. (2008). "Molecular and Biochemical Characterization of SHV-56, a Novel Inhibitor-Resistant  $\beta$ -Lactamase from *Klebsiella Pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (10):3792–94. <https://doi.org/10.1128/AAC.00387-08>.
- Esparza, G.; Villegas, MV.; Vega, S.; en nombre de los Comités de Microbiología & PROA y Resistencia de la Asociación Panamericana de Infectología (API) y de Antimicrobianos (2019). "Recomendaciones sobre el tamizaje y uso de Piperacilina/tazobactam En Infecciones por Productores de Betalactamasas de Espectro Extendido ( $\beta$ LEEs)." *Rev Panam Enf Inf* 0 (0):1–3.
- Gutmann, L.; B. Ferre; F. W. Goldstein; N. Rizk; E. Pinto-Schuster; J. F. Acar & E. Collatz (1989). "SHV-5, a Novel SHV-Type  $\beta$ -Lactamase That Hydrolyzes Broad-Spectrum Cephalosporins and Monobactams." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (6):951–56. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.6.951>.
- Kaye, KS, Gold, HS, Schwaber, MJ, et al. (2004). "Variety of  $\beta$ -Lactamases Produced By.pdf." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:1520–25.
- Knothe, H.; Shah, P.; Krcmery, V.; Antal, M. & Mitsuhashi, S. (1983). "Transferable Resistance to Cefotaxime, Cefoxitin, Cefamandole and Cefuroxime in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia Marcescens*." *Infection* 11 (6):315–17. <https://doi.org/10.1007/BF01641355>.

- Quinteros, M.; Radice, M.; Gardella, N.; Rodriguez, M. M.; Costa, N.; Korbenfeld, D.; Couto, E.; Gutkind, G. & Microbiology Study Group (2003). Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(9), 2864–2867. <https://doi.org/10.1128/aac.47.9.2864-2867.2003>
- Martín, O.; Valverde, A.; Morosini, M.I.; Rodríguez-Domínguez, M.; Rodríguez-Baños, M.; Coque, T.M.; Cantón, R.; del Campo, R. (2010). “Population Analysis and Epidemiological Features of Inhibitor-Resistant-TEM- $\beta$ -Lactamase-Producing Escherichia Coli Isolates from Both Community and Hospital Settings in Madrid, Spain.” *Journal of Clinical Microbiology* 48 (7):2368–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.00608-10>.
- Mathers, AJ; Peirano, G; Pitout, JD. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-591. doi:10.1128/CMR.00116-14
- Mukherjee, SK.; Mandal, RS.; Das, S.; Mukherjee, M. (2018). Effect of non- $\beta$ -lactams on stable variants of inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamase in uropathogenic Escherichia coli: implication for alternative therapy. *J Appl Microbiol.* 2018;124(3):667-681. doi:10.1111/jam.13671
- Peirano, G . y Johann, D. D. Pitout. (2010). “Molecular Epidemiology of *Escherichia Coli* Producing CTX-M B-Lactamases: The Worldwide Emergence of Clone ST131 O25: H4.” *International Journal of Antimicrobial Agents.* <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003>.

- Ríos, E; López, MC; Rodríguez-Avial, I; Pena, I; Picazo, JJ. (2015). Characterization of Inhibitor-Resistant TEM  $\beta$ -Lactamases and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates. *Microb Drug Resist.* 2015;21(5):512-515. doi:10.1089/mdr.2015.0039
- Robin, F.; J. Delmas; C. Chanal; D. Sirot; J. Sirot & R. Bonnet (2005). "TEM-109 (CMT-5), a Natural Complex Mutant of TEM-1  $\beta$ -Lactamase Combining the Amino Acid Substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5)." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (11):4443-47. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4443-4447.2005>.
- Sader, HS.; Rhomberg, PR.; Fuhrmeister, AS.; Mendes, RE.; Flamm, RK.; Jones, RN. (2019). Antimicrobial Resistance Surveillance and New Drug Development. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(Suppl 1):S5-S13. Published 2019 Mar 15. doi:10.1093/ofid/ofy345
- Schuetz, AN; Reyes, S.; Tamma, PD. (2018). "Crossm Positive Organisms". *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 56 (3):1-8.
- Stapleton, P.; Wu, P. J.; King, A.; Shannon, K.; French, G. & Phillips, I. (1998). Incidence and Mechanisms of Resistance to the Combination of Amoxicillin and Clavulanic Acid in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2773..
- Villegas, MV.; Correa, A.; Perez, F.; Miranda, MC.; Zuluaga, T. & Quinn, JP. (2004). "Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella Pneumoniae* and *Escherichia Coli* Isolates from Colombian Hospitals". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49 (3):217-22. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.03.001>.

Waltner-Toews RI.; Paterson, DL.; Qureshi, ZA.; et al. (2011). Clinical characteristics of bloodstream infections due to ampicillin-sulbactam-resistant, non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and the role of TEM-1 hyperproduction. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):495-501. doi:10.1128/AAC.00797-10

