Clonación y caracterización de los genes que codifican las b-lactamasas TEM-1 y SHV-5, aislados en cepas de Klebsiella pneumoniae *provenientes de neonatos con septicemia nosocomial*

✉ María Araque, Beatriz Nieves, Elsa Velazco, Zoila Caldera

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. 5101-A, Venezuela. Fax: (58-74) 403156

RESUMEN

Se estudiaron 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae* con un patrón inusual de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y al aztreonam. Estas cepas se aislaron de pacientes neonatos con septicemia nosocomial recluidos en el Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela. Además de la resistencia a los β–lactámicos, los aislados clínicos también fueron resistentes a gentamicina, kanamicina, tetraciclina y cloramfenicol, pero permanecieron susceptibles a las cefamicinas y al imipenem. Mediante conjugación, se pudo transferir todos los marcadores de resistencia a células de *Escherichia coli* MKD135 y, posterior al tratamiento con naranja de acridina, se observó que se perdían estos marcadores. El análisis de los transconjugantes por isoelectroenfoque, permitió detectar la actividad de dos β–lactamasas: una de punto isoeléctrico (pI) 5,4 y otra de pI 8,2. Los genes que codifican ambas enzimas fueron localizados en un plásmido autotransferible de 87 kpb (pNU147). Los ensayos de hibridación, clonación y secuenciación demostraron que el gen bla_{TEM-1}, que codifica la β–lactamasa TEM-1, se encuentra en un fragmento *Eco*RI de 6 kpb proveniente del plásmido pNU147. En otro fragmento *Eco*RI de 3 kpb del mismo plásmido, se localizó el determinante que media la producción de una β–lactamasa de espectro extenso (βLEE) de tipo SHV-5. Este estudio confirma que el determinante de la βLEE de tipo SHV-5, el de la β–lactamasa TEM-1 y los genes que confieren resistencia a otros antibióticos no relacionados, son transportados por un plásmido conjugativo (pNU147) capaz de diseminarse entre cepas de *K. pneumoniae* de origen nosocomial.

Palabras claves: β– lactamasa de espectro extenso, β–lactamasa SHV-5, β–lactamasa TEM-1, *Klebsiella pneumoniae*, septicemia nosocomial

Biotecnología Aplicada 2000;17:94-98

ABSTRACT

Cloning and Characterization of Genes Encoding TEM-1 and SHV-5 b-Lactamases Isolated in *Klebsiella pneumoniae* Strains From Neonates With Nosocomial Septicemia. Twelve *Klebsiella pneumoniae* strains with an unusual pattern of resistance to broad-spectrum cephalosporins and to aztreonam were studied, isolated from neonates with nosocomial septicemia at the in patient facilities of Los Andes University Hospital, Mérida, Venezuela. These strains were also resistant to gentamicin, kanamycin, tetracycline and chloramphenicol, but remained susceptible to cefoxitin and imipenem. All resistance determinants were transferable to *Escherichia coli* MKD135 by conjugation and were lost en bloc after treatment with acridine orange. All transconjugants showed the activity of two β–lactamases: one at an isoelectric point (pI) of 5.4 and another at a pI close to 8.2. Genes encoding both enzymes are located on the single, self-transferable 87-kpb plasmid pNU147. Hybridization, cloning and sequencing revealed that one 6-kpb EcoRI fragment of pNU147 carries the gene bla_{TEM-1} encoding the TEM-1 β–lactamase. Another 3-kpb *Eco*RI fragment of this plasmid showed a bla_{SHV}-type gene encoding the SHV-5 β–lactamase. This study confirms that extended-spectrum-β–lactamase (ESβL) determinants of the SHV-type —TEM-1 β–lactamase— and the genes enconding resistance to other unrelated antibiotics are carried by a conjugative plasmid (pNU147) capable of spreading itself among nosocomial isolates of *K. pneumoniae*.

Keywords: extended-spectrum β–lactamase, *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial septicemia, SHV-5 β–lactamase, TEM-1 β–lactamase

*I*ntroducción

En las últimas décadas, la resistencia bacteriana a los antibióticos β–lactámicos ha aumentado notablemente [1]. La causa de este incremento ha sido la aparición y diseminación de β–lactamasas de espectro extenso (βLEE) que hidrolizan, además de los clásicos β–lactámicos, las cefalosporinas de tercera generación y los monobactámicos [2]. Estas enzimas son el resultado de mutaciones en los genes estructurales de las β–lactamasas clásicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 [1, 2]. En 1983, Knothe y colaboradores [3] describieron, por primera vez, la transferencia de los determinantes de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro entre cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*. Este nuevo fenotipo de resistencia se debe a la producción de una βLEE de tipo SHV-2. Posteriormente, en 1985, se describió en Francia el primer brote epidémico de cepas de *K. pneumoniae* productoras de βLEE [4]. Desde entonces, se han reportado numerosos brotes causados por organismos productores de βLEE en muchas partes del mundo [1]. Actualmente, entre 10% y 30% de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas en Europa son productoras de βLEE de tipo TEM

✉ Autor de correspondencia

© Elfos Scientiae 2000

1. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generations of β-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997;24 (Suppl 1):19–45.

2. Livermore DM. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557–84.

3. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983;11:315–7.

o del grupo SHV [2]. En este sentido, es de vital importancia la detección de la producción de βLEE en aislados clínicos, no sólo para indicar la antibióticoterapia adecuada a los pacientes infectados con este tipo de cepas, sino también para mantener estos determinantes de resistencia bajo vigilancia epidemiológica [5].

En este estudio, se describe la caracterización genética de un plásmido conjugativo que media la producción de dos β–lactamasas, TEM-1 y SHV-5, y que fue aislado durante un brote epidémico de *K. pneumoniae* resistente a ceftazidima en una unidad de terapia intensiva neonatal.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Durante un brote epidémico que se produjo entre noviembre de 1997 y marzo de 1998 en la Unidad de Terapia Intensiva Neonatal del Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela, se aislaron 12 cepas de *K. pneumoniae* con un patrón inusual de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam (monobactámico). Estas cepas fueron recobradas de muestras de sangre de neonatos con septicemia nosocomial e identificadas a través de métodos estandarizados [6]. En la Tabla 1, se resumen las características de las bacterias estudiadas, así como de otras cepas bacterianas y otros plásmidos utilizados en este estudio.

Tabla 1. Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos utilizados en este estudio.

Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos	Características	Origen o referencia
E. coli		
ATCC25922	Cepa control para pruebas de susceptibidad	ATCC
MKD135	F^-, RIF^r. Receptora para conjugaciones	7
DH5α	Utilizada para electrotransformaciones	Gibco-BRL, E.U.A.
DH5α(pBR322)	4,36 kpb, (TEM-1, pI 5,4), control para IEF	Colecc. Microb.
DH5α(pBC147/6)	Clon recombinante productor de TEM-1	Este estudio
DH5α(pBC147/3)	Clon recombinante productor de SHV-5	Este estudio
K. pneumoniae		
22ULA	SHV-1; pI 7,6; control para IEF	Colecc. Microb.
27ULA	SHV-5; pI 8,2; control para IEF	Colecc. Microb.
NU002	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU026	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU045	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU086	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU129	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU135	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU147	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU261	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU451	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU1291	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU1352	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
NU1472	βLEE, GTM^r KAN^r TET^r CLF^r	Este estudio
Plásmidos		
pNU147	87 kpb, TEM-1, SHV-5, $GTM^rKAN^rTET^rCLF^r$	Este estudio
pBC-SK	3,4 kpb. Vector para ensayos de clonación	Stratagene E.U.A.
Fago		
λ digerido *Hind*III	Marcador de peso molecular	Sigma E.U.A.

βLEE, β-lactamasa de espectro extenso; pI, punto isoeléctrico; IEF, isoelectroenfoque; RIF^r, resistencia a la rifampicina; AMP^r, resistencia a la ampicillina; GTM^r, resistencia a la gentamicina; KAN^r, resistencia a la kanamicina; TET^r, resistencia a la tetraciclina; CLF^r, resistencia al cloramfenicol; ATCC, American Type Culture Collection; Colecc. Microb., cepas de la colección del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, Venezuela.

Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó por el método de dilución en agar, de acuerdo con las recomendaciones del Comité Nacional de Procedimientos de Laboratorios Clínicos (del inglés, National Committee for Clinical Laboratory Standards, PAIS) [8]. Los antibióticos empleados fueron: cefotaxima (Hoechst Roussel, Somerville, E.U.A.), ceftazidima (Glaxo Group Research Ltd., Greenford, Reino Unido), ácido clavulánico (Beechman, Bristol, E.U.A.), amoxicilina, cefoxitin e imipenem (Merck, Rahway, E.U.A.), aztreonam (Bristol-Myers Squibb, Princenton, E.U.A.), ampicilina, cefalotina, rifampicina, cloramfenicol, tetraciclina, gentamicina y kanamicina (Sigma, St. Louis, E.U.A). La detección inicial de βLEE se realizó mediante la prueba de sinergismo del doble disco (SDD) descrita por Jarlier y colaboradores [9].

Ensayos de conjugación y "curado" de plásmidos

Los ensayos de conjugación se llevaron a cabo en medio sólido de acuerdo con la técnica descrita por Willets [10]. Se utilizaron cultivos en fase exponencial mezclados con la cepa receptora *E. coli* MKD135 en una proporción 1:10. Los transconjugantes fueron seleccionados en medio de Mueller Hinton (Difco, E.U.A.) suplido con ceftazidima 50 μg/mL y rifampicina 400 μg/mL. Los marcadores de resistencia se eliminaron con naranja de acridina según el método descrito por Miller [11].

Detección de β–lactamasas por isoelectroenfoque

Estos ensayos se realizaron en geles de poliacrilamida que contenían anfolitos con rango de pH 3-10 (Pharmacia), de acuerdo con el método de Matthew y colaboradores [12]. El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en un equipo LKB 2117 MultiphorII (Pharmacia, Suecia)en las siguientes condiciones: 30 W; 1 500 V; 30 mA; durante 4 h a 4 ºC. Para detectar la actividad enzimática, se colocó sobre el gel un papel de filtro saturado con una solución de nitrocefina (Glaxo Group Research Ltd., Greenford, Reino Unido) a 0,25 mM.

Técnicas de ADN recombinante

Los procedimientos básicos de ADN recombinante se realizaron de acuerdo con Sambrook y colaboradores [13]. Los plásmidos se aislaron por el método de lisis alcalina [14], se separaron por electroforesis en geles de agarosa 0,6% y se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 μg/mL. Todos los geles se observaron en una cámara con transiluminación UV y se fotografiaron con película Polaroid tipo 667. El peso molecular de los plásmidos aislados se estimó mediante el programa Gel Analysis Software (Scanalytics Inc., Lincoln, E.U.A.). Las hibridaciones de Southern blot se realizaron con el empleo de sondas de ADN marcadas con ^{32}P mediante la técnica de cebadores al azar o *random priming*. Las sondas específicas de bla_{TEM} y bla_{SHV} se amplificaron inicialmente a través de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), con los cebadores conocidos para bla_{TEM-1} [15] y bla_{SHV-1} [16], respectivamente. La endonucleasa *Eco*RI se utilizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (Boehringer Mannheim, Alemania).

4. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, *et al*. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β-lactamase. J Antimicrob Chemother 1987;20:223–34.

5. Livermore DM. β-Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1998; 41 (Suppl D):25–41.

6. Farmer III JJ. *Enterobacteriaceae:* introduction and identification. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology, Washington: ASM PRESS; 1995, p 438–49.

7. Kholodii GYa, Mindlin SZ, Bass IA, Yurieva, OV, Minakhina SV, Nikiforov VG. Four genes, two ends, and a *res* region are involved in transposition of Tn*5053*: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integron. Mol Microbiol 1995;17: 1189–200.

8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997; NCCLS Document M7-A4.

9. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae:* hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988;10:867–78.

Secuenciación del ADN

Las secuencias de ADN se determinaron para ambas cadenas según el método de terminación descrito por Messing y colaboradores [17] y el protocolo del estuche de reactivos Thermosequenase Cycle Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Estos ensayos se realizaron en un secuenciador automático de ADN (Modelo 400, LI-COR Inc.). Los cebadores se marcaron con IRD-800 (MWG-Biotech, München, Alemania).

Resultados

Análisis fenotípico de cepas de *K. pneumoniae* de origen nosocomial

Las 12 cepas de *K. pneumoniae* mostraron perfiles de susceptibilidad compatibles con la producción de βLEE (datos no mostrados). Los rangos inhibitorios de la ceftazidima sobre las cepas estudiadas, fueron de 2 a 4 veces mayores que la CIM del cefotaxime (32 a 128 μg/mL). Sin embargo, en todos los casos se restituyó la susceptibilidad a la ceftazidima y se alcanzaron rangos inhibitorios $\leq$ 0,5 μg/mL cuando se empleó el ácido clavulánico a una concentración de 2 μg/mL. La prueba de SDD fue consistente con los resultados obtenidos con la CIM. Además de la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, se pudo detectar que las cepas de *K. pneumoniae* presentaban resistencia asociada a la kanamicina, la gentamicina, la tetraciclina y el cloramfenicol. Sin embargo, permanecieron susceptibles al cefoxitin y al imipenem, y mostraron concentraciones inhibitorias $\leq$ 2 μg/mL.

Transferencia conjugativa de los marcadores de resistencia

Los genes que confirieron la resistencia a los antibióticos β–lactámicos fueron transferidos por conjugación a células receptoras de *E. coli* MKD135, con una frecuencia aproximada de 10^4 transconjugantes por célula donante. Los transconjugantes mostraron un patrón de resistencia semejante al que obtuvieron inicialmente las células donantes. Los determinantes de resistencia a los aminoglucósidos, las tetraciclinas y el cloramfenicol, siempre fueron cotransferidos con la βLEE. La prueba de SDD fue positiva en todos los transconjugantes. El análisis de los extractos crudos de los transconjugantes por IEF, reveló el mismo perfil de actividad enzimática en todos los casos al evidenciarse dos bandas, una con pI 5,4 y otra con pI 8,2 (Tabla 2). Estos resultados sugieren que se transfirieron por conjugación dos determinantes diferentes de β–lactamasas.

Análisis del perfil plasmídico

Los plásmidos extraídos de las cepas de *K. pneumoniae* —y de sus correspondientes transconjugantes—, mostraron el mismo perfil plasmídico (Figura 1). De la misma forma, se pudo observar que los patrones de restricción obtenidos fueron indistinguibles entre los plásmidos aislados luego de la digestión con *Eco*RI (Figura 2A). El peso molecular de los plásmidos se estimó en 87 kpb. El curado de plásmidos con naranja de acridina permitió eliminar todos los marcadores de resistencia en conjunto, lo que indicó que la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, así como

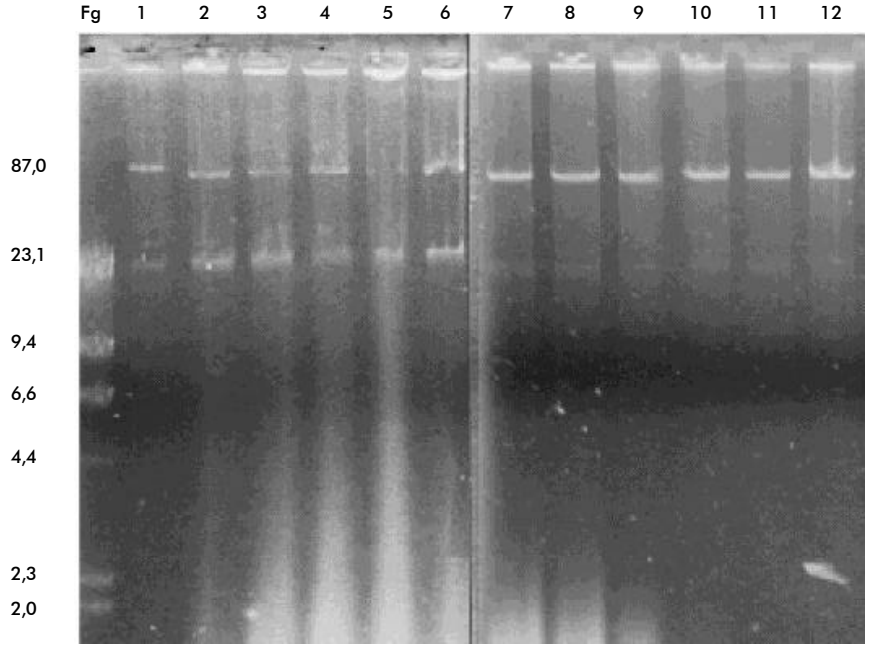

Figura 1. Electroforesis de ADN plasmídico aislado de cepas representantes de *K. pneumoniae* y de sus correspondientes transconjugantes. Carrilera Fg, ADN del bacteriófago λ digerido con *Hind*III; carrileras 1-6, plásmidos aislados de la cepas NU002, NU045, NU129, NU147, NU451 y NU1352, en ese orden; carrileras 7-12, plásmidos aislados de los transconjugantes MKD 002-C, MKD045-C, MKD129-C, MKD147-C, MKD451-C y MKD 1352-C, en ese orden. A la izquierda se muestran las tallas de los plásmidos en kpb.

Tabla 2. Perfil de susceptibilidad (CIM) de transconjugantes de *E. coli* MKD135 a la cefalotina y a las cefalosporinas de espectro extenso. Detección de βLEE y marcadores de resistencia cotransferidos.

Transconjugantes de *E. coli* MKD135	CIM (μg/mL)						Marcadores de resistencia cotransferidos
	CFL	CFX	CAZ	CAZ+CL	SDD	pI	
MKD002-C	> 256	128	> 256	0,5	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD026-C	> 256	64	> 256	0,5	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD045-C	> 256	128	> 256	1	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD086-C	> 256	64	> 256	0,25	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD129-C	> 256	128	> 256	0,5	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD135-C	> 256	64	> 256	0,5	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD147-C	> 256	64	> 256	0,5	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD261-C	> 256	64	> 256	0,25	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD451-C	> 256	128	> 256	1	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD1291-C	> 256	128	> 256	1	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD1352-C	> 256	64	> 256	0,25	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF
MKD1472-C	> 256	64	> 256	0,5	+	5,4; 8,2	GTM-KAN-TET-CLF

CIM, concentración inhibitoria mínima; CFL, cefalotina; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CL, ácido clavulánico; GTM, gentamicina; KAN, kanamicina; TET, tetraciclina; CLF, cloramfenicol; SDD, prueba del sinergismo de doble disco; pI, punto isoeléctrico.

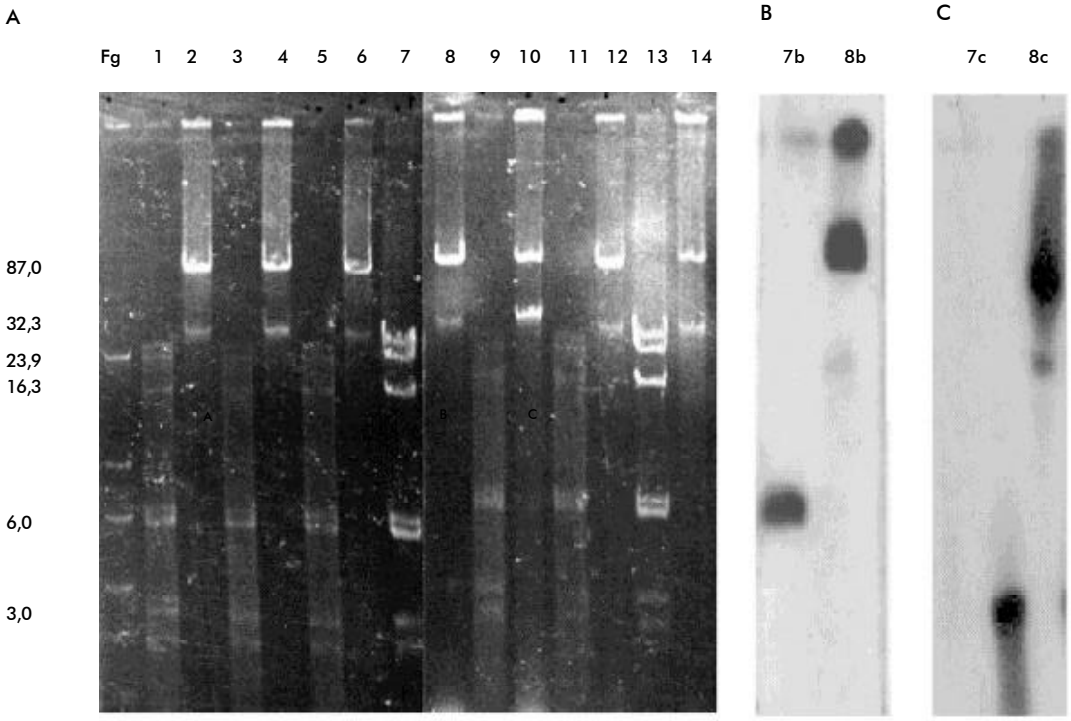

Figura 2. A) Patrones de restricción *Eco*RI de plásmidos provenientes de transconjugantes seleccionados. Carrilera Fg, ADN del bacteriófago λ digerido con *Hind*III; carrileras impares, plásmidos digeridos pNU002, pNU045, pNU129, pNU147, pNU451, pNU1352 y pNU1472, en ese orden; carrileras pares, los mismos plásmidos sin digerir. Southern blot realizado con las sondas TEM-1 (B) y SHV-1 (C) del plásmido pNU147 digerido (carrileras 7b y 7c) y sin digerir (carrileras 8b y 8c). A la izquierda se muestran las tallas de los fragmentos de ADN en kpb.

al aztreonam, la gentamicina, la kanamicina, la tetraciclina y el cloramfenicol, es transportada por un mismo plásmido conjugativo.

Hibridación de Southern blot

La utilización de sondas específicas para la detección de β–lactamasas (TEM-1 y SHV-1) en plásmidos digeridos con *Eco*RI y sin digerir, permitió evidenciar que un fragmento *Eco*RI de 3 kpb presentaba secuencias relacionadas con la sonda bla_{SHV-1}, mientras que la señal de hibridación obtenida con la sonda TEM-1 observó indistinguiblemente sobre dos fragmentos *Eco*RI con longitudes de 6 kpb aproximadamente. En consecuencia, estos dos fragmentos fueron aislados y purificados de forma separada y, posteriormente, sometidos a una segunda hibridación con la sonda TEM-1. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que la banda superior más cercana a 6 kpb y la sonda bla_{TEM-1}, tenían secuencias homólogas (Figura 2B, C).

Caracterización genética del determinante βLEE

El plásmido pNU147 de la cepa NU147 fue seleccionado como representante del grupo para la caracterización del determinante βLEE. Con este propósito, se clonaron en el vector pBC-SK los fragmentos *Eco*RI del pNU147 que dieron una señal positiva en las pruebas de hibridación para las dos β–lactamasas diferentes. Estos ensayos produjeron los siguientes plásmidos recombinantes: pBC-147/6, que contiene el fragmento *Eco*RI de 6 kpb portador del alelo bla_{TEM}, y pBC-147/3, que posee el fragmento *Eco*RI de 3 kpb portador del alelo bla_{SHV}. Posteriormente, a los clones recombinantes se les determinó el fenotipo de resistencia a los antibióticos β–lactámicos (Tabla 3). *E. coli* DH5α [pBC-147/6] fue resistente a la ampicilina, la amoxicilina y el cefalotin, y continuó siendo sensible a las cefalosporinas de segunda y tercera generaciones, así como al imipenem y al aztreonam. El análisis de estos clones recombinantes por IEF, permitió detectar la presencia de una β–lactamasa de pI 5,4. Por otro lado, el clon *E. coli* DH5α [pBC-147/3] mostró un perfil fenotípico compatible con la producción de βLEE de pI 8,2. La

10. Willets N. Conjugation. Methods Microbiol 1984;17:33–59.

11. Miller J. Experiments in molecular genetic. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972.

12. Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88:169–78.

13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Tabla 3. Patrón de susceptibilidad (CIM) de los clones recombinantes de *E. coli* DH5α [pBC147/6] y DH5α [pBC147/3] a los antibióticos β-lactámicos.

Antibióticos	CIM (μg/mL)		
	DH5α [pBC-SK]ª	DH5α [pBC147/6]	DH5α [pBC147/3]
Ampicilina	1	> 256	> 256
Amoxicilina	1	> 256	> 256
Cefalotina	0,5	> 256	> 256
Cefoxitin	1	1	1
Cefotaxima	0,125	2	64
Ceftazidima	0,125	1	> 256
Aztreonam	0,25	1	128
Imipenem	0,125	0,25	0,5
CAZ+CL	0,125	0,5	2
Otras características			
Prueba SDD	Negativa	Negativa	Positiva
pI	ND	5,4	8,2

CAZ, ceftazidima; CL, ácido clavulámico; pI, punto isoeléctrico; ªCepa utilizada como control; ND; no determinado.

secuenciación del alelo bla_{TEM} transportado por el plásmido pBC-147/6, no mostró diferencias con la secuencia del alelo bla_{TEM-1} [14]. Del mismo modo, la secuencia del alelo bla_{SHV} transportado en el plásmido pBC-147/3 demostró ser idéntica a la de bla_{SHV-5} [18].

Discusión

Los microorganismos productores de βLEE se han convertido en un grave problema para muchos hospitales, especialmente cuando está involucrado un plásmido común que media la resistencia a múltiples antibióticos [1, 5] en la transmisión nosocomial. Otros reportes han confirmado que estos organismos multirresistentes aumentan la morbilidad y la mortalidad significativamente en pacientes de alto riesgo, en particular los neonatos [19]. Las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a las cefalosporinas de espectro extenso que se analizaron en este estudio, fueron aisladas consecutivamente de hemocultivos provenientes de neonatos con diagnóstico de septicemia nosocomial. Cuando se realizaron las pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, se observó que todos los aislados mostraban un perfil de sensibilidad compatible con la producción de una βLEE. La restitución de la sensibilidad de estas bacterias a la ceftazidima se observó con ácido clavulánico 2 µg/mL, para concentraciones inhibitorias $\leq$ 0,5 µg/mL. Por otra parte, la detección de βLEE mediante los ensayos de SDD, permitieron confirmar que todas las cepas de *K. pneumoniae* aisladas producían una βLEE clase A perteneciente al grupo 2be de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros [20].

En todos los aislados se pudo comprobar que los determinantes para la βLEE, así como los de resistencia a la gentamicina, la kanamicina, la tetraciclina y el cloramfenicol, estaban codificados en un plásmido autotransferible de 87 kpb (pNU147). El fenómeno de la multirresistencia en cepas productoras de βLEE, parece ser una característica común en especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* [1, 2]. En este sentido, se ha confirmado que las βLEE son codificadas por genes que se encuentran localizados en plásmidos grandes y, por lo general, estos plásmidos son asiento para la inserción de otros genes de resistencia [2, 5].

La caracterización genética y molecular del pNU147 mediante los estudios de hibridación, clonación y secuenciación, reveló que un fragmento *Eco*RI de 3 kpb transporta el gen bla_{SHV} que codifica una βLEE de tipo SHV-5. De forma interesante, se encontró un gen que codifica otra β–lactamasa, la TEM-1, en un fragmento *Eco*RI de 6 kpb del mismo. Aunque se han reportado aislados clínicos de *Enterobacteriaceae* productores de más de un tipo de β–lactamasa del grupo TEM [21], no se ha descrito la presencia simultánea de genes que codifiquen una β–lactamasa de tipo TEM y otra del grupo SHV en un mismo plásmido autotransferible.

La evolución de los genes que median la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y al aztreonam en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, está directamente relacionada con el uso de los antibióticos y con la aparición de brotes o epidemias en áreas específicas del ambiente hospitalario, entre otros factores [1]. Al respecto, es importante señalar que en un estudio previo [22] realizado en el Hospital Universitario de Los Andes, se identificaron 44 bacilos gramnegativos multirresistentes de origen nosocomial, de los cuales se aisló un plásmido autotransferible de 54 kpb responsable de la resistencia a la gentamicina, y que codifica una β–lactamasa de tipo TEM-1. Poco tiempo después, en otro estudio [23] se identificaron diversas enterobacterias con múltiples marcadores de resistencia, incluidos los de las cefalosporinas de tercera generación, provenientes de pacientes con infección nosocomial recluidos en el mismo hospital. Es posible que el plásmido de 54 kpb identificado previamente y el de 87 kpb caracterizado en este estudio (pNU147) estén relacionados genéticamente, y que su aislamiento en eventos diferentes sea consecuencia del uso intenso de determinados antibióticos. En este sentido, se debe tener en cuenta que los genes que median la producción de la β–lactamasa TEM-1 y algunos de los que codifican las βLEE son transponibles, fenómeno que desempeña un papel importante en la evolución de los plásmidos de multirresistencia [24]. Sirot y colaboradores comprobaron que elementos transponibles fueron los responsables de transferir varios determinantes de resistencia entre dos plásmidos conjugativos, incluido el de las βLEE. Por otro lado, Heritage y colaboradores afirman que el aumento de la diseminación de la resistencia a los antibióticos β–lactámicos de amplio espectro se debe al surgimiento de nuevos transposones que codifican βLEE en plásmidos que circulan en áreas hospitalarias donde el uso de estos antibióticos es intenso.

En conclusión, este estudio confirma que circula un plásmido epidémico en la Unidad de Terapia Intensiva Neonatal del Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela. La utilización de técnicas de ADN recombinante permitió identificar que este plásmido conjugativo de 87 kpb, pNU147, transporta los determinantes que median la producción de una βLEE de tipo SHV-5 y una β–lactamasa de tipo TEM-1, además de otros genes que confieren resistencia a la gentamicina, la kanamicina, la tetraciclina y el cloramfenicol. Por consiguiente, es necesario mantener estas cepas bajo vigilancia epidemiológica y establecer nuevas políticas que aseguren el uso adecuado de los antibióticos en esta institución. No obstante, el conocimiento de los factores moleculares y genéticos involucrados en la generación de resistencia, así como de los elementos que favorecen la transmisión genética de esta información, son puntos claves para implementar estrategias futuras que ayuden a combatir los microorganismos emergentes con resistencia a los agentes antimicrobianos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT), a través de los proyectos FA192-96-07-AA y FA193-96-07-C.

Recibido en septiembre de 1999. Aprobado en enero del 2000.

14. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145:1365–73.

15. Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proc Natl Acad Sci USA 1978;75:3737–41.

16. Barthélémy M, Péduzzi J, Labia R. Complete amino acid sequence of p453-plasmid-mediated PIT-2 β-lactamase (SHV-1). Biochem J 1988;25:73–9.

17. Messing J, Crea R, Seeburg PH. A system for shotgun DNA sequencing. Nucl Acids Res 1981;9:309–21.

18. Billot-Klein D, Gutmann L, Collatz E. Nucleotide sequence of the SHV-5 β-lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:2439–41.

19. Hart CA. *Klebsiellae* and neonates. J Hosp Infect 1993;23:83–96.

20. Bush K, Jacoby GA, Medeiros A. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39: 1211–33.

21. Mabilat C, Courvalin P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:2210–6.

22. Araque M, Nieves B, Ruíz O, Dagert M. Caracterización de plásmidos que median la resistencia a múltiples antibióticos en bacterias gramnegativas de origen nosocomial. Enferm Infecc Microbiol Clin 1997;15:299–305.

23. Araque M, Velazco E. *In vitro* activity of fleroxacin against multiresistant gram-negative bacilli isolated from patients with nosocomial infections. Intensive Care Med 1998;24:839–44.

24. Sirot D, De Champs C, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, *et al.* Translocation of antibiotic resistance determinants including and extended-spectrum β-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1576–81.

25. Heritage J, Hawkey P, Todd N, Lewis I. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:1981–6.