

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL, HIGIENE Y SANIDAD AMBIENTAL.

DISTRIBUCION DE LAS RESISTENCIAS DE ORIGEN PLASMIDICO A ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS EN ENTEROBACTERIAS.

A. Mariscal Larrubia, M. Espigares García, J. A. Pérez López, A. Cueto Espinar y D. Jurado Chacón.

RESUMEN

Se estudia la presencia de β -lactamasas en las enterobacterias que se aislan en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Granada. Se detectaron tres tipos de enzimas, TEM (71,72 %), SHV (12,04 %) y OXA (16,23 %), cuyas proporciones relativas coinciden con las obtenidas por otros autores. El interés epidemiológico de la detección de β -lactamasas se discute en el último apartado de este trabajo.

SUMMARY

Enterobacteriaceas strains isolated in the Microbiology Department of the University Hospital in Granada (Spain) containing β -lactamases determined by plasmids R were studied. Three types of these enzymes, TEM (71,72 %), SHV (12,04 %) and OXA (16,23 %), has been identified and their relatives percentages were similar to the other workers. Epidemiological interest of the β -lactamases clasifications are discussed in the last part o this article.

INTRODUCCION

La determinación de los mecanismos bioquímicos de la resistencia bacteriana a los antibióticos proporciona datos mucho más objetivos sobre el estado de las resistencias que los aportados por el antibiograma (1). Además, la movilidad del material genético, plásmidos, transposones e incluso del ADN cromosómico, hacen necesario buscar nuevos métodos en el estudio de las resistencias que proporcionen un mayor interés clínico y utilidad con fines epidemiológicos (2 y 3).

En este trabajo se analiza la presencia de β -lactamasas de origen plasmídico en una muestra representativa de las enterobacterias aisladas en el Hospital Universitario de Granada. La identificación de las β -lactamasas presentes en estas cepas proporciona no solamente un dato de interés clínico al predecir un mayor número de resistencias que el antibiograma, sino que permite además conocer más estrechamente los mecanismos responsables del mantenimiento de las resistencias en nuestro hospital.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos. Sobre un conjunto de 695 cepas de enterobacterias aisladas durante el período de nuestro estudio, se seleccionaron 177 por presentar resistencia a antibióticos en el cual se incluyeran al menos la resistencia a algún β -lactámico. El período de estudio fue de un año y las cepas estudiadas se recogieron un único día de cada semana en el intervalo citado. Se pretendía de esta forma que la muestra elegida de manera aleatoria fuera representativa de la población de enterobacterias existentes en nuestro estudio.

Sensibilidad a antibióticos. El patrón de resistencias de cada cepa se determinó por el método del antibiograma disco-placa utilizando agar Mueller-Hinton (Oxoid) y un inóculo de 10^7 - 10^8 ufc/ml (4). Los discos de antibióticos utilizados procedentes de la firma BBL fueron los siguientes: ampicilina, carbenicilina, cefaloridina, cefalotina, cefamandol, cefoxitina, cloxacilina y meticilina.

Técnicas genéticas. La determinación del origen genético de las resistencias a β -lactámicos se efectuó en primera instancia mediante transferencia del material genético por conjugación de cada una de las cepas aisladas con la cepa receptora *Escherichia coli* K12 J62 *nal*. En caso de no obtenerse conjugantes, esta transferencia de material genético se efectuó mediante transformación, aislando el ADN plasmídico según se ha descrito previamente (5) y utilizando como cepa receptora *Escherichia coli* HB101. Las técnicas de conjugación y transformación se realizaron siguiendo métodos ya descritos (6). Los antibióticos utilizados en el aislamiento de transconjugantes y transformantes en las placas selectoras fueron: ampicilina (30 μ g/ml), Carbenicilina (125 μ g/ml), cefalosporina C (30 μ g/ml) y cefamandol (10 μ g/ml), obtenidos de Sigma. En la conjugación se añadió además a cada placa selectora ácido nalidíxico (250 μ g/ml) de Sterwing Española.

Técnicas enzimáticas. La identificación de las β -lactamasas presentes en las cepas resistentes se realizó a partir de extractos celulares utilizando una técnica biológica basada en la utilización de diversos inhibidores de β -lactamasas, concretamente p-cloromercuribenzoato 0,5 mM, C1Na 100 mM y Cloxacilina 0,1 mM. (7). Para la obtención de los extractos celulares se utilizó un Sonicator Cell Disruptor W-375 a 100 W en impulsos de 50 % de segundo durante 4,5 minutos.

RESULTADOS

En la tabla I se indica la totalidad de microorganismos aislados en nuestro período de estudio. De las 695 aislados, 177 cepas (25,46 %) presentaron resistencia a algún antibiótico de tipo β -lactámico. Como se indica en la tabla II, la distribución de estas resistencias fue de 171 (96,61 %) cepas resistentes a algún tipo de penicilinas y 39 (22,03 %) resistentes a alguna de las celalosporinas ensayadas, si bien 33 de estas fueron resistentes simultáneamente a penicilinas. La presencia de β -lactamasas determinadas por plásmidos se detectó en 163 cepas de las 177 aisladas resistentes a β -lactámicos. El tipo de enzima y el número de cepas en que se identificaron, bien de forma individual o con más de una enzima por cepa se expresa en la tabla III. La β -lactamasa más frecuente fue del tipo TEM detectadas en 137 cepas, enzimas de tipo OXA se presentaron en 31 cepas y de tipo SHV en 23. La distribución de β -lactamasas según el microorganismo de origen se indica en la tabla IV así como por porcentajes relativos de cada uno de ellos.

TABLA I.

Microorganismos aislados

Especie	cepas	%
<i>E. coli</i>	264	37,9
<i>K. pneumoniae</i>	113	16,3
<i>P. mirabilis</i>	92	13,2
<i>E. cloacae</i>	33	4,7
<i>S. marcescens</i>	32	4,6
<i>Salmonella</i> sp.	28	4,0
<i>E. aerogenes</i>	25	3,6
<i>Shigella</i> sp.	19	2,7
<i>Citrobacter</i> sp.	18	2,6
<i>M. morganii</i>	18	2,6
<i>P. rettgeri</i>	13	1,9
<i>E. alkalescens</i>	12	1,7
<i>P. vulgaris</i>	12	1,7
<i>E. coli</i> intermedio	11	1,6
<i>K. oxytoca</i>	5	0,7
TOTAL	695	

TABLA II

Microorganismos resistentes a β -lactámicos

Microorganismo	Cepas resistentes a ¹		
	Penicilinas	Cefalosporinas	ambos
<i>Escherichia</i>	92	0	8
<i>Klebsiella</i>	20	2	4
<i>Shigella</i>	10	0	0
<i>Salmonella</i>	7	0	0
<i>Proteus</i>	4	1	2
<i>Citrobacter</i>	2	0	1
<i>Serratia</i>	2	0	10
<i>Enterobacter</i>	1	3	8

¹ Se indica el número de cepas resistentes a algún antibiótico de los grupos citados o a ambos grupos.

TABLA III

 β - lactamasas determinadas por plásmidos

β - lactamasas	N.º de cepas	%
TEM	114	69,94
SHV	18	11,04
OXA	3	1,84
TEM y OXA	23	14,11
SHV y OXA	5	3,07
TOTAL	163	

DISCUSION

La muestra de microorganismos analizada fue representativa tanto en número como en distribución por especies del período de tiempo en que se realizó este estudio en nuestro hospital. El aislamiento, identificación y antibiograma de cada microorganismo se realizó según el protocolo seguido en el Servicio de Microbiología de dicho centro dependiendo de cada tipo de muestra. En la detección del origen genético de las resistencias, la transferencia mediante transformación únicamente hubo que realizarla con 22 cepas de las que no

se habían obtenido transconjugantes resistentes a β -lactámicos. De estas 22 cepas se obtuvieron transformantes con estas resistencias en 8 casos no pudiéndose asociar en las restantes dichas resistencias con la presencia de plásmidos. Los resultados de la transferencia fueron no obstante superiores a los obtenidos por Mitsuhashi (8) también con microorganismos de origen clínico.

TABLA IV

Origen y distribución de las β -lactamasas codificadas por plásmidos

Microorganismo	cepas	Tipo de β -lactamasa					
		TEM		SHV		OXA	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%
<i>Escherichia</i>	98	92	93,1	6	6,1	3	3,1
<i>Klebsiella</i>	24	10	41,6	14	58,3	5	20,8
<i>Enterobacter</i>	10	9	90	0		7	70
<i>Proteus</i>	5	3	60	2	40	4	80
<i>Salmonella</i>	7	7	100	0		0	
<i>Shigella</i>	3	3	100	0		0	
<i>Serratia</i>	13	12	92,3	0		11	84,6
<i>Citrobacter</i>	3	1	33,3	1	33,3	1	33,3

Nota: Los porcentajes están hechos con relación al total de cepas de cada género que presentaron β -lactamasas de origen plasmídico.

El método biológico seguido para la identificación de las β -lactamasas basado en reacciones de inhibición mediante 3 sustratos solamente resulta aplicable con enzimas de origen plasmídico y una vez que los plásmidos responsables se transfieren, como en nuestro estudio, a cepas bien conocidas genotípicamente y caracterizadas por no producir ningún tipo de β -lactamasas de tipo cromosómico o plasmídico. Se utilizó esta técnica en lugar de otras más específicas (9) debido a su simplicidad y facilidad de evaluación de gran número de muestras. No requiere material costoso ni sofisticado, puede realizarse por personal no especializado y permite diferenciar las β -lactamasas de origen plasmídico en aquellos grupos de enzimas caracterizados por su afinidad de sustratos y con un interés clínico común para la política de antibióticos de un centro hospitalario (10).

Entre los microorganismos aislados (695) indicados en la tabla I se detectó resistencia a β -lactámicos en 177 cepas según se demuestra en la tabla II. Como puede observarse la mayor proporción de resistencias fue sobre todo a

antibióticos del tipo de las penicilinas (165 cepas) de las cuales 33 fueron además resistentes a cefalosporinas. Solamente 6 cepas fueron resistentes únicamente a cefalosporinas. La utilización indiscriminada de antibióticos como la ampicilina tanto en el medio intra como extrahospitalario puede explicarnos el mantenimiento de las resistencias a penicilinas en un nivel tan alto, en comparación con las restricciones que se aplican sobre el segundo tipo de antibióticos citados en nuestro medio.

De los 177 microorganismos citados en 163 se detectó la presencia de plásmidos de resistencia a β -lactámicos mediante su transferencia a la cepa receptora respectiva según se tratase de la conjugación o transformación. Como se desprende de la tabla III, se detectaron 31 cepas con enzimas de tipo OXA responsables de las resistencias a cefalosporinas principalmente y 160 enzimas de los tipos TEM y SHV que hidrolizan con una mayor tasa antibióticos del tipo de las penicilinas. En 5 cepas resistentes a penicilinas y en 9 a cefalosporinas, estas resistencias no se pudieron asociar con la presencia de plásmidos con las técnicas empleadas, conjugación y transformación, y aunque esta posibilidad no puede descartarse, los indicios apuntan hacia otros mecanismos de resistencia posiblemente de origen cromosómico (11).

Al analizar la distribución de las β -lactamasas según el microorganismo de origen, podemos apreciar la desigual distribución contraria a la gran movilidad de los genéticos responsables. Esta tendencia de determinadas β -lactamasas por localizarse en especies bacterianas concretas tienen igualmente un gran valor epidemiológico y nos induce a pensar en la implicación en dicha distribución de componentes genéticos, posiblemente relacionados con la incompatibilidad de plásmidos o de transferencia de material genético (12). En cuanto a la proporción de los diferentes enzimas por géneros bacterianos, la observada en nuestro estudio resulta similar a la detectada por otros autores en diferentes partes del mundo, indicando una gran homogeneidad en su distribución a nivel mundial (13 y 14).

En resumen, la incidencia de plásmidos de resistencia a β -lactámicos presenta unos valores bastante altos en nuestro hospital, lo cual puede explicarnos las dificultades observadas cuando a través de la política de antibióticos en nuestro hospital, se ha pretendido disminuir el nivel de estas resistencias mediante la racionalización del uso de estos antibióticos. La erradicación de estas resistencias únicamente se podrá acometer cuando se comprendan los factores que permiten su mantenimiento. Creemos que la epidemiología basada en los mecanismos genéticos de las resistencias y los factores responsables de su proliferación es el mejor método que puede proporcionarnos datos suficientes para el control de este grave problema clínico.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CASEWELL, M. W. Recent advances infection 2. Churchill Livingstone. Londres (1982).
- (2) NOONE, P. y SHAFI, M. S. J. Clin. Pathol. 26, 140 (1973).
- (3) EICKHOFF, T. C. Hospital infection. Little Brown and Co. Boston (1979).
- (4) BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. and TURCK, M. Am. J. Clin. Pathol. 45, 493 (1966).
- (5) ECKHARDT, T. Plasmid. 1, 584 (1978).
- (6) DAVIES, R. W.; BOTSTEIN, D. y ROTH, J. R. Advanced Bacterial genetics. Cold Spring Harbor. New York (1980).
- (7) MARISCAL, L., A.; ESPIGARES, G., M., PEREZ, L., J. A.; PIEDROLA, A., G. y GALVEZ, V., R. Laboratorio. 75, 721 (1983).
- (8) MITSUHASHI, S. Plasmids, Medical and Theoretical Aspects. AVICENUM. Czechoslovak Medical Press. Prague (1977).
- (9) NEU, H. C. Antibiotics in Laboratory Medicine, 2.^a ed. Williams and Wilkins, Baltimore. U.S.A. (1986).
- (10) NAVASHIN, M. y FOMINA, I. Plasmids, Medical and Theoretical Aspects. AVICENUM. Czechoslovak Medical Press, Prague (1977).
- (11) BRYAN, L. E. Plasmids and Transposons. Academic Press. New York. (1980).
- (12) JACOBY, G. A. and SUTTON, L. Antimicrob. Agents and Chemother. 16, 243 (1979).
- (13) MATTHEW, M. Antimicrob. and Chemother. 5, 349 (1979).
- (14) PETROCHEILOU, V. D. Chemioterapia. 4, N.º 2, 23 (1985).