



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES DE  
RESISTENCIA A  $\beta$ -LACTÁMICOS Y QUINOLONAS DE  
LOCALIZACIÓN PLASMÍDICA EN ENTEROBACTERIAS.**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

Magíster en Biología Molecular Médica

**Lic. Paola Mariela Saba Villarroel**

Directora: Dra. Marcela Radice

Co-director: Dr. José Di Conza

Laboratorio de Resistencia Bacteriana, Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Universidad de Buenos Aires

**Buenos Aires-Argentina**

2014

DEDICATORIA.....	1
RECONOCIMIENTO.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Enterobacterias.....	7
<i>Los Antibióticos β-lactámicos</i> .....	9
Mecanismo de acción.....	10
Mecanismos de resistencia bacteriana.....	11
β-lactamasas.....	12
Clasificación de β-lactamasas.....	12
β-lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	13
β-Lactamasas de clase A de AMBLER.....	14
β-lactamasas tipo TEM.....	14
β-lactamasas tipo SHV.....	14
β-lactamasas tipo CTX-M.....	15
β-lactamasas tipo PER.....	16
β-lactamasas tipo GES.....	16
β-lactamasas de clase D AMBLER.....	17
β-lactamasas tipo OXA.....	17
β-lactamasas de clase C de AMBLER.....	17
β-lactamasas de tipo AmpC.....	17
Antibióticos quinolónicos.....	18
Clasificación y espectro de acción de las quinolonas.....	19
Mecanismo de acción.....	20
Resistencia bacteriana a quinolonas.....	20
Resistencia plasmídica a quinolonas.....	21
Proteínas Qnr.....	21
Enzima Aac(6')-Ib-cr (aminoglucósido acetiltransferasa).....	22
Bomba de eflujo QepA.....	23
Bomba de eflujo OqxAB.....	23
ANTECEDENTES.....	24

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	26
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Aislamientos bacterianos.....	29
Criterios de inclusión.....	29
Enfoque y tipo de investigación.....	29
Identificación de enterobacterias.....	29
Ensayos microbiológicos.....	30
Ensayos moleculares.....	31
Obtención de ADN total.....	31
Extracción de ADN plasmídico.....	31
Detección de genes codificantes de $\beta$ -lactamasas y de resistencia a quinolonas de localización plasmídica.....	31
Ensayos de tipificación bacteriana.....	35
Ensayo de digestión de fragmentos amplificados por PCR: RFLP-PCR	
Digestión del gen codificante de la enzima Aac(6')-Ib-cr.....	38
Digestión del gen codificante de la proteína QepA.....	38
Visualización de los productos de PCR.....	39
Secuenciación y análisis bioinformático.....	39
Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS.....	40
Datos epidemiológicos de los aislamientos bacterianos y ensayos microbiológicos.....	41
Detección genotípica de marcadores de resistencia.....	48
Identificación de genes que codifican para resistencia a $\beta$ -lactámicos	52
Detección e identificación de genes PMQR.....	60
DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSIONES.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	80
ANEXOS.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

Figura	Tabla	Gráfico	Título	Pág.
1			Transformación, transducción y conjugación.	9
2			Estructura química de los antibióticos $\beta$ -lactámicos.	10
	1		Esquema de clasificación de $\beta$ -lactamasas actualizado.	13
3			Estructura química de quinolonas.	18
4			Distribución de enzimas de tipo CTX-M en Perú y Bolivia.	25
5			Mapa de Bolivia.	25
	2		Oligonucleótidos y condiciones utilizados para la amplificación de los distintos genes que determinan codificantes de $\beta$ -lactamasas	32
	3		Oligonucleótidos y condiciones utilizados para la amplificación de los distintos genes determinan resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos	34
	4		Mezclas de reacción utilizadas para amplificación de genes codificantes de $\beta$ -lactamasas y PMQR	35
	5		Oligonucleótidos y condiciones utilizados para la amplificación de elementos genéticos palindrómicos	35
	6		Oligonucleótidos y condiciones utilizados para la amplificación de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	36
	7		Mezcla y reacción para grupos filogenéticos y REP	37
	8		Digestión de <i>aac(6)-Ib-cr</i> y <i>qepA</i> por PCR-RFLP.	38
6			Detección fenotípica de BLEE	41
	9		Distribución de las 101 enterobacterias productoras de BLEE según centro de salud	42
	10		Distribución de los 101 pacientes según sexo	43
		1	Distribución de las 101 enterobacterias productoras de BLEE según el tipo de muestra clínica.	43
	11		Frecuencia de aislamientos de bacterias productoras de BLEE según especie.	44

		2	Distribución de las 101 enterobacterias productoras de BLEE según procedencia del paciente	44
		3	Sensibilidad a antibióticos de la población	45
		4	Distribución de CIMs de las cefalosporinas en la población estudiada	46
		5	Distribución de CIMs de ác. nalidíxico en la población estudiada	46
		6	Distribución de CIMs de ciprofloxacina en la población estudiada.	47
7			Amplificación de <i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-1</sub>	48
	12		Secuencia nucleotídica del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	49
8			Amplificación del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-2</sub>	49
9			Amplificación de <i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-9</sub>	50
	13		Secuencia nucleotídica del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	50
		7	Distribución de grupos de CTX-M	51
	14		Distribución de enzimas de tipo CTX-M en las diferentes especies estudiadas.	52
		8	Patrón de sensibilidad a ceftazidima en las distintas enterobacterias estudiadas productoras de enzimas de tipo CTX-M	52
10			Amplificación de genes que codifican para <i>bla</i> <sub>oxa-1</sub> por PCR	54
	15		Secuencia nucleotídica de <i>bla</i> <sub>oxa-1</sub>	54
		9	Distribución de las <i>bla</i> <sub>oxa-1</sub> en las enterobacterias portadoras de <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .	55
	16		Resistencia a cefoxitina en las enterobacterias productoras de CTX-M	56
11			Amplificación de genes que codifican para grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> por PCR multiplex.	57
		10	Distribución de los 87 <i>E. coli</i> incluidas en el estudio según el grupo filogenético detectado	57

		11	Distribución de los diferentes grupos filogenéticos dentro de cada grupo de CTX-M en las 87 <i>E. coli</i>	58
12			Amplificación de genes de <i>qepA</i> en enterobacterias productoras de BLEE	60
13			Digestión de los amplicones de <i>qepA</i> con la enzima <i>NcoI</i>	60
	17		Secuencia nucleotídica de los genes <i>qepA1</i>	61
14			REP-PCR de las 6 <i>E. coli</i> portadoras de genes <i>qepA</i>	61
15			Amplificación por PCR de genes <i>oqxA</i> y <i>oqxB</i> en enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación	62
	18		Secuencia nucleotídica del gen <i>oqxA</i>	63
	19		Secuencia nucleotídica del gen <i>oqxB</i>	63
16			Amplificación por PCR de genes de <i>aac(6')-Ib-cr</i> en enterobacterias productoras de BLEE.	64
17			Digestión con la enzima <i>BseGI</i> de los amplicones de <i>aac(6')-Ib</i>	65
	20		Secuencias nucleotídicas de los genes <i>aac(6')-Ib</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i>	65
18			Amplificación de genes <i>qnrB</i> en enterobacterias productoras de BLEE por PCR.	66
	21		Secuencia nucleotídica de gen <i>qnrB1</i>	67
	22		Secuencia nucleotídica del gen <i>qnrB19</i>	67
19			Porcentaje de resistencia en <i>E. coli</i> provenientes de infecciones comunitarias (Whonet, 2009)	71
20			Porcentaje de resistencia en <i>E. coli</i> provenientes de infecciones hospitalarias (Whonet, 2009)	72
21			Porcentaje de resistencia en <i>K. pneumoniae</i> provenientes de infecciones hospitalarias (Whonet, 2009)	72

## DEDICATORIA

---

A Dios por la fortaleza que me brinda cada día para salir adelante, a pesar de las dificultades sé que Él siempre está guiando mis pasos.

A mis Padres Juan, Elizabeth, por apoyarme a pesar de la distancia en cada momento, por confiar en mí siempre y darme su amor incondicional.

A mi hermana Gabriela porque me enseñó a luchar en la vida, me demostró que los hermanos son lo más preciado que uno tendrá por el resto de su vida.

A Remmy por su ayuda, consejos, comprensión y por haber estado siempre presente.

A todas las amistades que construí a lo largo de mi paso por esta hermosa ciudad.

A mis amigos, que por más lejos que yo haya estado, siempre me demostraron que estaban cerca de mí.

## RECONOCIMIENTO

---

A la Universidad De Buenos Aires, por haber organizado y llevado a cabo, la Maestría en Biología Molecular Médica, que servirá al profesional a superarse, actualizarse y mejorar el servicio a la comunidad.

Al **Dr. GABRIEL GUTKIND** por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su prestigioso laboratorio, siempre me brindó su ayuda incondicional, estoy y estaré eternamente agradecida.

A mi distinguida DIRECTORA, **Dra. MARCELA RADICE** por su dedicación, amabilidad, su enseñanza, su paciencia para llegar a la conclusión del presente trabajo y más que eso, por su gran amistad.

A mi CO-DIRECTOR, **Dr. JOSÉ DI CONZA**, por su tiempo, sus consejos, aliento y orientación a lo largo de mi paso por el laboratorio. Fue un privilegio contar con su guía y ayuda.

A los chicos del CEPARIO por su colaboración. Los llevaré siempre en mi corazón.

A las bacteriólogas de todos los laboratorios que colaboraron con la recolección de muestras, por su buena voluntad ya que sin ellas no hubiera podido realizar el presente trabajo.

Y a todos aquellos que hicieron que esta experiencia sea inolvidable.



## RESUMEN

---

El presente estudio consistió en la detección y caracterización de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y a quinolonas de codificación plasmídica en un total de 101 enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación aisladas de muestras clínicas en centros de salud de la ciudad de Cochabamba-Bolivia, en el periodo de Diciembre 2012 a Marzo 2013.

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido detectadas fueron en su totalidad de tipo CTX-M, de las cuales 89 correspondieron a CTX-M-grupo-1, 10 a CTX-M-grupo-9, 1 a CTX-M-grupo-2 y 1 aislamiento mostró la presencia simultánea de CTX-M-grupo-1 y CTX-M-grupo-9. Además, un 71% de los aislamientos mostró la presencia de *bla*<sub>oxa-1</sub>.

Resultó frecuente la presencia simultánea de mecanismos que confieren resistencia a ambas familias de antibióticos siendo el 93% de las enterobacterias estudiadas resistentes a quinolonas. Se realizó la identificación de genes de resistencia plasmídica a quinolonas (PMQR). La variante enzimática *aac(6')-Ib-cr* fue detectada en un 83% de los aislamientos siendo el mecanismo PMQR más prevalente. También se encontraron 6 aislamientos portadores de genes *qnr* que correspondieron a los alelos *qnrB1* (5) y *qnrB19* (1). El gen que codifica para la bomba de eflujo *qepA1* fue identificado en 6 *E. coli*. Los genes que codifican OqxAB, otra bomba de eflujo, se detectó en un aislamiento de *E. coli*.

Este trabajo constituye el primer reporte de marcadores de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas en la ciudad de Cochabamba-Bolivia. Este estudio representa el primer reporte de *qepA1*, *qnrB1*, *qnrB19* y *aac(6')-Ib-cr* en esta

ciudad de Bolivia, mientras que la detección de oqxAB corresponde al primer reporte en dicho país y a uno de los primeros reportes en Latinoamérica .

*Palabras claves:* *Enterobacteriaceae* BLEE CTX-M PMQR

## ABSTRACT

---

A surveillance study was conducted to characterize the mechanism involved in the resistance to the most clinically used antibiotic families,  $\beta$ -lactams and quinolones, in Cochabamba-Bolivia.  $\beta$ -lactamase coding genes and also plasmid mediated quinolone resistance markers (PMQR) were investigated in a total of 101 third generation cephalosporin resistant enterobacteria recovered from different health centers, during December 2012 to March 2013.

Detected  $\beta$ -lactamases absolutely belonged to CTX-M type enzymes, corresponding to CTX-M-group-1 (89), CTX-M-group-9 (10) and CTX-M-group-2 (1). One isolate displayed both CTX-M-group-1 and CTX-M-group-9 enzymes.

The presence of *bla*<sub>oxa-1</sub> was detected in 71% of the isolates.

Resistance to both families of antibiotics was frequently observed, being 93% of the included isolated resistant to quinolones.

Coding gene for *Aac*(6')-Ib-cr was the most frequent PMQR identified in this study (83%). Six isolates harbored *qnr*, corresponding to *qnrB1* (5) and *qnrB19* (1), and another 6 harbored the coding gene for the QepA1 efflux pump. *OqxAB* coding genes were only identified in one *E. coli* isolate.

This constitutes the first study of  $\beta$ -lactam and quinolone resistance markers performed in Cochabamba-Bolivia. Also, it constitutes the first report of *qepA1*, *qnrB1*, *qnrB19* and *aac*(6')-Ib-cr in this city of Bolivia, and the first description of *oqxAB* in the whole country an even one of the first reports in Latin America.

<i>Key words: Enterobacteriaceae</i>	ESBL	CTX-M	PMQR
--------------------------------------	------	-------	------

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

---

### Enterobacterias

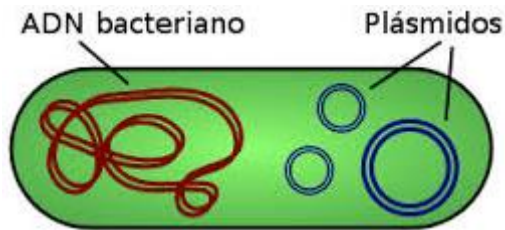
Las bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos gram negativos que se encuentran distribuidos en el suelo, agua, vegetación y forman parte de la microbiota habitual del intestino del hombre y de otros animales de sangre caliente. Algunas especies son patógenos primarios y otras son patógenos oportunistas. Pueden ser causantes de infecciones intestinales como la gastroenteritis y también extraintestinales como infecciones urinarias, septicemia y neumonía. A su vez, varias especies de esta familia suelen estar implicadas en infecciones de origen nosocomial.

Son anaerobios facultativos que fermentan la glucosa, son oxidasa negativos, catalasa positivos y reducen nitratos a nitritos, a menudo producen gas, tienen un contenido de G+C de 39 a 59% y crecen en medios de cultivo usuales como medio Nutritivo, Levine, McConkey, CLED (agar cistina-lactosa deficiente en electrolitos), entre otros. Poseen una estructura antigénica compleja y algunas especies producen diversas toxinas y factores de virulencia<sup>1,2</sup>.

El cromosoma de una bacteria típica consta de una sola molécula circular bicatenaria de ácido desoxirribonucleico (ADN) que contiene aproximadamente 5.000.000 pares de bases, de una longitud aproximada de 1,3 mm. La alteración de algunos genes tendrá un efecto más evidente, debido a la presencia de un único cromosoma<sup>3</sup>.

Además de dicho material genético, las bacterias pueden contener fragmentos de ADN extracromosómicos denominados **plásmidos**.

Los plásmidos son pequeños elementos genéticos cuya replicación es independiente del cromosoma bacteriano, son moléculas circulares bicatenarias de ADN con un número variable de pares de bases. Algunos pueden integrarse al cromosoma y se los denomina episomas.

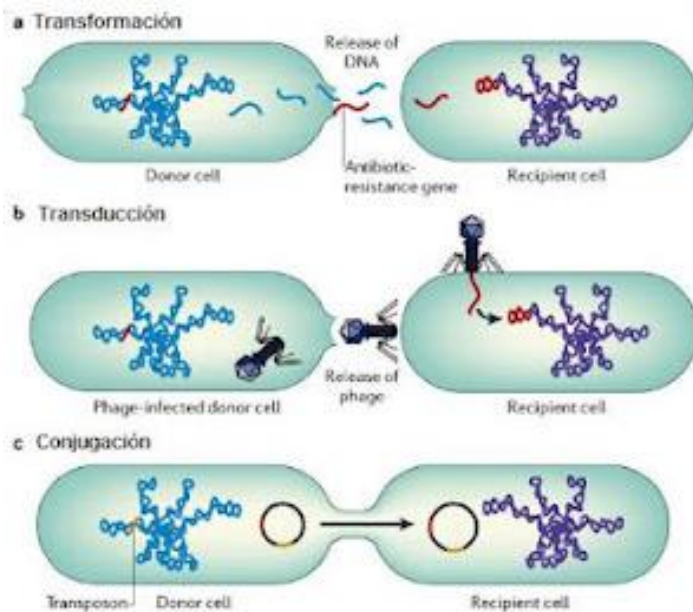


Los plásmidos portan información que puede proporcionar una ventaja selectiva a las bacterias, como conferir un alto nivel de resistencia a antibióticos, codificar para la producción de bacteriocinas, toxinas, determinantes de virulencia y contener otros genes que otorguen una ventaja respecto a la metabolización de ciertos sustratos. Algunos plásmidos pueden ser transferidos de una célula a otra por conjugación o también por otros mecanismos como transformación y transducción (ver figura #1)<sup>3</sup>.

A su vez, muchos de los determinantes de resistencia están localizados en plataformas genéticas como integrones que reclutan y promueven su expresión o en transposones, algunos de ellos conjugativos, que favorecen su diseminación entre distintas estructuras genómicas, así también, entre bacterias de la misma o distinta especie<sup>4</sup>.

## Figura #1

### Transformación, transducción y conjugación



Fuente: Orrosquieta Vázquez G., 2012

### Los Antibióticos $\beta$ -lactámicos (Figura #2)

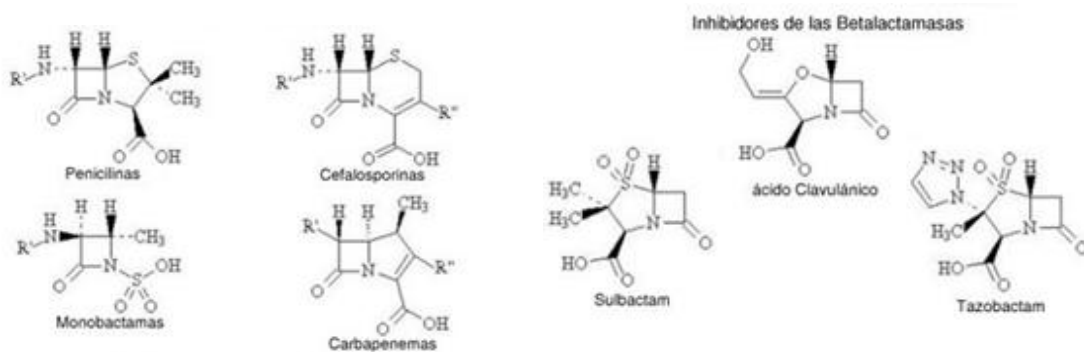
En septiembre de 1928 Alexander Fleming descubrió el primer antibiótico  $\beta$ -lactámico, la penicilina, al observar que el desarrollo de colonias de *Staphylococcus aureus* se inhibía por la presencia del hongo *Penicillium notatum* (contaminante del cultivo)<sup>5</sup>.

Esta familia de drogas se caracteriza por contener un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura molecular. Forman parte de este grupo las penicilinas (núcleo constituido por el ácido 6-amino penicilánico) que difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo que modifican la actividad antibacteriana. Esta familia también incluye a las cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación (núcleo constituido por el ácido 7-aminocefalosporánico), que derivan de la fermentación del *Cephalosporium*

*acremonium*, los monobactames (derivados del ácido 3-aminomonobactámico), los carbapenems (derivados semisintéticos, producidos por *Streptomyces* spp.) y los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico que es producido por *Streptomyces clavuligerus*, el sulbactam y tazobactam que son sulfonas sintéticas derivadas del ácido penicilánico<sup>6</sup>.

## Figura #2

### Estructura química de los antibióticos $\beta$ -lactámicos



Fuente: Cruz E, Modelación molecular de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, *Revista Científica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos*. v.8 n.1, 2010.

### Mecanismo de acción

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos inhiben la síntesis de peptidoglucano (constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico - pentapeptido), constituyente principal de la pared celular bacteriana. La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de tetrapéptidos a partir de pentapéptidos y el entrecruzamiento de estos péptidos para formar la malla compacta de peptidoglucano. Estos procesos finales son llevados a cabo por enzimas localizadas en la membrana citoplasmática (carboxipeptidasas y transpeptidasas), las cuales pertenecen al grupo de las proteínas fijadoras de



penicilinas (PBP). Dada la similitud estructural del anillo  $\beta$ -lactámico con la región terminal del pentapéptido, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se unen covalentemente con dichas PBPs e inhiben la formación de puentes peptídicos lo que debilita la pared celular, resultando más sensible a cambios en la presión osmótica, a la vez que se desregula el sistema autolítico que lleva a la lisis bacteriana<sup>7,8</sup>.

### **Mecanismos de resistencia bacteriana**

La resistencia a antibióticos es un fenómeno creciente, generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos, haciendo que los tratamientos convencionales se vuelvan ineficaces y que las infecciones persistan, incrementando el peligro de propagación. Existe el riesgo de que las enfermedades infecciosas se vuelvan intratables e incontrolables, amenazando con retornar a la era anterior a los antibióticos. Las bacterias que son resistentes a antibióticos de primera línea, tienen que ser tratados con antibióticos de última línea, lo que eleva los costos de la atención sanitaria, la carga económica de las familias y sociedades.

Los factores que aceleran la aparición y propagación de la resistencia incluyen: sistemas deficientes de vigilancia y seguimiento de la resistencia, sistemas inadecuados de calidad, suministro y uso inapropiado de medicamentos y también el uso de antibióticos en actividad pecuaria, entre otras<sup>9</sup>.

Según algunas investigaciones, se pudo observar que la resistencia a antibióticos es de mayor magnitud en países de Latinoamérica, ya que existe expendio de medicamentos sin recetas y sin control<sup>10</sup>.

Los mecanismos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos incluyen:

- 1) Modificaciones en el sitio activo de las PBPs que disminuyen la afinidad por los  $\beta$ -lactámicos.
- 2) Disminución de la expresión de proteínas de membrana externa (OMPs).
- 3) Adquisición o modificación de la expresión de bombas de eflujo.
- 4) Producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas, que tienen la capacidad de degradar diferentes compuestos  $\beta$ -lactámicos a través de la ruptura hidrolítica del anillo  $\beta$ -lactámico.

Este último constituye el mecanismo más importante de resistencia a éstos antibióticos en enterobacterias y otros bacilos gram negativos<sup>11</sup>.

## **$\beta$ -lactamasas**

### **Clasificación de $\beta$ -lactamasas**

La gran diversidad de estas enzimas ha llevado a que las  $\beta$ -lactamasas se clasifiquen según Ambler en clases moleculares: A, B, C y D de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, donde las de clase A, C y D contienen un centro activo de serina y las de clase B uno que depende del Zinc.

En 1989, 1995 y 2010 Bush, Jacoby y Medeiros clasificaron a las  $\beta$ -lactamasas en 4 grupos de acuerdo a diferentes criterios como: el perfil de sustrato, su inhibición por ácido clavulánico o EDTA, el peso molecular de la enzima, el punto isoeléctrico, entre otros<sup>12</sup>. Recientemente, esta clasificación ha sido revisada y adaptada para poder incluir enzimas con parámetros o estructuras ambiguas (ver tabla #1).

**Tabla #1**

**Esquema de clasificación de  $\beta$ -lactamasas actualizado**

Molecular class	Functional group	Penicillinase activity <sup>a</sup>	Cephalosporinase activity <sup>b</sup>	ESBL activity <sup>c</sup>	Carbapenemase activity	Monobactamase activity	Clavulanic acid sensitive <sup>d</sup>	Representative enzymes
A	2a	Y	N	N	N	N	Y	PC1
	2b	Y	Y	N	N	N	Y	TEM-1, SHV-1
	2be	Y	Y	Y	N	Y	Y	CTX-M-14, -15
	2br	Y	Y	N	N	N	N	TEM-30, SHV-10
	2ber	Y	Y	Y	N	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>TEM-50</u> , TEM-121
	2c	Y	N	N	N	N	Y	PSE-4, CARB-3
	2ce	Y	N	<u>N<sup>e</sup></u>	N	N	Y	RTG-4
	2e	Y	Y	Y	N	V	Y	SFO-1, FEC-1, L2
2f	Y	Y <sup>f</sup>	Y	Y	Y	Y	KPC-2, SME-1 <sup>f</sup>	
B	3a <sup>g</sup>	Y	Y	Y	Y	N	N	IMP, VIM, NDM, L1
	3b	<u>Y</u>	N	N	Y	N	N	CphA
C	1	N	Y	N	N	N	N	AmpC, ACT-1
	1e	N	Y	Y	N	N	N	GCI, CMY-37
D	2d	Y	N	N	N	N	V	OXA-1, OXA-10
	2de	Y	Y	<u>V</u>	N	N	V	OXA-11, OXA-15
	2df	Y	N	Y	<u>N<sup>h</sup></u>	N	<u>N</u>	OXA-23, OXA-48

Activity data that are inconsistent with the published distinctive substrate profiles are shown in bold and underlined

<sup>a</sup> Y =  $k_{cat} > 5 \text{ s}^{-1}$ ; N =  $k_{cat} < 5 \text{ s}^{-1}$ ; V = variable within the functional group

<sup>b</sup> Hydrolysis of cephaloridine or cephalothin

<sup>c</sup> Based on hydrolysis of cefotaxime, ceftazidime, or cefepime

<sup>d</sup> Y =  $IC_{50} < 2 \text{ }\mu\text{M}$ ; N  $\geq 2 \text{ }\mu\text{M}$ ; V = variable among the functional group

<sup>e</sup> In spite of  $k_{cat}$  values generally  $\leq 1 \text{ s}^{-1}$ , resistance to cefepime and ceftipime is seen in producing organisms

<sup>f</sup> SME enzymes compared to KPC carbapenemases have lower hydrolysis rates and lower catalytic efficiencies for expanded-spectrum cephalosporins, resulting in clinical susceptibility to those cephalosporins in SME-producing *S. marcescens*

<sup>g</sup> Includes subclasses B1 and B3

<sup>h</sup> In spite of  $k_{cat}$  values generally  $\leq 1 \text{ s}^{-1}$ , these enzymes confer resistance to carbapenem

Fuente: Bush K, The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature, *J Infect Chemother.* 2013. 19:549–559

**$\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)**

El gran uso de las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), así también las cefalosporinas de primera generación como cefalexina para el tratamiento de las infecciones producidas por enterobacterias, contribuyó a la selección de microorganismos resistentes. Este hecho motivó la incorporación de las cefalosporinas de tercera generación o de espectro extendido como cefotaxima y ceftazidima, que con el paso del tiempo, contribuyeron a la emergencia de las BLEE. Estas enzimas se han descrito no solo en enterobacterias sino también

en *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio cholerae*, entre otros.

Dentro de las BLEE de clase molecular A, las enzimas de tipo TEM, SHV y CTX-M han sido las más ampliamente reportadas. Otras BLEE clínicamente importantes son VEB, BEL, BES-1, SFO-1, TLA-144, PER y GES<sup>13</sup>.

En general, estas enzimas son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, además de monobactames, pero no cefamicinas o carbapenems. Son inhibidas por los inhibidores clínicos de  $\beta$ -lactamasas clase A como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam<sup>14</sup>.

## **$\beta$ -Lactamasas de clase A de AMBLER**

### **$\beta$ -lactamasas tipo TEM**

La familia de las enzimas de tipo TEM cuenta actualmente con 221 miembros. TEM-1 es la enzima más prevalente en el mundo y constituye el ancestro de esta numerosa familia. Es una  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado (BLEA) capaz de hidrolizar ampicilina y cefalosporinas de primera generación pero no cefalosporinas de espectro extendido. TEM-3 fue la primera  $\beta$ -lactamasa reportada en 1988 que mostró fenotipo BLEE. Las BLEE de tipo TEM no sólo se encontraron en la familia *Enterobacteriaceae* sino también en bacilos gram negativos no fermentadores<sup>15</sup>.

### **$\beta$ -lactamasas tipo SHV**

El gen codificante de SHV-1 fue identificado inicialmente en el cromosoma de *K. pneumoniae*<sup>16</sup>, por tanto, este es considerado como el ancestro de la familia SHV. Dicho gen fue posteriormente reportado en plásmidos en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y también en bacterias gram negativas no

fermentadoras. La primera de estas enzimas con fenotipo BLEE fue SHV-2, se encontró en una cepa de *Klebsiella ozaenae*, aislada en 1983 en Alemania<sup>14</sup>.

Existen hasta el momento ([www.lahey.org](http://www.lahey.org)) 189 variantes de SHV, la mayoría con fenotipo BLEE, muchas de las cuales presentan la sustitución en Gly238Ser que tiene un importante rol en la hidrólisis de ceftazidima y cefotaxima<sup>13</sup>.

### $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M

Las enzimas de tipo CTX-M constituyen en la actualidad las BLEE prevalentes en el mundo. Su nombre proviene de “Cefotaximasa Munich” y han recibido esta denominación debido a la hidrólisis preferencial de cefotaxima respecto a ceftazidima, dos cefalosporinas de tercera generación (oxiiminocefalosporinas). Exhiben mayor sensibilidad a tazobactam que a ácido clavulánico, están asociadas a un aumento de CIM (concentración mínima inhibitoria) para aztreonam y cefepime<sup>14</sup>.

CTX-M-1 fue descrita en 1989 en un aislamiento de *E. coli* en Alemania<sup>17</sup> y posteriormente en Sudamérica se encontró CTX-M-2 en *Salmonella* Typhimurium en pacientes hospitalizados que sufrían de meningitis, septicemia o enteritis<sup>18</sup>. A partir de entonces han sido descritas más de 150 nuevas variantes ([www.lahey.org](http://www.lahey.org)).

El genoma de *Kluyvera* spp. se ha postulado como el origen de estas enzimas, mediado por la movilización genética a través de secuencias de inserción como *ISEcp1* o *ISCR1* y la incorporación en integrones y/o transposones<sup>17</sup>.

Los miembros de la familia CTX-M se distribuyen en 5 subgrupos genéticamente distintos: CTX-M grupo 1; CTX-M grupo 2; CTX-M grupo 8;

CTX-M grupo 9 y CTX-M grupo 25, cada uno de ellos incluyen distintas variantes.

La enzima **CTX-M-15**, del grupo CTX-M-1 es la más ampliamente diseminada en el mundo y fue identificada por primera vez en New Delhi (India) en 1999, en aislamientos entéricos<sup>19</sup>.

**CTX-M-2** fue descrita en 1992 en aislamientos de *Salmonella* Typhimurium recuperados en Argentina y desde entonces su presencia ha sido demostrada en diferentes enterobacterias, también en bacilos gram negativos no fermentadores.<sup>17</sup> Esta enzima fue considerada como una de las BLEEs más prevalentes en Sudamérica, aunque en los últimos años su amplia prevalencia ha sido desplazada por CTX-M-15<sup>17</sup>.

#### **$\beta$ -lactamasas tipo PER**

Esta familia comprende 6 miembros, siendo PER-2 la enzima más prevalente. Esta fue reportada en *Salmonella* Typhimurium en 1996. Hay evidencia de su presencia en un aislamiento de *P. mirabilis* recuperado en Argentina en 1989. Las enzimas tipo PER presentan mayor afinidad por ceftazidima que por cefotaxima<sup>13</sup>.

#### **$\beta$ -lactamasas tipo GES**

Esta familia comprende 25 miembros (www.lahey.org). GES-1 fue reportada en *K. pneumoniae* en Francia el 2000. Estas enzimas tienen la habilidad de hidrolizar oxiiiminocefalosporinas, pero no aztreonam. Algunas de ellas también son capaces de hidrolizar carbapenemes (sustitución Asn o Ser en el residuo de Gly170), como GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-14, entre otras<sup>13</sup>.

## **$\beta$ -lactamasas de clase D AMBLER (o grupo funcional 2d)**

### **$\beta$ -lactamasas tipo OXA**

Estas enzimas fueron descritas inicialmente en los años 70s. Se agrupan en subfamilias caracterizadas por diferentes actividades que incluyen oxacilinasas, BLEA, BLEE y carbapenemasas. En conjunto son débilmente inhibidas por ácido clavulánico. Entre las enzimas de tipo OXA de espectro ampliado se encuentran OXA-1 y OXA-2, las cuales presentan solo un 30% de identidad entre ellas dando origen a dos subgrupos distintos. Las enzimas de tipo OXA de espectro extendido derivan de OXA-10 u OXA-7 y la mayoría confieren resistencia a ceftazidima y podemos citar a: OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35, y -45.<sup>13</sup>

## **$\beta$ -lactamasas de clase C de AMBLER (o grupo funcional 1)**

### **$\beta$ -lactamasas de tipo AmpC**

Las enzimas de tipo AmpC pueden estar codificadas en cromosomas o plásmidos. La expresión de los genes cromosómicos suele ser inducibles en muchas enterobacterias pero no en *E. coli*. La expresión de los genes *ampC* de localización plasmídica es en su mayoría constitutiva y en altos niveles dando lugar a microorganismos resistentes a penicilinas, oximiinocefalosporinas y aztreonam<sup>20, 21</sup>.

En 1976, Bauernfeind describió una *K. pneumoniae* en Korea del Sur, que podía conferir resistencia a cefoxitina, cefotetan, penicilinas, cefalosporinas y monobactames en *E. coli* y la llamó CMY-1 por su actividad hidrolítica frente a cefamicina. Esta fue la primera enzima AmpC de codificación plasmídica descrita.

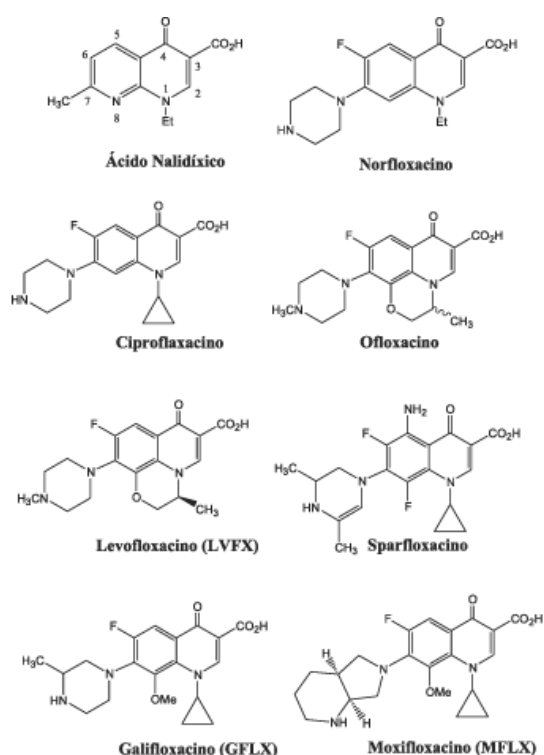
## Antibióticos quinolónicos

Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura común formada por dos anillos, uno de ellos tiene un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. A su vez las fluoroquinolonas tienen una sustitución de un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo de piperazina en la posición 7, que aumenta la potencia y el espectro frente a bacterias gram negativas. (Ver figura #3).

En 1962, se introdujo el ácido nalidíxico a la práctica clínica y en 1980 la primera fluoroquinolona llamada ciprofloxacina<sup>22</sup>.

### Figura #3

#### Estructura química de quinolonas



Fuente: De Souza V, promising drugs against tuberculosis: past, present and future. *Quím. Nova* vol.28 no.4 São Paulo. 2005



## Clasificación y espectro de acción de las quinolonas

**Primera Generación**, no fluoradas, activas frente a enterobacterias causantes de infecciones urinarias.

- Ácido nalidíxico
- Ácido pipemídico
- Ácido oxolínico

**Segunda Generación**, fluoradas, activas frente a microorganismos aerobios gram negativos, *Pseudomonas aeruginosa* y también *Mycoplasmas* pp., *Chlamydia* spp. y *Legionella* spp.

- Norfloxacin
- Ciprofloxacina
- Enoxacina
- Ofloxacina
- Nadifloxacina

**Tercera Generación**, fluoradas, activas frente a microorganismos aerobios gram negativos, cocos gram positivos, *P. aeruginosa*, gérmenes atípicos y *Streptococcus* spp.

- Levofloxacina
- Lomefloxacina

**Cuarta Generación**, fluoradas, activas frente a aerobios gram negativos, cocos gram positivos y anaerobios.

- Gatifloxacina
- Moxifloxacina<sup>23</sup>

## Mecanismo de acción

Las quinolonas ingresan a las bacterias gram negativas a través de las porinas de la membrana externa por difusión pasiva. Actúan sobre los ácidos nucleicos, inhiben la síntesis de ADN bloqueando las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV).

En bacterias gram negativas actúan principalmente uniéndose a complejos que se forman entre el ADN y la enzima ADN girasa<sup>24</sup>. La ADN girasa es un tetrámero de dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente, encargada del superenrollamiento negativo del ADN. La enzima rompe ambas hebras de ADN a expensas de hidrólisis de ATP. Cuando una molécula de quinolona se une al complejo, produce un cambio conformacional que previene la re-ligación de las hebras de ADN inhibiendo la replicación y crecimiento bacteriano.

En bacterias gram positivas, el principal sitio blanco es la topoisomerasa IV, la cual está compuesta por dos subunidades ParC y dos subunidades ParE codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente<sup>25</sup>.

## Resistencia bacteriana a quinolonas

La resistencia a quinolonas puede deberse a varias causas, como ser: adquisición de mutaciones puntuales en los genes que codifican las topoisomerasas II, pérdida o expresión alterada de porinas y sobreexpresión de bombas de eflujo activas, dadas por mutaciones en los genes regulatorios<sup>26</sup>.

Las mutaciones en los genes codificantes de topoisomerasas tipo II se localizan en regiones denominadas QRDR (Quinolone Resistance Determining Region). En el gen *gyrA* suelen ocurrir entre las posiciones 51 y 106. En la mayoría de las enterobacterias los cambios más frecuentes ocurren en las

posiciones 83 y 87 de *gyrA* (Ser83Leu, Asp87Asn) y en las posiciones equivalentes de *parC*<sup>25, 27</sup>.

### Resistencia plasmídica a quinolonas

Más recientemente se han descrito marcadores de resistencia a quinolonas de localización plasmídica denominados en conjunto **PMQR** (del inglés Plasmid Mediated Quinolone Resistance). En este grupo se encuentran las proteínas Qnr (A, B, C, D y S), la variante enzimática de la aminoglucósidoacetiltransferasa Aac(6')-Ib-cr y las bombas de eflujo QepA y OqxAB<sup>26</sup>.

Por sí mismos estos mecanismos no son suficientes para conferir altos niveles de resistencia a quinolonas, pero pueden complementar los niveles resistencia conferidos por las mutaciones en las topoisomerasas. También, la presencia de dichos marcadores plasmídicos podría facilitar la selección de mutantes cromosómicas a concentraciones de quinolonas que en otros microorganismos resultarían letales.

Existen conceptos como “concentración de prevención de mutantes” (MPC) y “ventana de selección de mutantes” que derivan de estudios *in vitro* de selección de mutantes resistentes a una quinolona determinada, al tratar un patógeno con concentraciones crecientes de dicha molécula. Si durante el tratamiento clínico con un compuesto de esta familia no se alcanza en el sitio de infección una dosis elevada y constante en el tiempo, se incrementa el riesgo de selección de mutantes resistentes<sup>28</sup>.

### Proteínas Qnr

Estas proteínas pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos y protegen a la enzima ADN girasa y topoisomerasa IV de la inhibición mediada por las

quinolonas. Se unen a las topoisomerasas alterando la conformación del bolsillo de unión a la droga, es decir, las quinolonas reconocen la enzima blanco de manera menos eficiente. Confieren bajo nivel de resistencia, incrementando las CIM de ácido nalidíxico 2 a 8 veces y de ciprofloxacina 8 a 32 veces.

QnrA1 fue descrita en 1998 por Martínez-Martínez et al., en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* recuperado de una muestra de orina. Posteriormente, en China se identificó en *Klebsiella oxytoca*. QnrA2, que difiere en 4 aminoácidos, además de otras variantes como QnrA3, QnrA4 y QnrA5<sup>29</sup>. QnrS fue reportada en octubre de 2003, en una cepa de *Shigella flexneri* que causó un brote de enterocolitis en Japón. Las proteínas QnrB son la más prevalentes en aislamientos clínicos. QnrB1 se identificó inicialmente en *K. pneumoniae* en India y tiene 39,5% de sus aminoácidos en común con QnrA<sup>30</sup>. QnrC se identificó por primera vez en Shanghai, China, en el año 2006 en *Proteus mirabilis*<sup>31</sup>, mientras que QnrD, fue descrita en el año 2009 en China, en *Salmonella* y presenta entre un 36-60% de diferencia con las otras proteínas Qnr<sup>32</sup>. La mayoría de los *qnr* se encontraron en especies de los géneros de *Proteus* o *Providencia*, por lo que se cree que se han originado en la tribu *Proteae*<sup>33</sup>.

### **Enzima Aac(6')-Ib-cr (aminoglucósidoacetiltransferasa)**

La presencia de la enzima Aac(6')-Ib confiere resistencia a antibióticos aminoglucosídicos como tobramicina, amicacina y kanamicina. Sin embargo, en 2006 se describió una variante de dicha enzima, denominada Aac(6')-Ib-cr. Esta variante posee dos cambios de aminoácidos en Trp102Arg y Asp179Tyr y es capaz de conferir resistencia a fluoroquinolonas como ciprofloxacina y

norfloxacin, a través de la N-acetilación del anillo piperacilínico no sustituido presente únicamente en dichos compuestos. Esta variante conserva su capacidad de modificar aminoglucósidos a la vez que incrementa moderadamente la CIM de ciprofloxacina y norfloxacin de 3 a 4 veces<sup>29</sup>.

### **Bomba de eflujo QepA**

En 2002 se descubrió en gen codificante de la bomba de eflujo *qepA* (*qepA1*) localizado en un plásmido (pHPA) en *E. coli* recuperada de una muestra de orina, en Japón. Este plásmido conlleva múltiples marcadores de resistencia a antibióticos, como aminoglucósidos, fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactámicos. QepA2 difiere de QepA1 en dos sustituciones de aminoácidos<sup>30</sup>. Los genes *qepA* codifican para una proteína de 511 aminoácidos con 14 segmentos transmembrana, cuya presencia disminuye la concentración intracelular de fluoroquinolonas hidrofílicas (ác. nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacin) en 2-, 32-, y 64-veces, respectivamente<sup>26</sup>.

### **Bomba de eflujo OqxAB**

Es codificada por los genes *oqxA* y *oqxB*, los cuales se encuentran en el mismo operón. El gen *oqxA* codifica para una proteína putativa de 291 aminoácidos y *oqxB* codifica para una proteína putativa de 1050 aminoácidos. Ambos genes fueron encontrados en un plásmido conjugativo (pOLA52), presente en *E. coli* aisladas de cerdos. Esta bomba confiere resistencia a olaquinox (OQX), antibiótico que se usa en agricultura como promotor de crecimiento animal. A su vez, los genes *oqxA* y *oqxB* se encuentran en el cromosoma de *K. pneumoniae* con diferentes grados de expresión correlacionando con las diferencias de sensibilidad a olaquinox y a otras fluoroquinolonas.<sup>26</sup>

## ANTECEDENTES

---

El Departamento de Cochabamba se encuentra en el corazón de Bolivia, es esencialmente montañoso, pues está atravesado por el ramal oriental de la Cordillera de Los Andes y tiene una extensión de 55.631 kilómetros cuadrados. Posee un clima seco y templado. Las temperaturas no sobrepasan los 30°C en verano y presenta una amplia diversidad de producción agropecuaria. El Departamento de Cochabamba está dividido en 16 provincias y 201 cantones, siendo su capital la provincia Cercado.

La ciudad de Cercado está ubicada a los 17° 23' de latitud sur y 66° 09' de longitud oeste del meridiano de Greenwich y se encuentra a 2571 m.s.n.m. Según el censo del Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.gob.bo/>), del 2012, el Departamento de Cochabamba tiene una población de 1.758.143 habitantes, donde Cercado concentra a 630.587 habitantes.

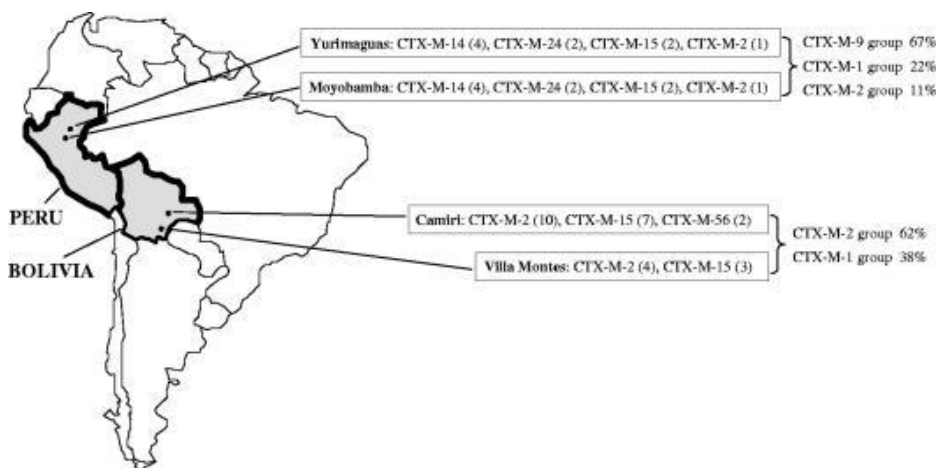
En el departamento de Cochabamba, al igual que en el resto del país, los antibióticos son ampliamente utilizados y la mayoría de las farmacias expenden cualquier antibiótico sin receta contribuyendo a los altos niveles de resistencia a los antimicrobianos, entre ellos los  $\beta$ -lactámicos y las quinolonas, constituyendo un problema de salud importante.

Existen pocos artículos que analicen los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas en Bolivia. En el año 2007, Pallechi et al.; demostraron la existencia de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> grupo 2 en mayor proporción y en menor proporción *bla*<sub>CTX-M</sub> grupo 1 (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>), en aislamientos recuperados de heces de niños sanos con bajos recursos, en poblaciones de baja actividad antropogénica, en los departamentos de Santa Cruz de la Sierra y Tarija (ver

figura #4). En el mismo estudio también demostraron la presencia del gen codificante de la variante de la enzima Aac(6')-Ib-cr<sup>34</sup>.

#### Figura #4

#### Distribución de enzimas de tipo CTX-M en Perú y Bolivia



Fuente: Pallecchi, 2007.

En otro artículo presentado por el mismo grupo de trabajo en 2009, demostraron la presencia de genes PMQR: *qnrB* (B2, B10, B19) y *QnrS* (S1)<sup>35</sup>.

El último artículo publicado sobre resistencia a fluoroquinolonas fue realizado por Bartoloni et al. en abril del 2013<sup>36</sup>, también del Chaco boliviano en aislamientos provenientes de materia fecal de personas sanas, donde, detectaron genes *bla*<sub>CTX-M</sub>

grupo 1, grupo 2, grupo 9, grupo 8, grupo 2, también de manera conjunta genes *bla*<sub>CTX-M</sub> grupo 1 y grupo 9; los genes PMQR: *qepA*, *qnrB* y *aac(6')-Ib-cr*.

A diferencia de los estudios previos que se realizaron en individuos sanos y en áreas urbanas pequeñas del chaco boliviano (Ver figura #5); en el presente trabajo se analizaron aislamientos de enterobacterias provenientes de pacientes con infecciones hospitalarias o ambulatorias de la Ciudad de

Figura# 5  
Mapa de Bolivia



Ciudades marcadas indican donde se realizaron los estudios

Cercado, en la cual no se han realizado previamente estudios en este sentido, a pesar de ser la tercera ciudad más importante de Bolivia.

### **Formulación del problema**

El uso indiscriminado o el mal uso de antibióticos, en especial de  $\beta$ -lactámicos y quinolonas, contribuye a la selección de microorganismos resistentes, disminuyendo el éxito de los tratamientos empíricos y en consecuencia, mayor morbilidad.

Es fundamental conocer los niveles de resistencia a dichos antibióticos en la población estudiada para así estar alerta sobre cambios en el patrón de sensibilidad. Así como realizar estudios sobre los determinantes de resistencia para conocer la epidemiología regional de dichos mecanismos en enterobacterias causantes de infecciones no solo hospitalarias sino también ambulatorias.

Dada la escases de información al respecto, resulta necesario llevar a cabo estudios que permitan detectar y determinar la frecuencia de marcadores de resistencia a antibióticos en aislamientos bacterianos recuperados de la población de la ciudad de Cercado-Cochabamba. Estos estudios permitirán conocer la situación epidemiológica actual y contribuir a establecer tratamientos empíricos adecuados y protocolos de uso prudente de antibióticos que conlleven a controlar la selección de resistencias.

El presente trabajo tiene por finalidad la búsqueda de genes de resistencia, en general de localización plasmídica, en aislamientos de enterobacterias provenientes de pacientes con infecciones hospitalarias o ambulatorias de la Ciudad de Cercado-Cochabamba.



## OBJETIVOS

---

### Objetivo General

Caracterizar los determinantes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas mediados por plásmidos, en enterobacterias que presentan resistencia a cefotaxima y/o ceftazidima, recuperadas durante el periodo diciembre 2012 a marzo 2013 en centros de salud de la ciudad de Cochabamba-Bolivia.

### Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y caracterizar los genes codificantes de las mismas.
- Evaluar la capacidad de los actuales puntos de corte de resistencia para cefalosporinas de espectro extendido en la detección de aislamientos portadores de BLEE.
- Identificar la presencia de genes que codifican para resistencia a quinolonas de codificación plasmídica.
- Evaluar la posible asociación entre los marcadores de resistencia mencionados.
- Tipificar los aislamientos portadores de determinados marcadores de resistencia.
- Comparar resultados obtenidos en este estudio respecto a otras investigaciones realizadas en otros países de Latinoamérica.

# MATERIALES Y MÉTODOS

### **Aislamientos bacterianos**

Se incluyeron en el estudio aislamientos de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación recuperados de pacientes con infecciones, en cinco centros de salud: Laboratorio Clínico “Central”, Caja Nacional de Salud (Hospital Obrero #2), Hospital Privado “Boliviano-Belga”, Hospital Pediátrico “Albina R. de Patiño” y el Hospital Materno Infantil “Germán Urquidi” de la Ciudad de Cercado (Cochabamba-Bolivia), entre diciembre del 2012 y marzo del 2013. Los aislamientos fueron conservados en caldo BHI con glicerol al 10% y se procedió a la autorización del ingreso de estos aislamientos a Argentina, mediante el SENASA (Ver anexo #1).

### **Criterios de inclusión**

Se incluyeron en este estudio todas las enterobacterias resistentes a cefotaxima y/o ceftazidima aisladas en los 5 centros de salud participantes, en el período mencionado, independientemente del tipo de paciente (ambulatorio o internado) y tipo muestra (orina, sangre, secreción, etc.). Solo se estudió un aislamiento por paciente.

### **Enfoque y tipo de investigación**

El diseño de la investigación es prospectivo, observacional de tipo descriptivo y transversal, el enfoque de la investigación sigue una aproximación cuantitativa.

### **Identificación de enterobacterias**

Las muestras fueron sembradas en placas de agar EMB (Eosina azul de metileno), incubadas a 37°C por 24 horas y se realizó la identificación

bacteriana por pruebas bioquímicas, entre ellas: Agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Movilidad Indol Ornitina (MIO), Citrato, Urea, Agar Hierro Lisina (LIA) y prueba de la oxidasa.

### **Ensayos microbiológicos**

Se determinó la sensibilidad a antimicrobianos, por ensayos de difusión con discos (antibiograma) y de dilución en agar (determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) en medio sólido). Se investigó fenotípicamente la presencia de BLEE por ensayos de difusión con discos. Todos estos ensayos se realizaron según los lineamientos del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)<sup>37</sup> y para la interpretación de los resultados se contemplaron las recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos SADEBAC, AAM<sup>38</sup>.

Se emplearon los siguientes discos comerciales (Britania, Argentina): cefotaxima (CTX, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), cefotaxima/ ácido clavulánico (CTX, 30 µg/CLA, 10 µg), ceftazidima/ ác. clavulánico (CAZ, 30 µg/CLA, 10 µg), cefepime (FEP, 30 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), ampicilina (AMK, 30 µg), kanamicina (K, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), levofloxacina (LVX, 5 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg) y ácido nalidíxico (NAL, 30 µg).

Para la determinación de la CIM se utilizaron los β-lactámicos (Lab. Klonal, Argentina): CTX, CAZ, FEP y las quinolonas (Lab. Phada-Farma, Argentina): NAL, CIP.

## Ensayos moleculares

### Obtención de ADN total

Se realizó la extracción de ADN total por ruptura térmica. Para ello, en un tubo eppendorf conteniendo 200 µl de agua desionizada, se resuspendieron colonias bacterianas y posteriormente se llevaron a ebullición durante 10 minutos. Luego de centrifugar se conservó el sobrenadante, donde se encuentra el ADN bacteriano.

### Extracción de ADN plasmídico

Se realizó la extracción de plásmidos mediante la técnica de lisis alcalina<sup>39</sup>, que utiliza SDS para desnaturalizar proteínas, NaOH para desnaturalizar ADN cromosomal y plasmídico, acetato de potasio o amonio 2M que favorece la renaturalización del ADN plasmídico y por último etanol al 95% para la precipitación y recuperación de éste.

### Detección de genes codificantes de β-lactamasas y de resistencia a quinolonas de localización plasmídica

Se investigó la presencia de genes codificantes de distintos tipos de BLEE *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-grupo-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-grupo-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-grupo-25</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>PER-2</sub>, *bla*<sub>pAMPc</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>.

Por otro lado, se investigó la presencia de genes PMQR: *qepA*, *oqxAB*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnr* (A,B,C,D,S)

La detección de los genes se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos y controles positivos para cada reacción, previamente caracterizados en el laboratorio. Se realizó PCR multiplex para *bla*<sub>pAMPc</sub><sup>21</sup> y para los demás genes, PCR simples, las

respectivas condiciones de reacción y la secuencia de oligonucleótidos empleados se muestran en las tablas #2 y #3.

**Tabla #2: Oligonucleótidos y condiciones utilizados para la amplificación de los distintos genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas.**

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de los oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño esperado (pb)	Condiciones del ciclo	T °C	T
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHVF	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT	625	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
	SHVR	AGCAGGGCGACAATCCCGCG		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-1</sub>	CTX-M-1F	ATGGTTAAAAAATCACTGC	900	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
	CTX-M-1R	GGTGACGATTTTAGCCGC		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-2</sub>	CTX-M-2F	TTAATGATGACTCAGAGCATT	902	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
	CTX-M-2R	GATACCTCGCTCCATTATTGC		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-8</sub>	CTX-M-8F	TGAATACTTCAGCCACACG	923	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
	CTX-M-8R	TAGAATTAATAACCGTCGGT		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-9</sub>	CTX-M-9F	AACACGGATTGACCGTCTTG	876	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
	CTX-M-9R	TTACAGCCCTTCGGCGAT		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-grupo-25</sub>	CTX-M-25F	GGATGATGAGAAAAAGCGTAAGGC	880	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
	CTX-M-25R	GGACTAATAACCGTCGGTGAC		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	OXA-1F	CCATTATTTGAAGGAACTGA	720	Desnaturalización	94	5 min
				Desnaturalización	94	1 min
				Hibridación	45	1 min
	OXA-1R	TAGTGTGTTTAGAATGGTGA		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	OXA-2F	CCTGCATCGACATTCAAGATA	468	Desnaturalización	94	5 min
				Desnaturalización	94	1 min
				Hibridación	55	1 min
	OXA-2R	CTCAACCCATCCTACCCACCA		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>OXA-10</sub>	OXA-10F	GCCATGAAAACATTTGCCGC	801	Desnaturalización	94	5 min
				Desnaturalización	94	1 min
				Hibridación	59	1 min
	OXA-10R	GCCACCAATGATGCCCTCAC		Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min

<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48F	ATGCGTGTATTAGCCTTATCG	610	Desnaturalización	95	5 min
	OXA-48R	TATAGTCACCATTGGCTTCG		Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
				Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>PER-2</sub>	PER-2F	TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG	880	Desnaturalización	95	5 min
	PER-2R	CAGCTCAAAGTATAAGCCGCTTG		Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
				Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPCF	ATGCTACTGTATCGCCGTCT	893	Desnaturalización	95	5 min
	KPCR	TTTTAGAGCCTTACTGCC		Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
				Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GESF	TCACTCTGCATATGCGTCGG	819	Desnaturalización	95	5 min
	GESR	TCCGTGCTCAGGATGAGTTG		Desnaturalización	95	1 min
				Hibridación	55	1 min
				Polimerización	72	1 min
				Extensión final	72	10 min
<i>bla</i> <sub>pAmpC</sub> Multiplex	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	Desnaturalización	94	3 min
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC				
	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	Desnaturalización	94	30 seg
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC				
	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	Hibridación	64	30 seg
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC				
	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG	302	Polimerización	72	1 min
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT				
	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	Extensión final	72	7 min
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG				
	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346			
	ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC				

**Tabla #3 Oligonucleótidos y condiciones utilizados para la amplificación de los distintos genes que determinan resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos.**

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido( 5'-3')	Tamaño esperado (pb)	Condiciones del ciclo	T °C	T Min.
<i>qepA</i>	qepAF	ACATCTACGGCTTCTTCGTGCG	502	Desnaturalización	97	10 min
				Desnaturalización	96	1 min
	Hibridación	63		45 seg		
	Polimerización	72		45 seg		
qepAR	AACTGCTTGAGCCCGTAGATC	Extensión final	72	10 min		
<i>oqxA</i>	oqxAF	CTCGGCGCGATGATGCT	393	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	45 seg
	Hibridación	58		45 seg		
	Polimerización	72		45 seg		
oqxAR	CCACTCTTCACGGGAGACGA	Extensión final	72	10 min		
<i>oqxB</i>	oqxBF	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC	513	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	45 seg
	Hibridación	63		45 seg		
	Polimerización	72		45 seg		
oqxBR	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	Extensión final	72	10 min		
<i>aac(6)-lb-cr</i>	AacF	CGATCTCATATCGTCGAGTG	477	Desnaturalización	94	10 min
				Desnaturalización	94	45 seg
	Hibridación	61		45 seg		
	Polimerización	72		45 seg		
AacR	TTAGGCATCACTGCGTGTTTC	Extensión final	72	45 seg		
<i>qnrA</i>	qnrAF	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	Desnaturalización	95	10 min
				Desnaturalización	95	1 min
	Hibridación	54		1 min		
	Polimerización	72		1 min		
qnrAR	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	Extensión final	72	10 min		
<i>qnrB</i>	qnrBF	GGMATHGAAATTCGCCACTG	876	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	1 min
	Hibridación	55		1 min		
	Polimerización	72		1 min		
qnrBR	TTTGCYGYCCGAGTCGAA	Extensión final	72	10 min		
<i>qnrC</i>	qnrCF	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	308	Desnaturalización	94	5 min
				Desnaturalización	94	45 seg
	Hibridación	50		45 seg		
	Polimerización	72		45 seg		
qnrCR	CACCTACCCATTTATTTCA	Extensión final	72	10 min		
<i>qnrD</i>	qnrDF	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	Desnaturalización	95	5 min
				Desnaturalización	95	45 seg
	Hibridación	52		45 seg		
	Polimerización	72		45 seg		
qnrDR	AACAAGCTGAAGCGCCTG	Extensión final	72	10 min		
<i>qnrS</i>	qnrSF	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	Desnaturalización	94	5 min
				Desnaturalización	94	1 min
	Hibridación	55		1 min		
	Polimerización	72		1 min		
qnrSR	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	Extensión final	72	10 min		



En la **Tabla #4** se muestran las mezclas de reacción utilizadas para amplificación de genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas y genes PMQR.

**Tabla #4**

Mezcla de reacción	Volumen $\mu$ l
DNA	1
Buffer taq 10x	2-2,5
Cl <sub>2</sub> Mg(25 mM)	2-3
PF (10uM)	2,5
PR (10uM)	2,5
dNTPs(10uM)	1-1,25
H <sub>2</sub> O miliQ estéril	c.s.p 25
Taq DNA pol (5U/ul)	0,2

### Ensayos de tipificación bacteriana

La tipificación de los microorganismos se realizó por la técnica de REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic elements-PCR) que utiliza cebadores que hibridan en los elementos genéticos palindrómicos repetidos que se encuentran distribuidos a lo largo del cromosoma bacteriano<sup>40</sup>.

También se identificó el grupo filogenético de los aislamientos de *E. coli*<sup>41</sup> por PCR multiplex. Para ambas determinaciones se utilizaron los cebadores y condiciones que se muestran en las tablas #5 y #6, respectivamente.

**Tabla #5 Oligonucleótidos y condiciones utilizados para la amplificación de elementos genéticos palindrómicos (REP)**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido(5'-3')	Condiciones del ciclado	T °C	T
REP	REP1	Desnaturalización	94	2 min
		Desnaturalización	94	30 seg
	REP2	Hibridación	50	1 min
	ACGTCTTATCAGGCCTAC	Polimerización	72	4 min
		Extensión final	72	7 min

**Tabla #6 Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación de los grupos filogenéticos de *E. coli***

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Tamaño Esperado (pb)	Condiciones del Ciclado	T °C	t
ChuAF	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	Desnaturalización	95	5 min
ChuAR	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		Desnaturalización	95	45 seg
YJAF	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	Hibridación	58	45 seg
YJAR	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		Polimerización	72	45 seg
TSPEF	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	Extensión final	72	10 min
TSPER	CGCGCCAACAAAGTATTACG				

*ChuA*: gen requerido para el transporte de Hemo en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, *yjaA*: es un gen recientemente identificado en el genoma completo de *E. coli* K-12, su función es desconocida, TSPE4.C2: un fragmento de DNA anónimo de una librería sustractiva<sup>41</sup>

**Los resultados se interpretan la siguiente manera:**

**Grupo A** → Sin banda o *yjaA* positivo

**Grupo B1** → TSPE positivo

**Grupo D** → *ChuA* positivo o *ChuA*+TSPE positivo

**Grupo B2** → *ChuA* + *yjaA* positivo o *ChuA* + *yjaA* +TSPE positivo

Los aislamientos del grupo A y B1, son considerados comensales; los del grupo B2 son virulentas extraintestinales y los del grupo D son virulentos menos extendidos, que promueven funciones patógenas como adherencia, evasión de defensa, adquisición de hierro e invasión celular<sup>41</sup>.

En la **Tabla #7** se muestran las mezclas de reacción utilizadas para determinación de grupos filogenéticos y para la tipificación por REP-PCR

## Tabla #7

### Grupos filogenéticos

Mezcla de reacción	Volumen µl
DNA	3
Buffer taq KCL 10x	2,5
Cl <sub>2</sub> Mg(25 mM)	2
Primer ChuAF	1,13
Primer ChuAR	1,13
Primer YJAF	1,13
Primer YJAR	1,13
Primer TSPEF	1,13
Primer TSPER	1,13
dNTPs(10uM)	1
H <sub>2</sub> O miliQ estéril	c.s.p 25
Taq DNA pol (5U/ul)	0,25

### REP

Mezcla de reacción	Volumen µl
DNA	5
Buffer taq 10x	0.5
Cl <sub>2</sub> Mg(25 mM)	5
P1(10 pmol/ul)	3
P2 (10 pmol/ul)	3
dNTPs(10uM)	3
H <sub>2</sub> O miliQ estéril	c.s.p 25
Taq DNA pol (5U/ul)	0,2

En todas las reacciones se empleó la *Taq* del laboratorio Fermentas, con su respectivo buffer y los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen.

### Ensayo de digestión de fragmentos amplificados por PCR: RFLP-PCR

#### Digestión del gen codificante de la enzima Aac(6')-Ib

Se seleccionó a la enzima de restricción *BseGI* para realizar un ensayo de RFLP-PCR que permitiera diferenciar entre los genes codificantes de la enzima Aac(6')-Ib y de la variante Aac(6')-Ib-cr<sup>42</sup>. El amplicón obtenido para los genes

*aac(6')-lb* y *aac(6')-lb-cr* es de 477 pb. La enzima *BseGI* es capaz de cortar el amplicón obtenido para el gen *aac(6')-lb* pero no el de su variante, obteniéndose dos fragmentos: uno de 182 pb y otro de 295 pb.

### Digestión del gen codificante de la proteína QepA

Para confirmar la presencia del gen *qepA* se llevó a cabo una reacción de RFLP-PCR empleando la enzima *NcoI* la cual es capaz de digerir el amplicón de 502 pb obtenido para dicho gen, en tres fragmentos de 296, 165 y 41 pb.

En la [Tabla # 8](#) se muestran las mezclas de reacción y el tiempo de digestión.

### Tabla #8 Digestión del gen codificante de la enzima *Aac(6')-lb* con la enzima de restricción.

Mezcla de reacción	Volumen $\mu$ l
Buffer Tango	2
Agua estéril	18
<i>BseGI</i>	2
Producto de PCR	10

**Incubar 3 horas a 55°C**

### Digestión del gen codificante de la bomba de eflujo *qepA*

Mezcla de reacción	Volumen $\mu$ l
Buffer Tango 10X	2
Agua estéril	18
<i>NcoI</i>	2
Producto de PCR	10

**Incubar 3 horas a 37°C**

### Visualización de los productos de PCR

Para todas las reacciones de amplificación previamente mencionadas, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (0,8-2%) conteniendo una concentración de bromuro de etidio 0,5 mg/l. y utilizando marcadores de peso molecular comerciales. Las corridas electroforéticas se

realizaron a 90 V por 30 minutos en buffer TAE a excepción de la resolución de productos de amplificación de REP-PCR cuya corrida electroforética se realizó con buffer TBE por 3 horas y a 60V. La visualización de bandas se realizó con luz UV.

### **Secuenciación y análisis bioinformático**

Los amplicones obtenidos se purificaron empleando equipos comerciales y fueron enviados a MACROGEN (Korea) para su secuenciación. Posteriormente las secuencias fueron analizadas empleando herramientas bioinformáticas como NCBI-Blast, Clustal Vector, Bioedit, Chromas, Mega 5.2.2 y para el análisis de REP-PCR se utilizó el programa Treecon.

### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados mediante SPSS versión 22.

# RESULTADOS

## RESULTADOS

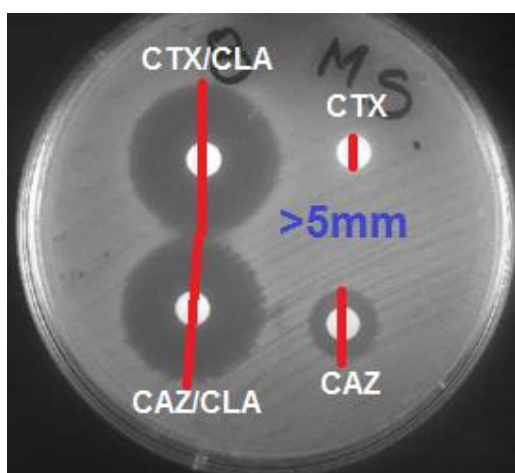
### Datos epidemiológicos de los aislamientos bacterianos y ensayos microbiológicos.

En el periodo estudiado se recolectaron un total de 101 enterobacterias productoras de BLEE, mediante el ensayo confirmatorio recomendado por CLSI (Figura #6), en los 5 centros de salud mencionados anteriormente, de la ciudad de Cercado-Cochabamba. Para las especies *C. freundii*, *E. cloacae* y *M. morganii* (productoras de enzimas de tipo AmpC inducible, no incluidos en los criterios de interpretación del CLSI) se realizó el mismo ensayo empleando discos de FEP y FEP/CLA. Esto se debe a que el CLA es buen inductor de las enzimas de tipo AmpC y éstas a su vez, son capaces de hidrolizar a las oximiinocefalosporinas pero no a FEP.

Los aislamientos correspondieron a *E. coli* (87), *K. pneumoniae* (11), *Citrobacter freundii* (1), *Morganella morganii* (1) y *Enterobacter cloacae* (1).

#### Figura #6

#### Detección fenotípica de BLEE



Cuando la diferencia de halos entre CAZ y CAZ/CLA, CTX y CTX/CLA es mayor o igual a 5 mm para al menos una de las cefalosporinas ensayadas, se considera que la bacteria es productora de una BLEE.

Para las especies *C. freundii*, *E. cloacae* y *M. morganii* (productoras de enzimas de tipo AmpC inducible, no incluidos en los criterios de interpretación del CLSI) se realizó el mismo ensayo empleando discos de FEP y FEP/CLA. Esto se debe a que el CLA es buen inductor de las enzimas de tipo AmpC y éstas a su vez, son capaces de hidrolizar a las oximiinocefalosporinas pero no a FEP.

En las siguientes [tablas \(#9 y #10\)](#) y [gráficos \(#1 y #2\)](#) se muestran algunos datos epidemiológicos de los aislamientos productores de BLEE.

### Tabla #9

#### Distribución de las 101 enterobacterias productoras de BLEE según centro de salud.

Centro de salud	Enterobacterias (n)
Laboratorio Clínico Central	29
Caja Nacional de Salud (Hospital Obrero #2)	30
Hospital Privado Boliviano-Belga	26
Hospital Pediátrico Albina R. de Patiño.	7
Hospital Materno Infantil Germán Urquidi.	9
<b>Total</b>	<b>101</b>



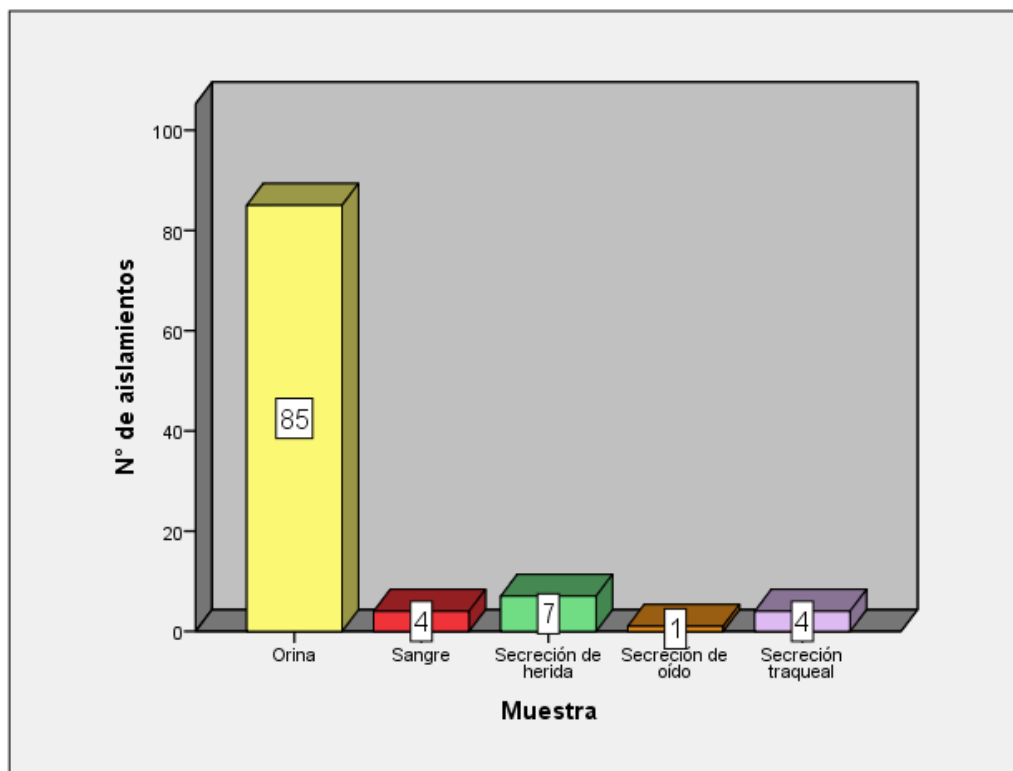
**Tabla #10**

**Distribución de los 101 pacientes según sexo.**

<b>SEXO</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Femenino</b>	72	71,28
<b>Masculino</b>	29	28.72
<b>Total</b>	101	100

**Gráfico #1**

**Distribución de las 101 enterobacterias productoras de BLEE según el tipo de muestra clínica.**



Los aislamientos de *E. coli* fueron recuperados en todas las muestras clínicas, mientras que los de *K. pneumoniae* fueron recuperados en muestras de orina, secreciones traqueales, de herida y sangre. *M. morgani* y *E. cloacae* se aislaron de muestras de orina, y *C. freundii* de una secreción de herida.

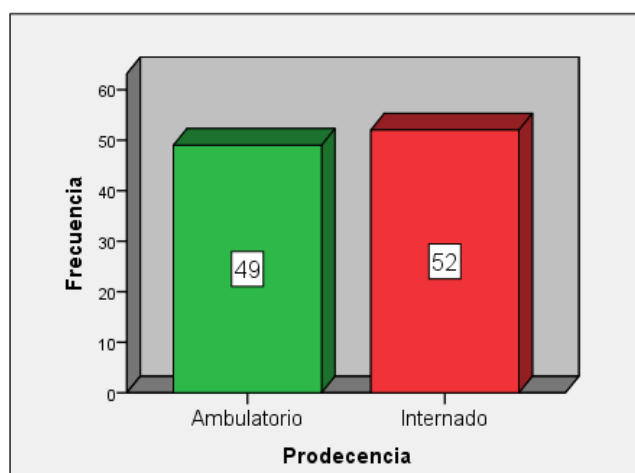
**Tabla #11**

**Frecuencia de aislamientos de bacterias productoras de BLEE según especie.**

<b>Especie</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<i>E. coli</i>	87	86,14
<i>K. pneumoniae</i>	11	10,89
<i>C. freundii</i>	1	0,99
<i>E. cloacae</i>	1	0,99
<i>M. morgani</i>	1	0,99
<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>100</b>

**Gráfico #2**

**Distribución de las 101 enterobacterias productoras de BLEE según procedencia del paciente.**

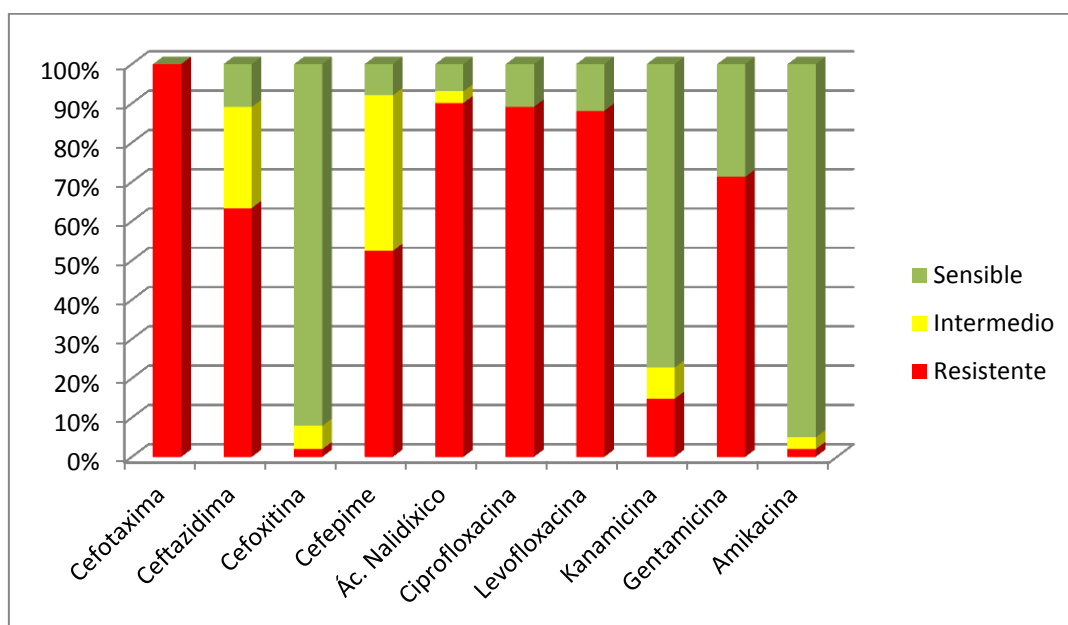


## Sensibilidad a antibióticos

En el gráfico #3 se observan los resultados de los ensayos de sensibilidad a antibióticos por difusión en medio sólido para las enterobacterias incluidas en el estudio.

### Gráfico #3

#### Sensibilidad a antibióticos de la población analizada.



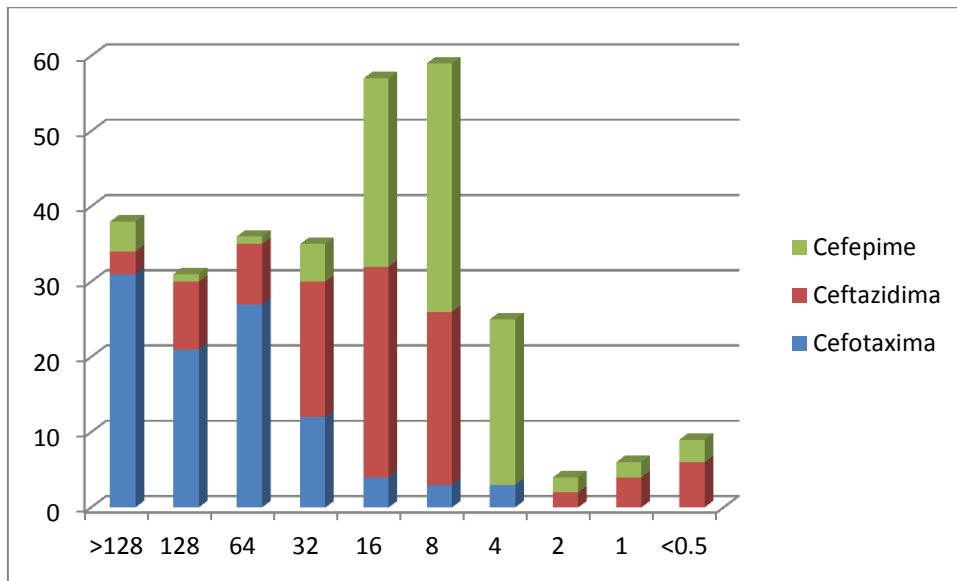
CLSI 2014

Todos los aislamientos fueron resistentes a CTX, mientras que el 10.8 % presentó sensibilidad a CAZ y más del 90% a FOX. Aproximadamente el 90 % de los aislamientos fueron resistentes a las quinolonas ensayadas. La mayoría de los aislamientos mostraron resistencia a GEN, sensibilidad a AMK y en menor medida a K.

En el gráfico #4 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de CIM por dilución en medio sólido.

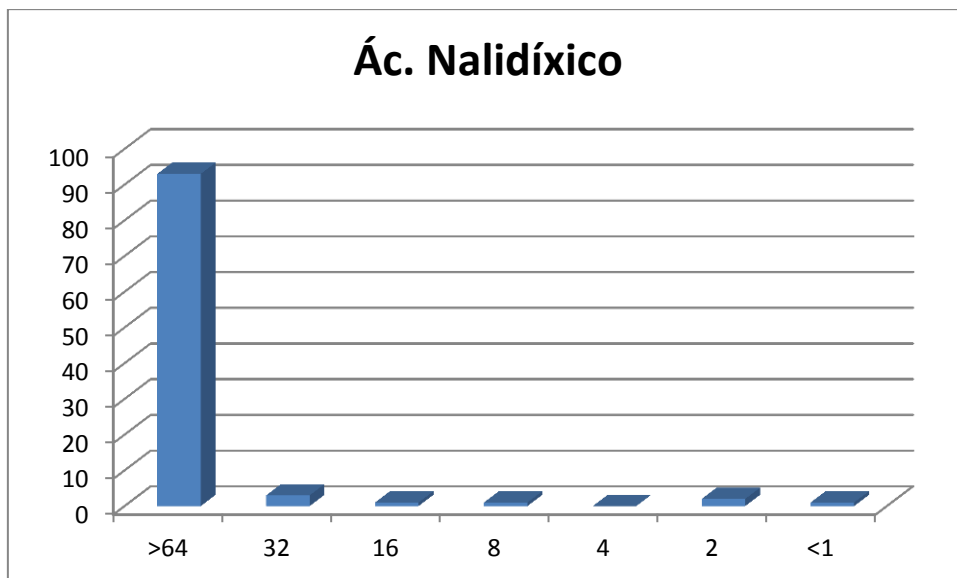
#### Gráfico #4

Distribución de CIMs de las cefalosporinas en la población estudiada.



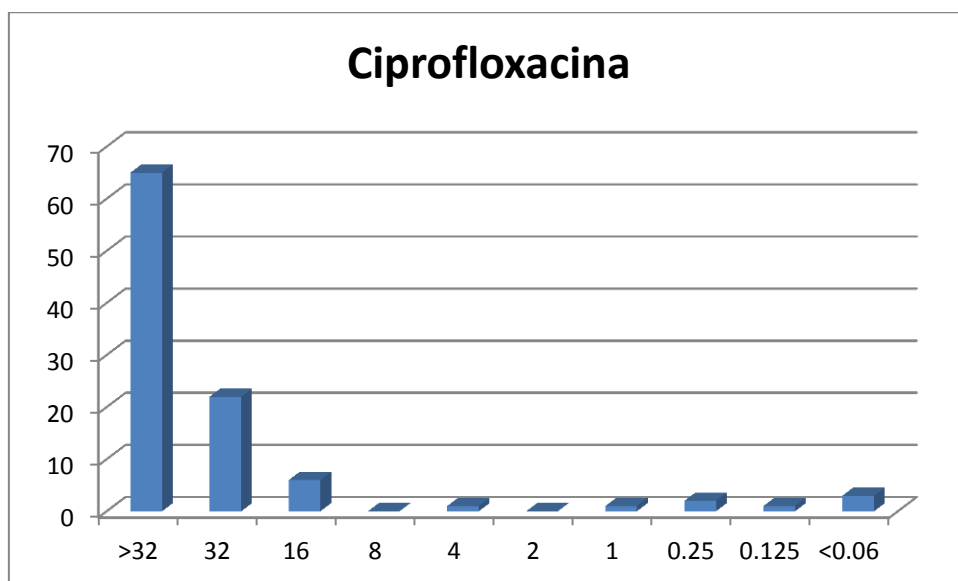
#### Gráfico #5

Distribución de CIMs de ácido nalidíxico en la población estudiada.



## Gráfico #6

### Distribución de CIMs de ciprofloxacina en la población estudiada.



CLSI 2014

Todos los aislamientos fueron resistentes a CTX (valores de CIM entre >128 – 4 µg/ml). El 62,7% de los aislamientos fueron resistentes a CAZ y el 11,9% resultaron sensibles. Estos resultados fueron concordantes con los ensayos por difusión para CAZ, excepto por un aislamiento que por difusión resultó intermedio mientras que por ensayo por dilución resultó sensible. El 35,6% y el 54,45% de los aislamientos fueron resistentes e intermedios para FEP, respectivamente, y solo unos pocos fueron sensibles (9,9%) a esta droga. Estos resultados mostraron variación entre los ensayos por difusión y dilución. Se observó un alto porcentaje de resistencia a NAL (95%) al igual que a CIP (94%), para la cual la mayoría de los aislamientos presentó CIMs de >32 µg/ml.

## Detección genotípica de marcadores de resistencia

A continuación se muestran los resultados de las reacciones de amplificación por PCR para genes codificantes de los distintos grupos de enzimas de tipo CTX-M (gráfico #7). Las figuras #7, #8 y #9 ejemplifican los resultados obtenidos en las distintas reacciones.

### Figura #7

#### Amplificación de *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>

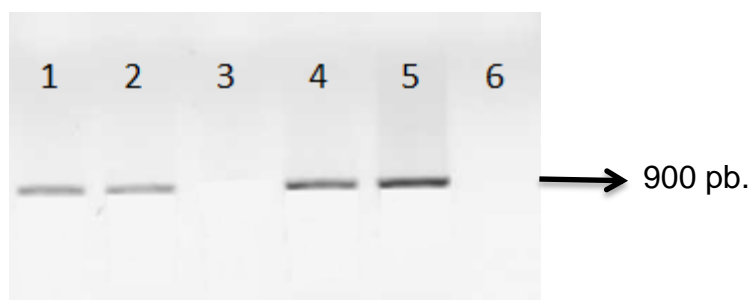


Figura #7: calle 1: aislamiento #2 (*E. coli*), calle 2: aislamiento #12 (*K. pneumoniae*), calle 3: aislamiento #18 (*E. coli*), calle 4: aislamiento #67 (*E. coli*), calle 5 y 6: controles positivo y negativo para *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>, respectivamente.

En 90 de los aislamientos ensayados se obtuvieron resultados positivos para *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>.

Se secuenciaron algunos de los productos amplificados, correspondiendo en todos los casos a *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, cuya secuencia nucleotídica se muestra a continuación (tabla #12).

## Tabla #12

### Secuencia nucleotídica del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>

```
..... 10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGTTAAAA AATCACTGCG CCAGTTCACG CTGATGGCEA CCGCAACCGT CACGCTTTG TTAGGAAGTG TCCCGCTETA TGCCCAACCG
..... 100     110     120     130     140     150     160     170     180
GCGGACGTAC AGCAAAAACCT TGCCGAAITA GAGCGGCAGT CCGGGGGCAG ACTEGGGTGTG GCATTGATTA ACACAGCAGA TATTTCGCAA
..... 190     200     210     220     230     240     250     260     270
ATACTTTATC ETGCTGATGA GCGCTTTCGG ATGTCCAGCA CCAGTAAAGT GATGGCCCGG GCCCGGCTEC TGAAGAAAAG TGAAGCGAA
..... 280     290     300     310     320     330     340     350     360
CCGAACTCCT TAAATCAGCG AGTTGAGATC AAAAAATCTG ACCTTGTTAA CTATAATCCG ATTCGCGAAA AGCACCTCAA TGGGACGATG
..... 370     380     390     400     410     420     430     440     450
TCACITGGCTG AGCTTAGCGC GGGCGCGCTA CAETACAGCG ATAACTGTCG GATGAAATAG CTGATTGCTC ACETITGGCG CCCGCGTACG
..... 460     470     480     490     500     510     520     530     540
GTACCCGCTT TCGCCCGACA GCTGGGAGAC GAAACCTTCC GTCTCGACCG TACCGAGCCG ACETITAAACA CCGCCATTCC GGGCGATCCG
..... 550     560     570     580     590     600     610     620     630
CCTGATACCA CTTCACCTCG GGCATAGGCG CAAACTCTCC GGAATCTGAC GCTGGGTAAA GCATTGGGCG ACAGCCAAAG GCGCGACGTC
..... 640     650     660     670     680     690     700     710     720
GTACATGGA TGAAGGGCAA TACCACCGGT GCAGCGAGCA TTCAGGCTGG ACTCCCTGCT TCCITGGGTTG TEGGGGATTA AACCGCGAGC
..... 730     740     750     760     770     780     790     800     810
GGTGGCTATG GCACCCACAA CGATATCGCG GTGATCTGCG CAAAAGTTCG TCGCCCGCTG ATTCTGGTCA CTTACTTAC CCAGCCCTAA
..... 820     830     840     850     860     870     880     890     900
CCTAAGGCGAG AAGCGCCCGG CGATGTATTA GCCTCAGCGG CTAAAATCCT CACCAAC
```

## Figura #8

### Amplificación de *bla*<sub>CTX-M-grupo-2</sub>

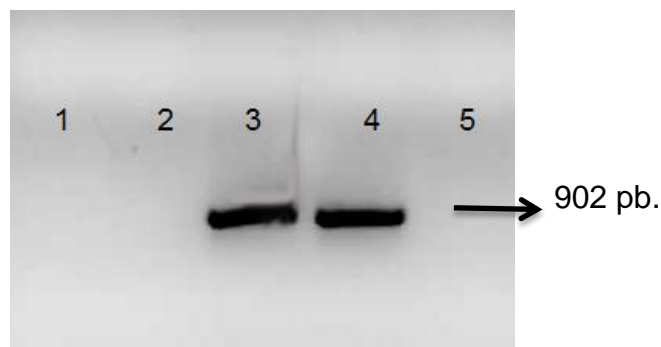


Figura #8: Calle 1: aislamiento #72 (*M. morgani*), calle 2: aislamiento #76 (*E. coli*), calle 3: aislamiento #94 (*C. freundii*), calle 4 y 5: control positivo y control negativo para *bla*<sub>CTX-M-grupo-2</sub>, respectivamente.

Sólo 1 aislamiento de *C. freundii* dio resultado positivo para genes *bla*<sub>CTX-M-grupo-</sub>

## Figura #9

### Amplificación de *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub>.

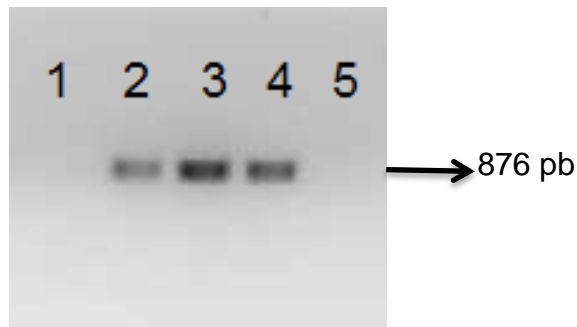


Figura #9: Calle 1: aislamiento 99 (*E. coli*), calle 2: aislamiento #6 (*E. coli*), calle 3: aislamiento #25 (*E. coli*), calle 4: control positivo, calle 5: control negativo para *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub>.

En 11 aislamientos se obtuvieron resultados positivos para *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub>. Se secuenciaron algunos de los productos amplificados, correspondiendo en todos los casos a *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, cuya secuencia nucleotídica se muestra a continuación (tabla #13)

En un aislamiento se detectó la presencia conjunta de *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>.

## Tabla #13

### Secuencia nucleotídica del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

```
..... 10      20      30      40      50      60      70      80      90
TGGGAGTTTG AGATGGTGGC AAGAGAGTGG CAAACGGATGA TGTTCGCGGC GCGCGCGTGC ATTCCGCTGC TCGTGGGCGG CCGCCCGCTT
..... 100     110     120     130     140     150     160     170     180
TATCGCGAGA CGAGTCCGCT GCAGCAAAAAG CTGGCGGCGC TGGAGAAAAG CAGCGGAGGG CCGCTGGGCG TCGCGCTCAT CGATACCGCA
..... 190     200     210     220     230     240     250     260     270
GATAATACGC AAGTGTCTTA TCGCGGTGAT GAACGCTTTC CAATGTCCAG TACCAGTAAA GTTATGGCGG CCGCGCGCGT GCTTAAAGCG
..... 280     290     300     310     320     330     340     350     360
AGTGAACCGC AAAAGCAGCT GCTTAAATCAG CCTGTCCGAA TCAAGCCTGC CGATCTGGTT AACTACATTC CGATTGCCGA AAAACACGTC
..... 370     380     390     400     410     420     430     440     450
AACGGCAAAA TGAACGTGGC AGAAGTGGC GCGGCGCGCT TCGAGTACAG CGAACAATCC GCCATGAAAC AATTGATTCG CAGCTCGGT
..... 460     470     480     490     500     510     520     530     540
GGCCCGGAG GCGTGAAGCC TTTTGCCCGC GCGATCGGCG ATGAGACGTT TCGTCTGGAT CCGACTGAA CTAAGCTGAA TACCGCCATT
```



```

550      560      570      580      590      600      610      620      630
CCCGCCGACC CGAAGACAC CACCAACCCG CEGGCGATGG CCGAGACGTT GCGTCAGCTT ACCTGGGGTC ATGCGCTGGG CGAAAACCAG

640      650      660      670      680      690      700      710      720
CGGGCCGAGT TGGTACGCTG GCTCAGAGGC AATACGACCG GCGCAGCCAG CATTCCGGCC GCGTTACCGA CGTCGTGGAC TGTGGGTGAT

730      740      750      760      770      780      790      800      810
AAGACCGECA GCGCGACTA CCGCACCACC AATGATATTG CCGTGTCTCG GCCCGAGGGT CGTGCGCCCC TGGTICTGCT GACCTATTTT

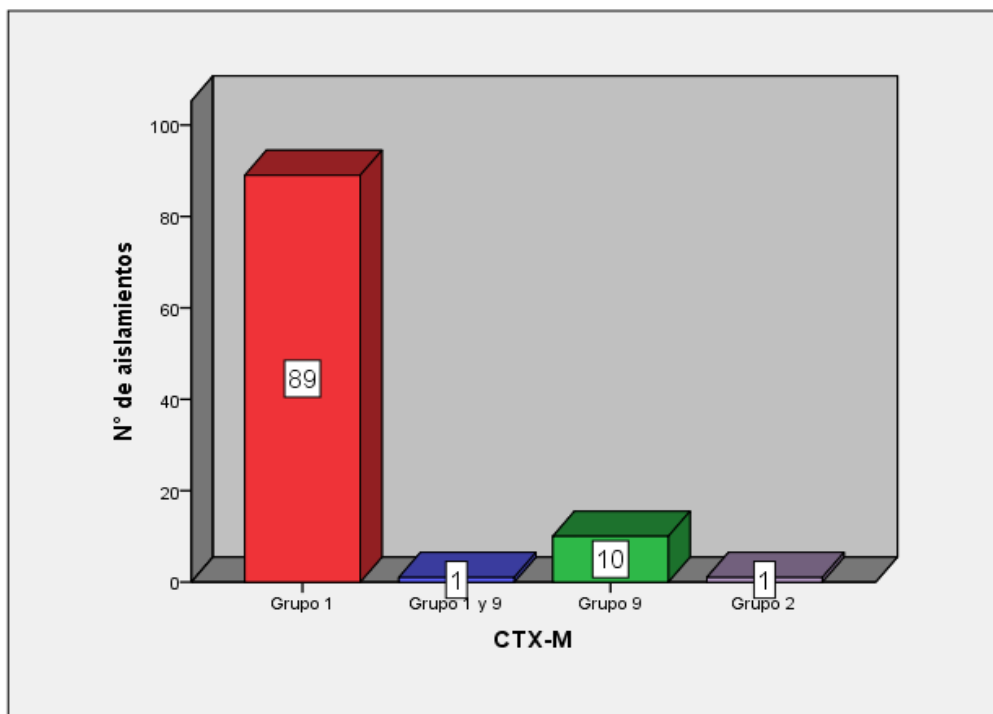
820      830      840      850      860      870      880      890      900
ACCCAGCCGC AACAGAACGC AAGAGGCCGC CCGCATGTGC TGGCTTCAGC GCGCAGATTC ATCCCGGAGG GCGTGTAA

```

No se obtuvieron resultados positivos para los grupos *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CTX-M-25</sub> en los aislamientos analizados.

### Gráfico #7

#### Distribución de grupos de *bla*<sub>CTX-M</sub>



A continuación se muestra la distribución de enzimas de tipo CTX-M en las enterobacterias estudiadas, respecto a las especies identificadas.

**Tabla #14**

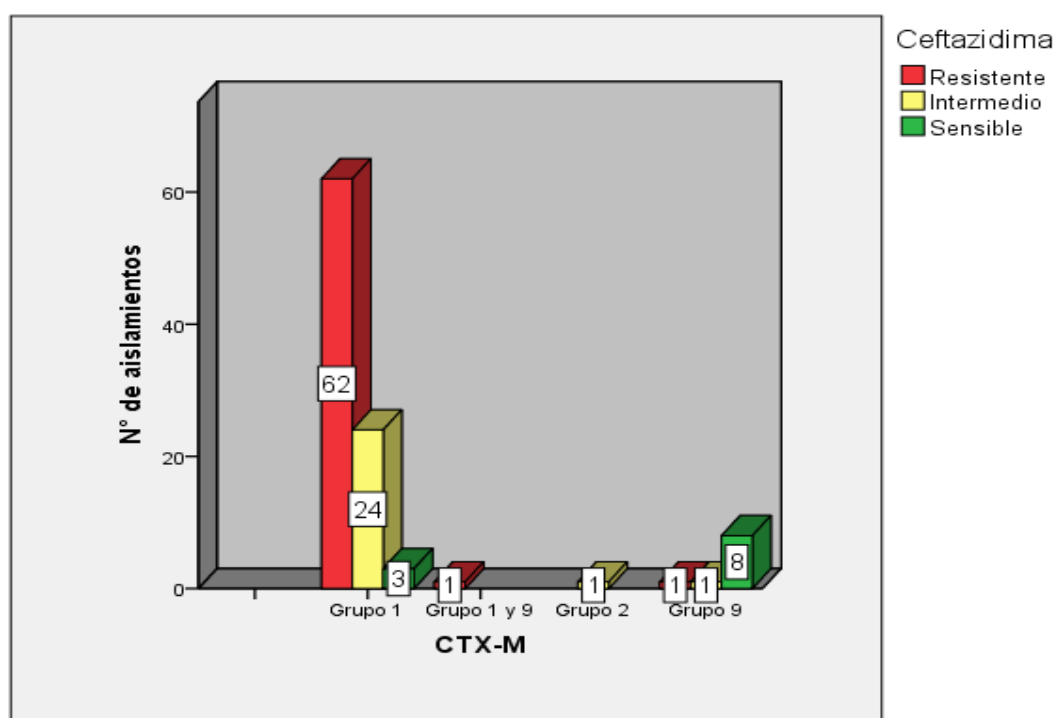
**Distribución de enzimas de tipo CTX-M en las diferentes especies estudiadas.**

CTX-M	Especie bacteriana					Total
	<i>C. freundii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>M. organii</i>	
Grupo 1	0	1	78	9	1	89
Grupo 1 y 9	0	0	0	1	0	1
Grupo 2	1	0	0	0	0	1
Grupo 9	0	0	9	1	0	10
Total	1	1	87	11	1	101

En el siguiente gráfico se muestran los patrones de sensibilidad a CAZ de los distintos aislamientos productores de enzimas de tipo CTX-M de diferentes grupos.

**Gráfico #8**

**Patrón de sensibilidad a ceftazidima en las distintas enterobacterias estudiadas productoras de enzimas de tipo CTX-M.**



Se observa que existe un alto número de aislamientos (8/10), todos ellos *E. coli*, productores de CTX-M-grupo-9 que resultan sensibles a CAZ según los puntos de corte del CLSI. En cambio, solo 3/89 aislamientos (2 *E. coli* y 1 *M. morgani*) portadores de CTX-M-grupo-1 fueron sensibles a CAZ. Con lo cual se puede inferir que los puntos de corte de CAZ no son capaces de categorizar como resistentes a todos los microorganismos productores de enzimas de tipo CTX-M del grupo 9.

Para confirmar esta hipótesis se buscó el **valor p**, comparando los resultados de CTX-M-grupo-1 y CTX-M-grupo-9

Comparación de Proporciones:

Ho: Las proporciones de casos sensibles en las muestras son iguales.

H1: Las proporciones de casos sensibles en las muestras son distintas.

### **Prueba de IC para dos proporciones**

Muestra	X	N	Muestra p
---------	---	---	-----------

1	8	10	0,800000
---	---	----	----------

2	3	89	0,033708
---	---	----	----------

Diferencia =  $p(1) - p(2)$

Estimado de la diferencia: 0,766292

IC de 95% para la diferencia: (0,515555; 1)

Prueba para la diferencia = 0 vs. no = 0:  $Z = 5,99$

**Valor P = 0,000**

**Interpretación:** Como el valor de P es menor a 0,05 de significación, las muestras presentan diferentes proporciones de casos que son sensibles, confirmando la hipótesis con un nivel de confianza del 95%.

Por otro lado 71/101 aislamientos (71,28%) productores de BLEE dieron resultados positivos en la amplificación de *bla*<sub>oxa-1</sub>. Para confirmar este resultado, el producto amplificado fue secuenciado, mostrando un 100% de identidad con *bla*<sub>oxa-1</sub> (tabla #15). Dicho gen se describió en *E. coli*, seguida de *K. pneumoniae* y *C. freundii*.

En la siguiente figura se muestran algunos de los resultados obtenidos, mientras que en el gráfico #9 se muestra la distribución de estos aislamientos respecto al grupo de enzimas CTX-M presentes en los mismos.

### Figura #10

#### Amplificación de genes que codifican para *bla*<sub>oxa-1</sub> por PCR.

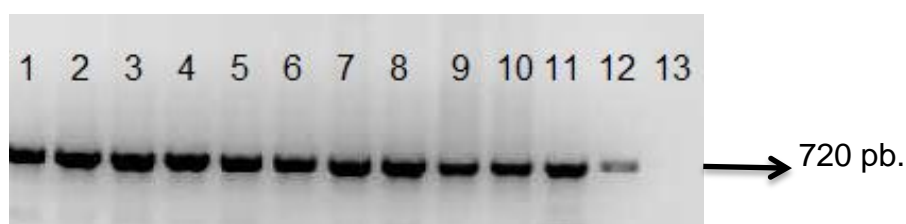


Figura #10: Calle 1-11 (aislamiento #24, #34, #37, #38, #40, #42, #44, #45, #50, #51, #57) (Todas *E. coli*); calle 12 control positivo; calle 13 control negativo para *bla*<sub>oxa-1</sub>

### Tabla #15

#### Secuencia nucleotídica de *bla*<sub>oxa-1</sub>.

```

..... 10      20      30      40      50      60      70      80      90
CTCCATTATT TGAAGGAACT GAAGGTIGTT TTTTACTTTA CGATGCACTC ACCAACGCTG AATTECTCA ATTCATATA GCAAGTGTG
..... 100     110     120     130     140     150     160     170     180
CAACGCAAT GGCACCCAGT TCAACTTICA AERTCGCAIT ATCACTTATG GCATTIGATG CEGAAATAAT AGATCAGAAA ACCATATCA
..... 190     200     210     220     230     240     250     260     270
AATGGGATA AACCCCCAAA GGAATGGAGA TCTGAAACAG CAATCATACA CCAAAGACGT GAATGCAATT TICTETIETT TGGGTTTCG
..... 280     290     300     310     320     330     340     350     360
AAGAAATAC CCAAAAAATT GGATTAAATA AATCAAGAA TTAATCATAA GATTTTGATT ATGGAATCA AGACTTCTCT GAGGATAAG

```

```

370      380      390      400      410      420      430      440      450
AAAGAAACAA CGGATTAACA GAAGCATGEC TCGAAGTAG CTAAAAATT TCACCAGAAG AACAAATICA ATTCCTGCGT AAAATTTATTA

460      470      480      490      500      510      520      530      540
ATCACAATCT CCCAGTAAA AACICAGCCA TAGAAAAAC CATAGAGAC ATGTATCTAC AAGATCTGGA TAATAGTACA AAATCTATG

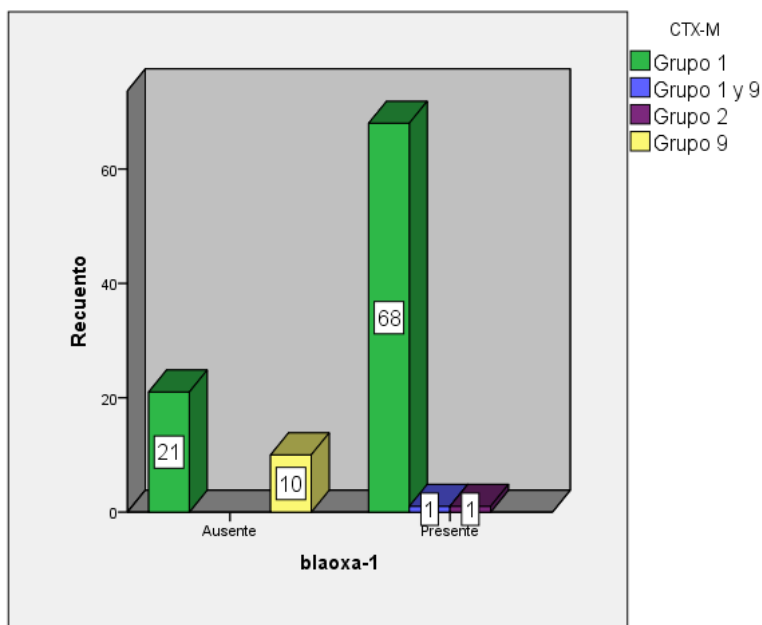
550      560      570      580      590      600      610      620      630
GGAAACTEG TCGAGGATC ACAGCAATA GAACCTACA AACCGGATG TTTCAGGEE TTTTATATAG CAATCAGGA CATAATATG

640      650      660      670      680      690      700      710      720
TTTTGTGTC CGCACTTACA GGAACITGG GGTGAAATIT AACICAAEC ATAAAGCCA AGAAAAATGC GATCACCAT

```

### Gráfico #9

Distribución de las *bla*<sub>OXA-1</sub> en las enterobacterias portadoras de *bla*<sub>CTX-M</sub>



Estos resultados permiten inferir que *bla*<sub>OXA-1</sub> no está ligado a aislamientos portadores de *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub>.

Además se evaluó la resistencia a FOX en las enterobacterias productoras de CTX-M (tabla #16).

**Tabla #16**

Enterobacteria	Cefoxitina			Total
	Intermedio	Resistente	Sensible	
<i>C. freundii</i>	0	1	0	1
<i>E. cloacae</i>	0	1	0	1
<i>E. coli</i>	5	0	82	87
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	11	11
<i>M. morganii</i>	1	0	0	1
Total	6	2	93	101

*C. freundii* y *E. cloacae* fueron resistentes a FOX mientras que *M. morganii* presentó sensibilidad intermedia debido a la expresión de su AmpC cromosómica inducible. Cinco aislamientos (*E. coli*) presentaron sensibilidad intermedia a dicha droga. *E. coli* carece de *ampR*, siendo la expresión de la enzima AmpC no inducible. La resistencia a FOX puede deberse a altos niveles de expresión constitutiva de AmpC o bien a disminución de la permeabilidad a la droga. Las mutantes hiperproductoras, pueden surgir por mutaciones en regiones promotoras o atenuadoras de *ampC*. También la adquisición de enzimas de tipo AmpC de codificación plasmídica pueden ser responsables de la sensibilidad disminuida a FOX, sin embargo, no se encontraron dichos genes en los aislamientos de *E. coli* estudiados.

Se realizó también la amplificación de los genes codificantes *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>PER-2</sub> y *bla*<sub>GES</sub>, pero no se obtuvo producto de amplificación para ninguna de las 101 enterobacterias incluidas en el estudio.

La amplificación de *bla*<sub>SHV</sub> por PCR, fue sólo positiva para *K. pneumoniae* dado que este gen se encuentra de manera ubicua en su genoma.

## Determinación de los grupos filogenéticos de *E. coli*.

### Figura #11

Amplificación de genes que codifican para grupos filogenéticos de *E. coli* por PCR multiplex.

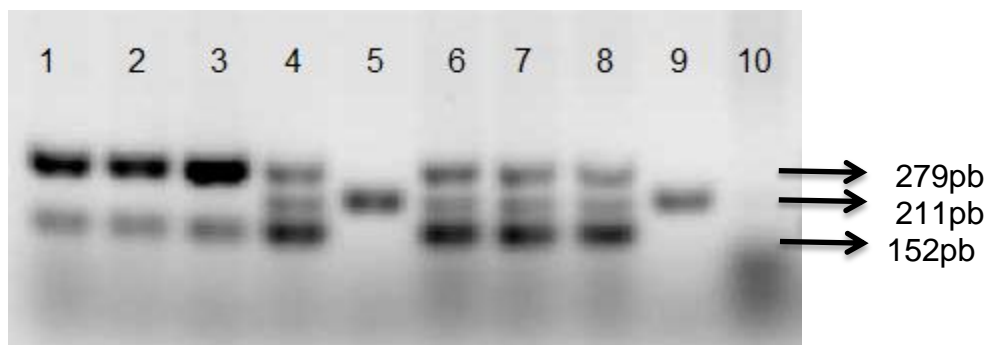
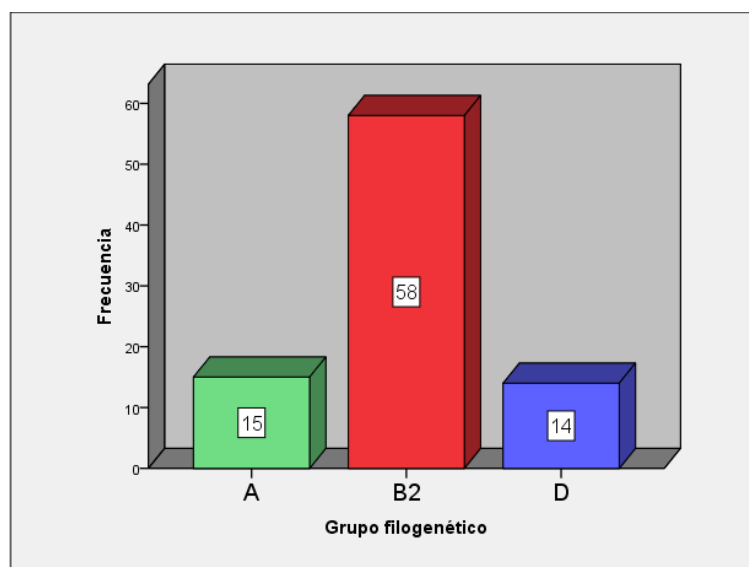


Figura #11: Calle 1: aislamiento #99 (*E. coli*) grupo D; calle 2: aislamiento #102 (*E. coli*) grupo D; calle 3: aislamiento #106 (*E. coli*) grupo D; calle 4: aislamiento #109 (*E. coli*) grupo B2; calle 5: aislamiento #34 (*E. coli*) grupo A; calle 6: aislamiento #3 (*E. coli*) grupo B2; calle 7: aislamiento #4 (*E. coli*) grupo B2; calle 8: aislamiento #13 (*E. coli*) grupo B2; calle 9: aislamiento #10 (*E. coli*) grupo A; calle 10 control negativo.

### Gráfico #10

Distribución de las 87 *E. coli* incluidas en el estudio según el grupo filogenético detectado.

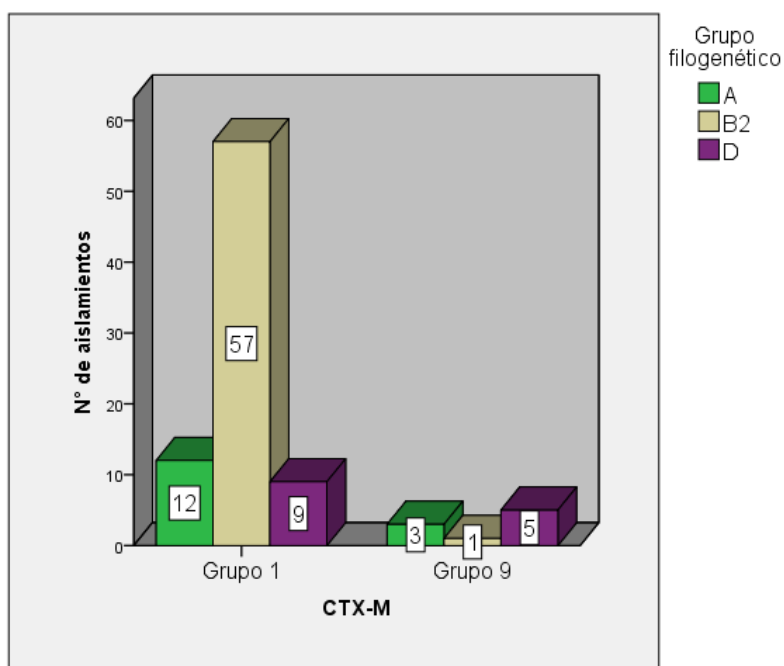


El gráfico #10 muestra una alta prevalencia de *E. coli* pertenecientes al grupo filogenético B2, al cual pertenecen la mayoría de las cepas virulentas extraintestinales, seguida por el grupo A que incluye a las cepas consideradas comensales y el grupo D, el cual incluye a virulentas menos frecuentes.

A su vez, se analizó la distribución de enzimas de grupo de CTX-M respecto al grupo filogenético al cual pertenecía cada aislamiento de *E. coli* (gráfico #11)

### Gráfico #11

Distribución de los diferentes grupos filogenéticos dentro de cada grupo de CTX-M en las 87 *E. coli* estudiadas.



De acuerdo a los resultados obtenidos se observa una evidente asociación del grupo filogenético B2 con los genes *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>. Sin embargo, los aislamientos que presentaron grupo filogenético A y D mostraron un patrón de distribución heterogéneo dentro de ambos grupos de CTX-M encontrados.



Se analizó si existe asociación entre el grupo filogenético B2 y *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub> determinando el **valor p**.

Comparación de Proporciones:

Ho: Las proporciones de casos de asociación en las muestras son iguales.

H1: Las proporciones de casos de asociación en las muestras son distintas.

### **Prueba e IC para dos proporciones**

Muestra	X	N	Muestra p
---------	---	---	-----------

1	57	78	0,730769
---	----	----	----------

2	21	78	0,269231
---	----	----	----------

Diferencia =  $p(1) - p(2)$

Estimado de la diferencia: 0,461538

IC de 95% para la diferencia: (0,322329; 0,600748)

Prueba para la diferencia = 0 vs. no = 0:  $Z = 6,50$

**Valor P = 0,000**

**Interpretación:** Como el valor de P es menor a 0,05 de significación, las muestras presentan diferentes proporciones de casos de asociación, confirmando la hipótesis con un nivel de confianza del 95%.

## Detección e identificación de genes PMQR

En seis aislamientos de *E. coli* se obtuvo amplificación positiva para *qepA*. En la figura #12 se muestran algunos de los resultados. Para confirmar la identidad de los productos amplificados, los mismos fueron digeridos con la enzima de restricción *NcoI*, la cual fue previamente seleccionada empleando el programa WebCutter (figura #13). Por último se secuenciaron los 6 amplicones correspondientes a *qepA*, para identificar la variante alélica, la cual correspondió a *qepA1* en todos los casos.

### Figura #12

#### Amplificación de genes de *qepA* en enterobacterias productoras de BLEE.

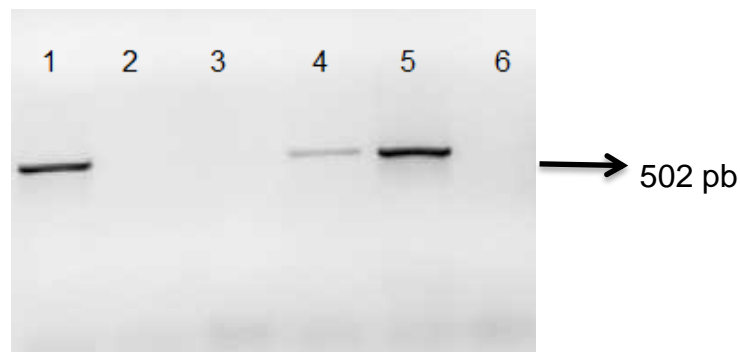


Figura #12: Calle 1: aislamiento #5 (*E. coli*), calle 2 aislamiento #81 (*E. coli*), calle 3: aislamiento #99 (*E. coli*), calle 4: aislamiento #50 (*E. coli*), calle 5: control positivo, calle 6: control negativo para *qepA*.

### Figura #13

#### Digestión de los amplicones de *qepA* con la enzima *NcoI*.

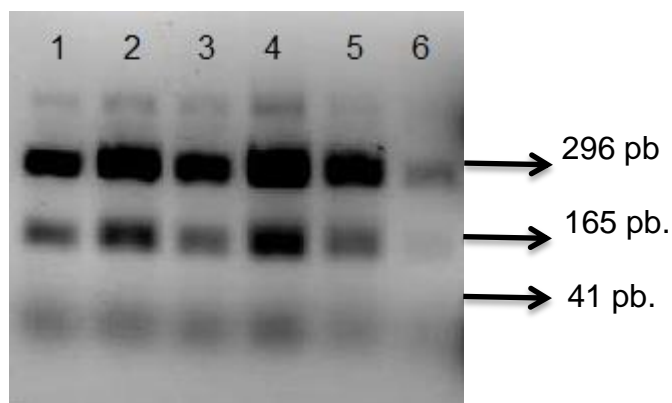


Figura #13: Calle 1: aislamiento #5 (*E. coli*), calle 2: aislamiento #9 (*E. coli*), calle 3: aislamiento #50 (*E. coli*), calle 4: aislamiento #54 (*E. coli*), calle 5: aislamiento #55 (*E. coli*), calle 6: aislamiento #66 (*E. coli*).

Tabla #17

Secuencia nucleotídica de los genes *qepA1*

```

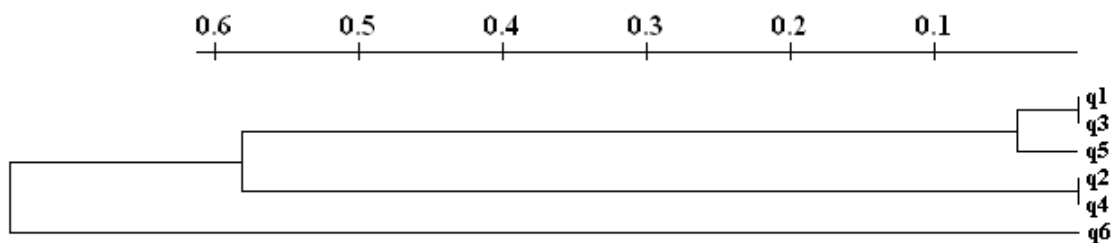
----- 10      20      30      40      50      60      70      80      90
TEATCACCAT EGGCAACECTG GCGGACCGCA TCGCCCGCG CCGCTCTTG TTGATCGCG CCGCTTCTT CCGATTCECC TCGGTCTCG
----- 100     110     120     130     140     150     160     170     180
CGCCCTGTC CGATACCECC GCGCTTTGA TCGCCCGCG CCGCTTCTC GCGCTGCGC GCGCCACCAT CCGCCCTCC ACCATGCGCC
----- 190     200     210     220     230     240     250     260     270
TGGTCCGCA CATCTTCCAC GACCCCGCG CCGCCAGTT CCGCATCGC GTGTGGATC CCGCTTTTC GCTGGGCAAC GCGATCGCT
----- 280     290     300     310     320     330     340     350     360
CGCTGGTCC GCGCTCTTG CTGGATTTT TCCACTGGG CCGCTTCTC TGGTCAACG TCGCGGTGT GCTGCTGAC CCGCCCTCG
----- 370     380     390     400     410     420     430     440     450
GCGCTCGCT CCGTCCCGG TATCGTATC CCGACCGCG GCGCTTGGC CTGGCCAGC TCGTCTCTC G-----

```

Se realizó la tipificación clonal de los aislamientos de *E. coli* portadores de *qepA* por métodos basados en PCR (REP-PCR) (figura #14).

Figura #14

REP-PCR de las 6 *E. coli* portadoras de genes *qepA*.



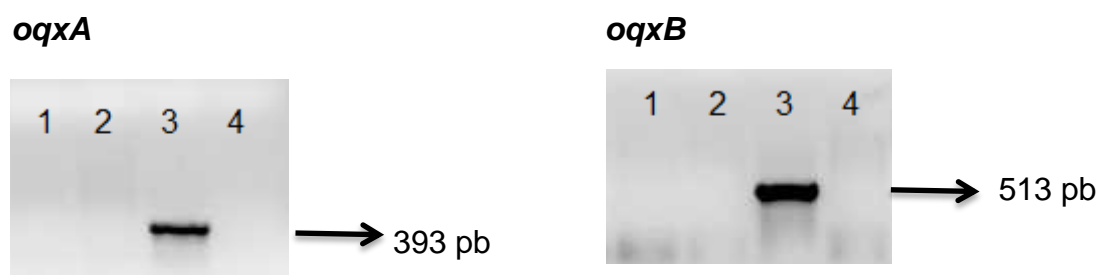
Los aislamientos fueron agrupados en 3 “clusters”. Los 3 aislamientos pertenecientes al cluster q1 provienen de dos centros de salud distintos (Laboratorio Clínico “Central” (Clínica Copacabana) y del Hospital Obrero #2 CNS): Dos fueron recuperados de muestras de orina (de pacientes internado y

ambulatorio) y uno fue recuperado de secreción de oído (de un paciente internado). El *cluster* q2 comprende 2 aislamientos que provienen de los mismos centros de salud mencionados anteriormente, de infecciones urinarias de pacientes ambulatorios. Por último el *cluster* q3 comprende un único aislamiento recuperado de una infección urinaria de un paciente de sexo masculino internado en el Hospital Obrero #2 de la Caja Nacional de Salud.

Se llevó a cabo la búsqueda de *oqxA* y *oqxB* por amplificación por PCR en todas las enterobacterias a excepción de *K. pneumoniae*, ya que se postula la localización cromosomal de estos genes en esta especie.

### Figura #15

#### Amplificación por PCR de genes *oqxA* y *oqxB* en enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación



Calle 1, aislamiento #65 (*E. coli*);  
calle 2, aislamiento #66 (*E. coli*);  
calle 3, aislamiento #64 (*E. coli*);  
calle 4 control negativo para *oqxA*.

Calle 1, aislamiento #65 (*E. coli*);  
calle 2, aislamiento #66 (*E. coli*);  
calle 3, aislamiento #64 (*E. coli*);  
calle 4 control negativo para *oqxB*.

Sólo en un aislamiento de *E. coli* se obtuvo resultado positivo para ambos genes. La secuenciación de estos amplicones permitió confirmar la identidad de *oqxA* y *oqxB* (tabla #18 y #19). Este aislamiento fue obtenido de una muestra de esputo de un paciente femenino de 61 años de edad, internado en el Hospital Obrero #2 de la Caja Nacional de Salud.

Tabla #18

Secuencia nucleotídica del gen *oqxA*

```
----- 10      20      30      40      50      60      70      80      90
CTCGGCGCGA TGAATCTCTC CTTTCTGCTC GTCGGCTGCG ACGACAGCCT CCGACAGAAAT GCTGCGCCCT CCGCCCCGAC GGTACGCGCC
----- 100     110     120     130     140     150     160     170     180
GCTAAGGTTC TGGTGAAGTC GATCAGTCAG TGGGATAGTT TTACCGGTCC CATTGAAACG GTEGAGAGCG TTCAGCTTCC CCCTCGCTC
----- 190     200     210     220     230     240     250     260     270
TCEGGATACA TTGATAAAAT GAAATACACT GACGCGCAGG AAGTGAHAAA GGGCCAGGTG CTGTTACGGA TAGATGACAG AACCTATCC
----- 280     290     300     310     320     330     340     350     360
GCGCGCTCG AGCAGGCGCA GCGCGCTTG GCAAGAGCCA AAACGAGGC CAGCCCTCGC CAAAGCGAGG CGAACCGCAC CGATAAATTA
----- 370     380     390     400     410     420     430     440     450
GTCCATACCA ACCTCGTCTC CCGNGAAGAG TGG-----
```

Tabla #19

Secuencia nucleotídica del gen *oqxB*

```
----- 10      20      30      40      50      60      70      80      90
GCGGGAAGTA CCACTCGCTG TATATGCGCA ACTAGCCAC GCTGAAATG AAGGATGAG TGGCGCGCT GCCCGCTC GCGCAGTCC
----- 100     110     120     130     140     150     160     170     180
AGATTTTITG CTCGCGTGA TATCGCATC GCGTCTGECT GATCCCAAT AAGTCCCTG CCGCGGCTCT GACGCGCTCG GATGTTGTA
----- 190     200     210     220     230     240     250     260     270
CGCGCATGCA GAGCAAAAC GTCCAGGTGT CTGCGCGACA GCTTGGCGCC GAGCGCTTC CCGAGGAGAG CGATTTCCCTG ATCTCCATTA
----- 280     290     300     310     320     330     340     350     360
ACCGCCAGGG CCGTCTGCAT ACCGAAAGAG AGTTTGGCAA TATCATTCTG AAAACGCGC AAGATGCTC GCTGGTCCGC CTGCGCGAG
----- 370     380     390     400     410     420     430     440     450
TGGCGCGCAT CGAGATGEE TCCGTTACT ATCGCTCCG CTCCCAGCTC AACAAATAGG ATCGGCTCG GATCGGTATC TTCCAGTAC
----- 460     470     480     490     500     510     520     530     540
CCGCGCTAA CGCCATCCAT CTGTGAAAG CGGTAC
```

Se investigó la presencia de los genes codificantes de la enzimas AAC(6')-Ib y su variante AAC(6')-Ib-cr. En la [figura #16](#) se muestran algunos de los resultados obtenidos.

## Figura #16

Amplificación por PCR de genes de *aac(6')-Ib* en enterobacterias productoras de BLEE.

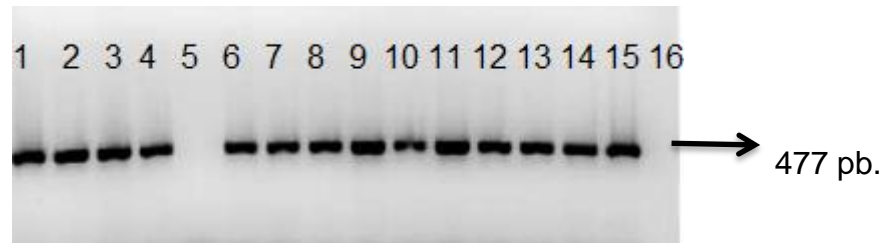


Figura #16: Calle 1: aislamiento #19 (*E. coli*), calle 2: aislamiento #20 (*E. coli*), calle 3: aislamiento #21 (*E. coli*), calle 4: aislamiento #24 (*E. coli*), calle 5: aislamiento #27 (*K. pneumoniae*), calle 6: aislamiento #25 (*E. coli*), calle 7: aislamiento #37 (*E. coli*), calle 8: aislamiento #38 (*E. coli*), calle 9: aislamiento #40 (*E. coli*), calle 10: aislamiento #42 (*E. coli*), calle 11: aislamiento #44 (*E. coli*), calle 12: aislamiento #45 (*K. pneumoniae*), calle 13: aislamiento #48 (*E. coli*), calle 14: aislamiento #59 (*E. coli*), calle 15: control positivo, calle 16: control negativo para *aac(6')-Ib*.

La amplificación fue positiva en 87 aislamientos. Para diferenciar entre amplicones correspondientes a *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib-cr* se realizó una digestión con la enzima *BseGI*. Esta enzima es capaz de digerir *aac(6')-Ib* pero no su variante. Si luego de la digestión se observa sólo una banda de 477 pb (tamaño del amplicón) corresponde al producto de amplificación de *aac(6')-Ib-cr*, mientras que si se observan dos productos (productos de 182 pb y de 295 pb.) corresponden a *aac(6')-Ib*. De los 87 amplicones, 84 aislamientos correspondieron a la variante *aac(6')-Ib-cr*. En la figura #17 se muestran algunos de los resultados obtenidos. Se secuenciaron 2 amplicones

representativos de *aac(6')-Ib* y de *aac(6')-Ib-cr*, para confirmar su identidad. En la tabla #20 se muestran las secuencias nucleotídicas, las respectivas secuencias aminoacídicas y el cambio en los dos codones correspondientes a Trp102Arg y Asp179Tyr.

### Figura #17

#### Digestión con la enzima *BseGI* de los amplicones de *aac(6')-Ib*.

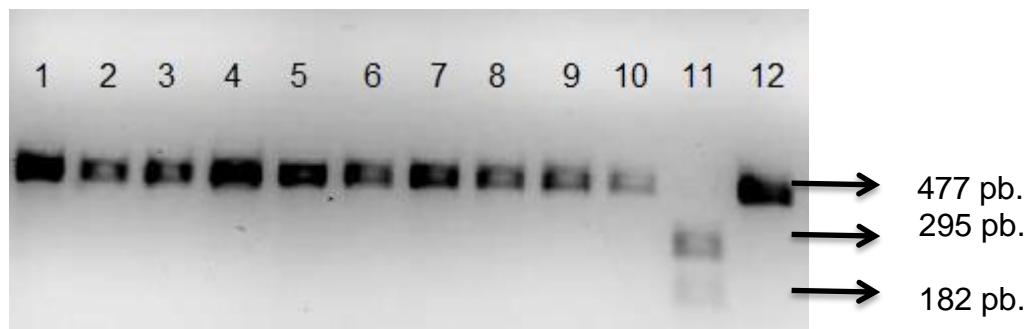


Figura #17: Calle 1: aislamiento #20 (*E. coli*), calle 2: aislamiento #21 (*E. coli*), calle 3: aislamiento #37 (*E. coli*), calle 4: aislamiento #38 (*E. coli*), calle 5: aislamiento #40 (*E. coli*), calle 6: aislamiento #42 (*E. coli*), calle 7: aislamiento #44 (*E. coli*), calle 8: aislamiento #45 (*K. pneumoniae*), calle 9: aislamiento #48 (*E. coli*), calle 10: aislamiento #59 (*E. coli*), calle 11: aislamiento #25 (*E. coli*), calle 12: amplicón correspondiente a *aac(6')-Ib-cr*.

### Tabla #20

#### Secuencias nucleotídicas de los genes *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib-cr*

	110	120	130	140	150	160	170	
<i>aac(6')-Ib</i>	ACATTCGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAAGCGGGACGGATGGT							
	MetLeuAsnGlyGluProIleGlyTyrAlaGlnSerTyrValAlaLeuGlySerGlyAspGly							Trp
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	ACATTCGCAATGCTGAATGGAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAAGCGGGACGGATGGT							C
	MetLeuAsnGlyGluProIleGlyTyrAlaGlnSerTyrValAlaLeuGlySerGlyAspGly							Arg
	210	220	230	240	250	260	270	
<i>aac(6')-Ib</i>	ACGCGGAATAGACCAGTTACTGGCGAATGCATCACAAC TGGCAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCT							
	ArgGlyIleAspGlnLeuLeuAlaAsnAlaSerGlnLeuGlyLysGlyLeuGlyThrLysLeuValArgAlaLe							
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	ACGCGGAATAGACCAGTTACTGGCGAATGCATCACAAC TGGCAAGGCTTGGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCT							
	ArgGlyIleAspGlnLeuLeuAlaAsnAlaSerGlnLeuGlyLysGlyLeuGlyThrLysLeuValArgAlaLe							
	310	320	330	340	350	360	370	
<i>aac(6')-Ib</i>	GAGGTCACCAAGATCCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGTTT							
	GluValThrLysIleGlnThrAspProSerProSerAsnLeuArgAlaIleArgCysTyrGluLysAlaGlyPhe							
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	GAGGTCACCAAGATCCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTGCGAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGTTT							
	GluValThrLysIleGlnThrAspProSerProSerAsnLeuArgAlaIleArgCysTyrGluLysAlaGlyPhe							

```

          410      420      430      440      450
aac(6')-Ib  CAGATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTTCGAGCGAACACGCAG
Pr  Asp  GlyProAlaValTyrMetValGlnThrArgGlnAlaPheGluArgThrArg
aac(6')-Ib-cr  T
Pr  Tyr  GlyProAlaValTyrMetValGlnThrArgGlnAlaPheGluArgThrArg

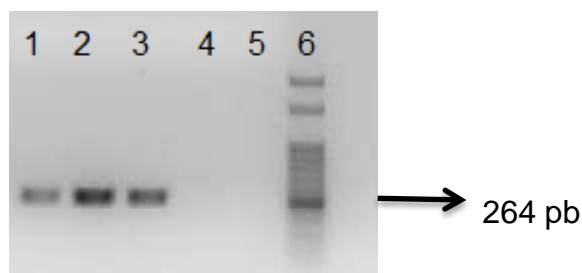
```

Se llevó a cabo la investigación de genes codificantes de proteínas Qnr en todas las enterobacterias incluidas en el estudio. Seis aislamientos amplificaron para *qnrB*, de los cuales, 4 correspondieron a *E. coli*, 1 a *E. cloacae* y 1 a *K. pneumoniae*. En la figura #18 se muestran algunos de los resultados obtenidos. No se obtuvo amplificación para *qnrA*, S, C o D.

Se secuenciaron los 6 genes pertenecientes a *qnrB*, los cuales correspondieron en 5 casos a *qnrB1* (4 *E. coli*, 1 *E. cloacae*) y 1 correspondió a *qnrB19* (*K. pneumoniae*). Las secuencias nucleotídicas se observan en la [tabla #21](#) y [tabla #22](#) respectivamente.

### Figura #18

#### Amplificación de genes *qnrB* en enterobacterias productoras BLEE por PCR.



**Figura #18:** Calle 1: aislamiento #57 (*E. coli*), calle 2: aislamiento #57 (*E. coli*), calle 3: aislamiento #91 (*E. cloacae*), calle 4: aislamiento #88 (*E. coli*), calle 5 control negativo para genes *qnrB*, calle 6: marcador de peso molecular.



## Tabla #21

### Secuencia nucleotídica del gen *qnrB1*

```
..... 10      20      30      40      50      60      70      80      90
AAATAGGCTC TGGCACTCGT TGGCGAAAAA ATTGACAGAA ACCGTTTTCAC CGGTGAGAAA ATTGAAAAA GTACATTTTT TAACCTGTGT
..... 100     110     120     130     140     150     160     170     180
TTTTAGGTTG CCGACCTGAG CCGCACTGAA TTTATCGGCT GTCACTTCTA TGATCGTGA AGCCAGAAA GGTGCATTT TAGTCGTGG
..... 190     200     210     220     230     240     250     260     270
ATGCTGAAA GATGCCATTT TAAAAGCTGT GATTTATCCA TGCCGGATTT TCGCATTCC AGTGCCTGG GCATTGAAA TCGCCACTEC
..... 280     290     300     310     320     330     340     350     360
CGCCACAA GCGCAGATTT CCGCGCGCA AGCTTTATGA ATATGATCAC CACGCGCACC TGGTTTTGTA GCGCATATAT CACGAAATAC
..... 370     380     390     400     410     420     430     440     450
AACTAAGCT ACGCCATTT TTCGAAAGTC GTTTTGAAA AGTGTAGCT GTGGAAAA CTTTGGATG GTGCCCGGT ACTGGGCGG
..... 460     470     480     490     500     510     520     530     540
ACGTTCAETG GTTCAGACT CTCCGCGGC GATTTTTCGA CTTTCAGCTG GCGAGCAGCA AACTTACAC ATTECGACT GACCAATTC
..... 550     560     570     580     590     600     610     620     630
GAGTTGGTTG ACTTAGAAT TCGGGCGTT GATTTACAA GCTTAGTT GACCACTAC CAGGC
```

## Tabla #22

### Secuencia nucleotídica del gen *qnrB19*

```
..... 10      20      30      40      50      60      70      80      90
TTACTTTTT AAAAAAAC ACCGGGCATA GATATGACT TGGCTTACT TGGCGAAAAA ATTGACAGAA ATCGCTTTCAC CGGTGAGAAA
..... 100     110     120     130     140     150     160     170     180
GTTGAAAAA GTACATTTTT TAACCTCGAT TTTTACGTTG CCGACCTGAG CCGCACTGAA TTTATCGGCT GCCAGTCTA TGATCGCGAA
..... 190     200     210     220     230     240     250     260     270
AGTCAGAAA GGTGCATTT TAGTCGCGCA ATGCTGAAA GATGCCATTT CAAAAGCTGT GATTTATCAA TGCCAGATTT CCGCAACGTC
..... 280     290     300     310     320     330     340     350     360
AGTCCCTGG GCATTGAAA TCGCCACTEC CGCCACAA GCGCAGATTT CCGCGGTGCA AGCTTTATGA ATATGATCAC CACGCGCACC
..... 370     380     390     400     410     420     430     440     450
TGGTTTTGA GCGCATATAT CACTAATACT AACTAAGCT ACGCCATTT TTCGAAAGTC GTTTTGAAA AGTGTAGCT GTGGAAAA
..... 460     470     480     490     500     510     520     530     540
CGCTGGATG GACTCAGTT ACTGGGTGG ACGTTCAETG GTTCAGACT CTCCGCGGC GATTTTTCGA CTTTCAGCTG GCGAGCAGCA
..... 550     560     570     580     590     600     610     620     630
AACTTACAC ATTECGACT GACCAATTC GAGTTAGTT ACTTAGAAT TCGGGCGTT GATTTACAA GCTTAGTT GACCACTAC
```

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

---

El continuo incremento en los niveles de resistencia a antibióticos que se observa, a nivel mundial, en especial en microorganismos causantes de infecciones no ha dejado atrás a Bolivia, sin embargo, en este país no existen estudios que describan los marcadores genéticos responsables de la resistencia en enterobacterias provenientes de infecciones clínicas, solo se cuenta con estudios realizados en enterobacterias comensales. Este estudio contribuye a mostrar la situación epidemiológica en lo que respecta a la resistencia a los antibióticos de uso frecuente como son los  $\beta$ -lactámicos y quinolonas.

Para la realización de este trabajo se incluyeron los todos los aislamientos resistentes a cefotaxima y/o ceftazidima recuperados de 5 centros de salud de la ciudad de Cochabamba-Bolivia, entre diciembre del 2012 y marzo del 2013.

Las edades donde se presentaron con mayor frecuencia infecciones producidas por enterobacterias productoras de BLEE fueron entre 50 a 80 años y la mayoría de los aislamientos (84%) se recuperaron de muestras de orina (como es de esperar el 71% pertenecían a pacientes del sexo femenino), seguida en un 7% de secreciones de herida.

La resistencia a cefalosporinas de tercera generación y quinolonas se observó no solo en el ambiente hospitalario, sino también en la comunidad, mostrando porcentajes similares. En estudios realizados en el país se ha observado que existe presión a la hora de recetar un antimicrobiano, para satisfacer la ansiedad de los pacientes y que la automedicación, favorecida por el hecho del expendio de antibióticos sin receta médica, es muy frecuente, por lo que lleva a un tratamiento inapropiado. En este sentido, la Sociedad Boliviana de Pediatría

solicitó al Ministerio de Salud una ley que obligue a las farmacias el expendio de antibióticos bajo receta médica, sin embargo aún no se han tomado medidas al respecto<sup>43</sup>.

De las enterobacterias productoras de BLEE, la especie que se identificó en mayor proporción fue *E. coli* (86%): *E. coli* constituye la enterobacteria más prevalente en infecciones urinarias en la ciudad. En un estudio realizado en el Hospital Viedma, entre el año 2008 y 2009, se vio que más del 60% de las infecciones urinarias eran producidas por *E. coli*<sup>44</sup>, lo cual concuerda con estudios realizados en otras partes del mundo<sup>45,46,47</sup>.

Todas las enterobacterias incluidas en el estudio fueron resistentes a cefotaxima, lo cual es concordante con que todos los aislamientos fueron productores de enzimas de tipo CTX-M, una BLEE considerada fundamentalmente una cefotaximasa<sup>48</sup>. En cambio, solo el 62,7% mostraron resistencia a ceftazidima según los actuales puntos de corte del CLSI<sup>37</sup>. Si se emplean los puntos de corte del EUCAST para 2014<sup>49</sup> el nivel de resistencia a para ceftazidima se incrementa 25,4% respecto del obtenido empleando los puntos de corte del CLSI. En Argentina, Brasil y Chile, donde se observa una alta prevalencia de estas enzimas, acreditan que el mal uso de ceftriaxona fue importante para promover la diseminación de cepas productoras. La ceftriaxona es de metabolización hepática e inhibe la flora del tracto gastrointestinal, por tanto, podría seleccionar a las cepas productoras de cefotaximasas<sup>50</sup>. Solo un 8% de los aislamientos estudiados mostró sensibilidad a cefepime. Aun así, dado que su eficiencia es dependiente del inóculo y de la dosis, se recomienda utilizarlo en altas dosis en cuadros de sepsis graves<sup>46</sup>.

También es importante tener en cuenta la resistencia a quinolonas observada, debido a que es un antibiótico alternativo y también utilizado en tratamientos empíricos. Es frecuente observar enterobacterias resistentes a varias familias de antibióticos, dado que algunos elementos genéticos y plásmidos que llevan el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> también son portadores de otros genes que codifican para AmpC β-lactamasas, carbapenemasas, PMQR, o metilasas que afectan aminoglucósidos. A su vez, la presencia de estos genes pueden dar ventaja a *bla*<sub>CTX-M</sub> para su persistencia mediada por el proceso de co-selección<sup>17</sup>.

De las 101 enterobacterias productoras de BLEE, un 90% fue resistente a ciprofloxacina, un 91% a ácido nalidíxico y 89% a levofloxacina. Los aminoglucósidos como ampicilina y kanamicina, fueron las drogas más activas presentando 2% y 15% de resistencia, respectivamente, mientras que la resistencia a gentamicina fue de 72%.

En un reporte de la red Whonet del año 2009, se analizaron 6107 *E. coli* provenientes de infecciones comunitarias, 2904 *E. coli* y 1014 *K. pneumoniae* de origen hospitalario, de diferentes hospitales de Bolivia. En las figuras #19, #20 y #21, respectivamente se observa la resistencia en porcentaje a los distintos antibióticos.

### Figura #19

#### Porcentajes de resistencia en *E. coli* provenientes de infecciones comunitarias.

N°	AMP		CEP		GEN		SXT		NIT		NOR		NAL		CTX	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
6107	2	70	4	31	2	30	2	72	5	10	4	45	2	54	5	12

Figura #20

Porcentajes de resistencia en *E. coli* provenientes de infecciones hospitalarias.

N°	AMP		CEP		CTX		NAL		SXT		NIT		NOR		GEN	
	I	R	I	R	I*	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
2904	2	92	9	68	5	31	4	70	2	74	3	23	2	60	2	38

Figura #21

Porcentajes de resistencia en *K. pneumoniae* provenientes de infecciones hospitalarias.

N°	SAM		CTX		CAZ		IPM		CHL		CIP		GEN		AMK	
	I	R	I*	R	I*	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
1014	2	33	4	50	1	23	1	4	3	38	3	42	2	44	3	25

AMP: ampicilina, CEP: cefalotina, GEN: gentamicina, SXT: sulfatrimetroprim, NIT: nitrofurantoína, NOR: norfloxacin, NAL: ác. Nalidíxico, CTX: cefotaxima, SAM: ampicilina + sulbactam, CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, CHL: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, AMK: amicacina.

En Latinoamérica se reportan valores de alrededor del 8% de *E. coli* y 40% de *K. spp.* productoras de BLEE<sup>50</sup>.

Mediante amplificación por PCR se identificaron distintos grupos de *bla*<sub>CTX-M</sub> con una marcada prevalencia (88,12%) de *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>, cuya secuencia correspondió a *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. El resultado es concordante con el estudio realizado por Bartoloni et al, en Abril del 2013<sup>36</sup>, en los niños del chaco boliviano, donde encontraron amplia prevalencia de *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub> en portadores sanos y también con estudios realizados en otros países de Sudamérica y del mundo<sup>51</sup>,<sup>52</sup>. El 8,91% de los aislamientos fueron portadores de *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub>, cuya secuencia correspondió a *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. También se encontró un aislamiento de *C.*

*freundii* portador de *bla*<sub>CTX-M-grupo-2</sub> y una *K. pneumoniae* portadora de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

Al comparar el grupo de *bla*<sub>CTX-M</sub> presente respecto a la sensibilidad a ceftazidima según los puntos de corte actuales del CLSI, se observa que de los aislamientos portadores de *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub> 3/89 resultaron sensibles a dicha droga, en cambio, de los de aislamientos portadores de *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub> 8/10 fueron sensibles. Claramente se observa que los aislamientos portadores de *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub> presentan mayor sensibilidad a ceftazidima ( $p > 0,05$ ), de igual manera se observan tomando los puntos de corte del EUCAST. En la actualidad, ambos Comités indican que empleando los puntos de corte actuales, basados en criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos, los resultados de sensibilidad deben ser informados según los datos obtenidos para cada antibiótico, sin ser necesaria la detección y confirmación de BLEE, salvo con fines epidemiológicos. Por el contrario, la Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC, de la Asociación Argentina de Microbiología continúa con la recomendación de realizar los ensayos confirmatorios de BLEE e informar como resistentes a todas las cefalosporinas de tercera generación a aquellas enterobacterias productoras de estas enzimas, hasta tanto se cuente con suficiente información clínica acerca de la eficacia de los nuevos puntos de corte.

El 67% de las *E. coli* correspondieron al grupo filogenético B2, seguido de un 17% del grupo A y un 16% del grupo D. Se observa asociación entre la presencia de *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub> y grupo filogenético B2 ( $p < 0,05$ ), pero no así para *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub>. En un estudio realizado en Estados Unidos, se observa que los aislamientos de *E. coli* del ST131 productores de CTX-M-15 corresponden en

su mayoría al grupo filogenético B2, en cambio, los aislamientos productores de CTX-M-15 pero que no corresponden al ST131 se asocian a otros grupos filogenéticos como el A de manera predominante, seguida de los grupos D y B1, pero no el B2.<sup>53</sup>

El 71% de las enterobacterias fueron portadoras del gen *bla*<sub>oxa-1</sub>. Según Coque *et al* en 2008, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se asocia con *bla*<sub>oxa-1</sub>, en este sentido, en este trabajo pudimos observar que ninguno de los aislamientos portadores de *bla*<sub>CTX-M-grupo-9</sub> presentó *bla*<sub>oxa-1</sub>, a diferencia de *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-grupo-2</sub> que sí presentaron *bla*<sub>oxa-1</sub>. El clon ST131 productor de CTX-M-15 es caracterizado por su multirresistencia y su co-producción con OXA-1.<sup>54</sup>

Los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE no resultan resistentes a cefoxitina, a menos que expresen concomitantemente otro mecanismo de resistencia como impermeabilidad, hiperproducción de su propia AmpC o adquisición de genes codificantes de AmpC de localización plasmídica. En el presente estudio se descartó la presencia de genes codificantes de enzimas AmpC plasmídicas en los 5 *E. coli* que mostraron una sensibilidad intermedia a esta droga. Probablemente la sensibilidad disminuida a cefoxitina se deba a un aumento en la expresión de su propia AmpC, ya sea por duplicación del gen, por mutaciones en el promotor o atenuador de AmpC, o también por impermeabilidad por pérdida de expresión (parcial o total) de alguna porina.<sup>55</sup>

Los determinantes de resistencia plasmídica a quinolonas (PMQR), en general, producen una disminución discreta de la sensibilidad a quinolonas, pero su estudio es importante ya que pueden favorecer (incluso intratratamiento) la selección de mutaciones en las región cromosómica QRDR, de *gyrA* y *parC* las cuales determinan valores elevados de CIM a quinolonas y fluoroquinolonas.<sup>56</sup>



En el presente estudio se detectó la presencia de diferentes genes PMQR. Se observó la presencia del gen codificante de la bomba de eflujo QepA1 en 6 cepas de *E. coli* las cuales portaban a su vez *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y pertenecían al grupo filogenético B2. Son escasos los reportes de este marcador de resistencia en Latinoamérica. Estudios previos realizados en Bolivia, sobre un total de 60 aislamientos que presentaban sensibilidad reducida a cefalosporinas de amplio espectro, 5 fueron portadores de *qepA* y productores de CTX-M-15 y/o CTX-M-14<sup>36</sup>. En otro estudio realizado en Argentina se encontró *qepA1* en una *E. coli* ST68<sup>57</sup> perteneciente al grupo filogenético B2. Por otro lado, en México en un estudio realizado en 112 enterobacterias productoras de BLEE, 4,5% de las *E. coli* presentaban simultáneamente los genes *qepA* y *bla*<sub>CTX-M-15</sub><sup>58</sup>.

Respecto a la bomba de eflujo OqxAB, la cual resulta poco frecuente en enterobacterias distintas de *K. pneumoniae*, se identificó 1 aislamiento de *E. coli* portador de *oqxAB* (plasmídico). Este aislamiento presentó simultáneamente *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> y correspondió al grupo filogenético B2, siendo el primer reporte en Bolivia y uno de los primeros en Latinoamérica. Recientemente se han detectado 3 aislamientos de *E. coli* en Perú y 1 de Argentina portadores de dichos genes *oqxAB*<sup>59, 60</sup>.

El 83,7% de los aislamientos presentaron *aac(6')-Ib-cr*, lo cual representa una mayor prevalencia que lo observado en el estudio llevado a cabo en Bolivia en enterobacterias comensales, donde se reporta un 35%<sup>36</sup>. Por su parte, en México se han reportado un 33% de *K. pneumoniae*<sup>58</sup> y un 49,5% de otras enterobacterias que presentaban dicho gen<sup>61</sup>. En Chile, la prevalencia de *aac(6')-Ib-cr* fue del 54% en *K. pneumoniae* y 74% en *E. coli*<sup>62</sup> y en Perú fue

del 55,6%<sup>63</sup>. Por el contrario en Brasil en un total de 101 enterobacterias resistentes a quinolonas, solo 4 aislamientos presentaron *aac(6')-Ib-cr*<sup>64</sup>.

En el presente estudio, la presencia conjunta de *aac(6')-Ib-cr* con *bla*<sub>CTX-M-grupo-1</sub> se observó de manera muy frecuente. En un estudio realizado en Argentina se observó un 44% de aislamientos tanto de *E. coli* como *K. pneumoniae* que presentaban *aac(6')-Ib-cr* asociados en su mayoría, con CTX-M-15; correspondiendo las *E. coli* al grupo filogenético B2<sup>65</sup>.

Por otro lado, solo 6 aislamientos (5,9%) fueron portadores de *qnrB*, 5 correspondieron a *qnrB1* y 1 a *qnrB19* constituyendo la primera identificación de *qnrB1* en Bolivia. En estudios previos en personas sanas en dicho país, se identificó *qnrB19* en mayor porcentaje (2,58%), además de *qnrB2* y *qnrB10*<sup>35</sup>, mientras que en Argentina el gen más prevalente fue *qnrB2* (27%)<sup>66</sup>. Por el contrario en México se observó que un 94,1% de las enterobacterias contenían genes *qnrB*, donde, *qnrB1* se presentó en mayor porcentaje (47%)<sup>58</sup>, En Colombia se identificó *qnrB19*<sup>67</sup> y en Brasil el 12,3% de la muestra analizada, contenían *qnrB1*<sup>68</sup>.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

---

- Este trabajo constituye el primer reporte de marcadores de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas en infecciones hospitalarias y no hospitalarias de la ciudad de Cochabamba-Bolivia.
- Las enzimas de tipo cefotaximasas fueron las únicas BLEE encontradas en este estudio, con una marcada prevalencia de enzimas CTX-M-grupo-1 respecto a otros grupos.
- Se observó resistencia disociada a oximiinocefalosporinas (sensibilidad a ceftazidima y resistencia a cefotaxima) según los puntos de corte del CLSI, en especial en enterobacterias portadoras de genes *bla*<sub>CTX-grupo-9</sub>. Esto constituye un llamado de atención al momento de llevar a cabo los ensayos de determinación de sensibilidad y muestra la necesidad de incluir cefotaxima en el ensayo.
- Un 71% de las enterobacterias productoras de BLEE, presentaron simultáneamente el gen *bla*<sub>oxa-1</sub>.
- Se ha observado un alto porcentaje de resistencia a quinolonas en las enterobacterias productoras de BLEE.
- Se reporta una alta prevalencia de PMQR con un amplio predominio de *aac(6')-Ib-cr* (83,7%), seguida en mucha menor medida de las *qnrB* (5,94%) y de los genes codificantes de bombas de eflujo como *qepA* (5,94%) y *oqxAB*.
- El presente estudio constituye el primer reporte de *qepA1*, *qnrB1*, *qnrB19* y *aac(6')-Ib-cr* en aislamientos recuperados de infecciones clínicas de Cochabamba, Bolivia.

- Este es el primer reporte de las bombas de eflujo oqxAB en Bolivia y uno de los primeros reportes en Latinoamérica.

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

---

- 1) PRATS G, *Microbiología Médica*. Buenos Aires-Madrid: Panamericana, 2005. 369p.
- 2) JAWETZ, Melnick Y Adelberg, *Microbiología Médica*. 25 ed: Mc Graw Hill, 2001. 813p.
- 3) MURRAY P, *Microbiología Médica*. Madrid-España. 5ta ed: Elsevier, 2006. 967p.
- 4) MELANO, CORSO, PETRONI, CENTRON, ORMAN, PEREIRA, MORENO, GALAS.M. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. 52:36-42
- 5) KONEMAN E, *Diagnóstico Microbiológico*. Madrid-España. 6ta ed: Médica Panamericana, 2008. 1691 p.
- 6) CUÉ M, MOREJON M, Antibacterianos de acción sistémica. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 1998; 14(4):347-61
- 7) FORBES, *Diagnóstico microbiológico*. 12 ed. Madrid, España: Panamericana. 2009. 1160p.
- 8) SUAREZ C, Antibióticos betalactámicos, *Elsevier*, Vol 27, N°2, 2009
- 9) Resistencia a los antimicrobianos,  
[En línea] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. Mayo 2013. [Consulta: 18-09-2014]
- 10) LLOP A, *Microbiología y parasitología médica*, La Habana-Cuba. Ciencias médicas. 2001. 549 p.
- 11) GOMEZ, GIL, CASTILLO, RUBIO. *Impacto de los inhibidores de beta-lactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes*. En: *Betalactamasas: su importancia para el clínico*. Madrid: Smith Kline&French S.A.E., 1992.109-127.
- 12) BUSH, JACOBY, MADEIROS. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995. 39:121.
- 13) GUTKIND G, DI CONZA J, POWER P, RADICE M.  $\beta$ -lactamase-mediated Resistance: A Biochemical, epidemiological and genetic overview. *Current Pharmaceutical Design*. 2013. Vol 19. 45: 164-208.
- 14) BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev*. 2001.14:933-951
- 15) SOUGAKOFF W, The TEM-3  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *Microbiology letters*. 1988. vol. 5.3:343–348
- 16) CHAVES et al, SHV-1  $\beta$ -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae* *Antimicrob Agents Chemother*. Oct 2001. 45(10): 2856–2861
- 17) CANTON, GONZALES, GALAN. CTX-M enzymes: origin and diffusion, *Frontiers in Microbiology*. 2012. 3:110
- 18) BAUERNFEIND A. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*. 1992. 20, 158–16310.1007
- 19) ZHAO, ZHI-QING HU. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2013; 39(1):79-101.
- 20) PHILIPPON, ARLET, JACOBY. Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(1): 1-11.
- 21) PEREZ-PEREZ, HANSON. Detection of plasmid-Mediated AmpC B-lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2002. p. 2153-2162.
- 22) PATON, REEVES. Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. *Clin Microbiol Rev*, 1988. 36(2):193-228.

- 23) MARTINDALE. *Guía completa de consulta fármaco terapéutica*. Pharma Editores 1º Ed. 2003.
- 24) HAWKEY P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemother*; 2003. 51, Suppl. S1, 29–35
- 25) DRLICA K, ZHAO X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology*; 1997. 61, 377–392.
- 26) RODRIGUEZ et al, Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*. 2011. 17:149–182
- 27) RUIZ J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. 51:1109-17.
- 28) GONZÁLES CABEZA J. Clonación del gen *uvrB*, operon *Moa* y requerimientos del complejo *UvrABC* durante la mutagénesis por quinolonas en cepas de *Salmonella typhimurium* ( $\Delta$ *uvrB* y  $\Delta$ *moaA-E*) [En línea]  
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rmv/v04n1/pdf/a02v4n1.pdf>; 2007. [Consulta: 21-09-2014]
- 29) STRAHILEVITZ, JACOBY, HOOPER, ROBICSEK. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev*; 2009. 22(4): 664–689.
- 30) CATTOIR, POIREL, NORDMANN. Plasmid-mediated Quinolone Resistance Pump *QepA2* in an *Escherichia coli* Isolate from France. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2008. 3801-3804 Vol 53, N°10
- 30) GEORGE A. et al, *qnrB*, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006. 50(4): 1178–1182.
- 31) WANG et al. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC* *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. May 2009. 53(5): 1892–1897
- 32) CAVACO, HASMAN, XIA, AARESTRUP. *qnrD*, a Novel Gene Conferring Trasferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53(2): 603-608.
- 33) GUILLARD T. et al, Mobile Insertion Cassette Elements Found in Small Non-transmissible Plasmids in *Porteeae* May Explain *qnrD* Mobilization, *PloS One*, 2014; 9(2)
- 34) PALLECCHI et al. Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase Genes in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin-America. *Antimicrob Agents Chemother*. Aug 2007. 51(8): 2720–2725.
- 35) PALLECCHI et al, High Prevalence of *qnr* Genes in Commensal Enterobacteria from Healthy Children in Peru and Bolivia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(6): 2632-2635.
- 36) BARTOLONI et al. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin Microbiol Infect*. 2013. 19 (4):356-61.
- 37) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement* CLSI document M-100-S24. Clinical and Laboratory Standars Institute, 940 Est Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsykvania, 19087 USA 2011.
- 38) FAMIGLIETTI et al. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Revista argentina de microbiología*. v.37 n.1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 2005. 1851-7617.
- 39) BIRNBOIM HC. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979. 7(6): 1513-23.
- 40) VERSALOVIC, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. Dec 25, 1991; 19(24): 6823-6831



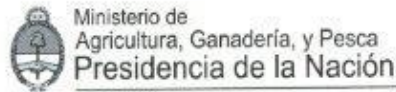
- 41) CLERMONT O, BONACORSI S, BINGEN E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000. 66(10): 4555-8.
- 42) ROBICSEK et al, Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*. Vol 12, n°1, enero 2006.
- 43) PEÑARANDA I. Uso racional de antibióticos. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. 2011 V.50 n°3.
- 44) CARVAJAR N et al, Epidemiología y Sensibilidad Antimicrobiana de Infecciones Urinarias en Pacientes del Hospital Viedma, Enero 2008-Agosto 2009. *Revista Científica Ciencia Médica*. 2010. V.13 N°1.
- 45) SANCHEZ MERINO J. Evolución de la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Arch. Esp. Urol*. [En línea] 2008, vol.61, n.7, pp. 776-780 [Consulta: 21-09-2014].
- 46) BARRIGA G. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de 1200 microorganismos gram negativos causales de infecciones de vías urinarias. *Enf inf microbiol*; 2008 28 (3): 90-98.
- 47) LUJAN ROCA D. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos aislados en infección del tracto urinario. *Revista de la facultad de Medicina*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2008. Vol 51, No 005.
- 48) CASELLAS JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública*. 2011; 30(6):519-28.
- 49) European comtte on Antimicrobial Susceptibility Testing, breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014.
- 50) SADER H. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica ¿Cómo estamos? *Revista chilena de infectología*. 2002. V19 supl.
- 51) MOREJÓN M. Betalactamasas de Espectro Extendido. Un problema actual. [Enlínea][http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/b1\\_betalactamasas\\_de\\_espectro\\_extendido.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/b1_betalactamasas_de_espectro_extendido.pdf) [Consulta: 21-09-2014].
- 52) HAWKEY PM, JONES AM. The changing epidemiology of resistance. *J. antimicrob Chemother*; 2009; 64 Suppl 1:i3-10. doi: 10.1093/jac/dkp256.
- 53) JOHNSON et al. Molecular Epidemiological Analysis of Escherichia coli Sequence Type ST131 (O25:H4) and blaCTX-M-15 among Extended-Spectrum-  $\beta$ -Lactamase-Producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother*; 2012, 56(5):2364.
- 54) HEE PARK et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in the community and hospital in Korea: emergence of ST131 producing CTX-M-15. *Infect Dis*. 2012; 12:149.
- 55) JACOBY. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1): 161-182.
- 56) ANDRES P. et al. Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria With Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(6):2467-2475.
- 57) RINCON G et al. First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump QepA in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014. Vol 79, Issue 1, p 70-72.
- 58) SILVA-SÁNCHEZ et al. Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. *PLoS One*. 2012; 8(10): e77968.

- 59) RINCON et al, Characterization of Three Clinical isolates of *Escherichia coli* Carrying *oqxAB* Genes. ICAAC 2014 (C-1431)
- 60) ALBORNOZ et al, First Report of *oqxAB* in Clinical *Escherichia coli* from Argentina. ICAAC 2014 (POC-001)
- 61) SILVA-SÁNCHEZ J, et al. Prevalence and characterization of plasmid-mediated-quinolone resistance genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Mexico. *Microb Drug Resist.* 2011. 17(4): 497-505.
- 62) ELGORRIAGA-ISLAS et al. Prevalencia del determinante de resistencia plasmídica a quinolonas *aac(6')-Ib-cr* en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diez hospitales de Chile. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(8):466–468.
- 63) RINCON G, et al. Prevalence of Plasmid Mediated Quinolone Resistance Determinants among ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Lima, Perú ICAAC 2014. C2-1124.
- 64) PAIVA M, et al. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2012, Vol. 107 N° 5.
- 65) RINCON G et al, Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108(7): 924-927.
- 66) ALBORNOZ, et al. Prevalence of Plasmid Mediated Quinolone Resistance Mechanisms (PMQR) in Argentina. [En línea] <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/Prevalence-of-Plasmid-Mediated-Quinolone-Resistance-Mechanisms-PMQR-in-Argentina.pdf> [Consulta: 01-10-2014].
- 67) CATTOIR V, et al. ISEcp1-mediated transposition of *qnrB-like* gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8): 2929-32.
- 68) VIANA AL, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *J. Med. Microbiol.* 2013. 62(Pt9): 1326-31.

# ANEXOS

Anexo #1

"2013 – Año del Bicentenario de la Asamblea General Constituyente de 1813"



ORIGINAL para SENASA

NOTA CIP N° 0159/2013

Ref. Memo CIP N° 079/13 – TRI-S05:0029734/2013 BUENOS AIRES, 18 de marzo de 2013

Con referencia la siguiente importación:

Producto: Genotipos de bacteria E. Coli en caldo infusión cerebro corazón contenidas en tubos Eppendorf de 1,8 mL
Procedencia: Cochabamba, Bolivia
Usuario Final: Bioquímica Farmacéutica Paola Mariel Saba Villarroel – Laboratorio de Investigación en la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA

tengo el agrado de comunicarle que según lo informado por la Coordinación de A.P.A.C. de la Dirección de Laboratorio Animal del SENASA, no existen inconvenientes para autorizarla de acuerdo a la información presentada y los fines de uso declarados, debiendo dar cumplimiento a los términos del Dictamen DCA N° 01/2004:

- Transporte. El solicitante de estos productos dejará constancia sobre las condiciones de su embalaje y transporte desde el país exportador hasta su destino final, que aseguren el resguardo de potenciales pérdida o derrames que perjudiquen el medio externo.
• Garantías, trazabilidad y desvío de uso. El solicitante deberá garantizar ante el SENASA el cumplimiento de las exigencias documentales y operativas de toda la cadena de producción y posterior utilización del medio de cultivo o insumo uso "in vitro", que permitan asegurar su trazabilidad e imposibilidad de desvío de uso.
• Destrucción. El solicitante deberá garantizar que, una vez utilizados los medios de cultivo uso "in vitro" o el insumo de uso "in vitro" o para uso "in vitro" y/o sus residuos o excedentes no empleados, serán sometidos a un método de destrucción aprobado por la Autoridad Competente que asegure las pautas de bioseguridad sin dar utilización posterior de ningún tipo a los mismos.
• Constancia Documental. El solicitante deberá dejar constancia documental del tratamiento otorgado a los residuos o material restante.
• Identificación. El material a ingresar debe estar debidamente empaquetado e identificado para su transporte como material biológico.
• Información Aportada. Tiene carácter de declaración jurada la información aportada por el solicitante en el actuado documental/expediente.

Por lo tanto, se autoriza el ingreso del material solicitado con la sola presentación de esta nota y la intervención del personal de SENASA destacado en el puesto de frontera correspondiente. La muestra será ingresada por la Sra. SABA VILLARROEL (DNI 94.760.775).

La presente tiene treinta (30) días corridos de validez a partir de su fecha de emisión.

Sin otro particular, saludo a Ud. muy atte.

A la Bioquímica - Farmacéutica Sra. Paola Mariela SABA VILLARROEL

MARI EUGENIA CERASALE MEDICA VETERINARIA COORDINADORA DE PRODUCTOS SENASA

Stamp from the General Border and Customs Coordination, containing text: COORDINACION GENERAL DE FRONTERAS, BARRERAS, TRAFICO FEDERAL Y REGISTRO. SE AUTORIZA AUTICIPAR VIA FAX LA PRESENTE DOCUMENTACION. FECHA: 18/03/2013. Includes a signature and a vertical stamp: FIRMA: SABA VILLARROEL DEBIENDO PRESENTAR EN EL PUESTO DE FRONTERA DE INGRESO...