

XIX ENCUENTRO DE JOVENES INVESTIGADORES
14 y 15 de Octubre de 2015, Santa Fe, Argentina.

Caracterización de mecanismos involucrados en la resistencia a Cefalosporinas de Tercera Generación en aislamientos clínicos de *Salmonella* entérica no Typhi aisladas en Santa Fe en el año 2014.

Chuard, Daniela Victoria^{1*}

¹Pasante. Laboratorio de Microbiología General. Estudiante de Bioquímica.
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral.
daniela_chuard@hotmail.com

Área temática: Ciencias biológicas.
Sub-área: Bioquímica.

INTRODUCCIÓN

La *Salmonellosis* es una de las principales causas de infecciones alimentarias en el hombre a nivel mundial. Estas bacterias forman parte de la microbiota intestinal de algunos animales, particularmente bovinos y aves de corral. La infección es adquirida al consumir alimentos de origen animal y a través de la contaminación fecal de agua y alimentos.

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* son causantes de gastroenteritis, mientras que otros más invasivos son capaces de provocar infecciones sistémicas como la fiebre entérica (*S.* serotipo Typhi). En casos de pacientes con infección invasiva, enfermedades subyacentes o inmunosupresión, resulta esencial el tratamiento antimicrobiano (Colobatiu, L. y col., 2015).

Una de las alternativas antibióticas más utilizadas para estos casos son las Cefalosporinas de Tercera Generación (CTG). Estos antibióticos pertenecen a la familia de los β -lactámicos y representan el grupo de drogas antimicrobianas más utilizado en la práctica médica para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas ya que poseen una elevada toxicidad selectiva (Frère, J.M. y col., 1992). Tan pronto como estas drogas comenzaron a emplearse, se detectaron los primeros aislamientos resistentes a ellas. En la actualidad, la producción de β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos en bacilos gram negativos. Dentro de las β -lactamasas que son capaces de hidrolizar las CTG se encuentran las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Cantón, R. y col., 2012) y las enzimas tipo AmpC plasmídicas (AmpCp) (Jacoby, G., 2009).

La creciente prevalencia de bacterias multiresistentes a antibióticos y la emergencia de aislamientos portadores de BLEE generan un serio problema en el ámbito de la salud pública.

OBJETIVOS

- Determinar la frecuencia de serotipos de *Salmonella* prevalentes.
- Evaluar la prevalencia de aislamientos resistentes a CTG aisladas de muestras clínicas provenientes de la ciudad de Santa Fe y su zona de influencia.
- Caracterizar, por métodos fenotípicos y moleculares, los determinantes implicados en la resistencia a CTG.

METODOLOGIA

Se incluyeron en este estudio todos los aislamientos ($n = 52$) de *Salmonella entérica* no tifoidea recuperados durante el año 2014 por los distintos centros de salud y derivados al Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe, que forma parte de la Red de Laboratorios de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria.

La confirmación de las especies bacterianas se realizó mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas convencionales.

Los aislamientos fueron conservados por congelamiento a -20°C y -80°C empleando como agente crioprotector glicerol a una concentración del 10-15 %. Dicha conservación se efectuó sobre cultivos en etapa exponencial de crecimiento en medios de cultivo adecuados para el desarrollo de esta bacteria.

La serotipificación de los aislamientos se realizó de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White, utilizando sueros somáticos y flagelares provistos por el Instituto de Producción de Biológicos del INEI ANLIS Malbrán (Popoff, M. y col., 1996).

Se evaluó el perfil de sensibilidad a antibióticos mediante la técnica de difusión en agar siguiendo los lineamientos del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2015). Los antibióticos ensayados fueron ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (AMS), cefalotina (CTN), cefotaxima (CTX), cefoxitina (FOX), y cefepime (FEP).

La producción fenotípica de BLEE se puso en evidencia en los aislamientos con resistencia a CTG utilizando los pares de antibiótico/ antibiótico-inhibidor CAZ, CAZ/CLV y CTX, CTX/CLV, tal como lo establece el CLSI (CLSI, 2015).

Para la evaluación fenotípica de AmpC se buscó observar sinergia entre discos de ácido fenil-borónico (ABP) (300 μg) y CAZ o CTX, mediante la disposición estratégica de estos discos. El uso de ácido fenil-borónico ha sido propuesto en diferentes estudios (Pasteran, F. y col., 2009; Tsakris, A y col., 2009; Yagi, T. y col., 2005).

La caracterización genotípica de las β -lactamasas se llevó a cabo mediante ensayos de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) empleando *primers* específicos y condiciones de reacción adecuadas para los distintos marcadores de resistencia. Se evaluó la presencia de genes codificantes de las cefotaximasas (CTX-M) de los grupos 1, 2 y 9, y PER-2 dentro de las BLEE, y para AmpC plasmídicas se evaluó mediante PCR multiplex la presencia de los genes CMY, DHA, MOR. (Pérez-Pérez, F. y Hanson, N., 2002). Como molde se empleó el ADN total obtenido por la lisis del microorganismo por calentamiento.

Para determinar la relación clonal existente entre los aislamientos con sospecha de brote intrahospitalario, se remitieron estos aislamientos al Servicio Enterobacterias INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", donde se realizó el estudio de subtipificación molecular utilizando el protocolo estandarizado de electroforesis de campo pulsado (PFGE) para *Salmonella* de la Red PulseNet Internacional con la enzima *Xba*I.

RESULTADOS

Durante el año 2014 se recuperaron en el laboratorio central de la provincia de Santa Fe 52 aislamientos de *Salmonella entérica* no tifoidea. Todos los aislamientos fueron agentes causales de gastroenteritis. Entre los aislamientos recuperados se encontraron 14 de ellos con sospecha de brote intrahospitalario, ya que no solo provenían de la misma institución de salud, sino que también presentaban el mismo

perfil de resistencia. Mediante el protocolo estandarizado de Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE), para *Salmonella* de la Red PulseNet Internacional, se pudo establecer la relación génica entre estos aislamientos.

La distribución de serotipos encontrada fue 40/52 *S. entérica* serovar Typhimurium. El resto de los serotipos identificados fueron: *S. Newport* (4/52), *S. Enteritidis* (3/52), *S. Javiana* (2/52), *S. Agona* (1/52), *S. Infantis* (1/52), *S. Corvallis* (1/52) y *S. Give* (1/52). El serotipo correspondientes al brote intrahospitalario fue *S. entérica* serovar Typhimurium (14/40).

El perfil de sensibilidad a β -lactámicos mostró que 40/52 aislamientos fueron resistentes a AMP, entre ellos 30 fueron resistentes a AMS y 32 resistentes a CTN. A su vez, se observaron 31/52 aislamientos resistentes a CTX, de estos 27 fueron resistentes a FEP y 2 a FOX.

De los 31 aislamientos resistentes a CTG, 30 fueron caracterizados fenotípicamente como portadores de BLEE (14/31 pertenecientes al brote intrahospitalario), y 1 como portador de AmpC plásmidica.

Mediante ensayos de PCR se determinó que el principal mecanismo de resistencia a CTG en *Salmonella entérica* no typhi son las cefotaximasas donde sólo CTX-M del grupo 9 es el responsable de dicha resistencia. El 90% (28/31) de los aislamientos productores de BLEE corresponden a *S. entérica* serovariedad Typhimurium, el resto pertenecen a las serovariedades Javiana, Infantis y Newport (3% cada una).

En el aislamiento caracterizado como portadores de AmpC plasmídica se confirmó la presencia de CMY. El serotipo correspondiente a este aislamiento fue *S. entérica* serovariedad Typhimurium.

CONCLUSIONES

Salmonella entérica serovariedad Typhimurium fue el serotipo predominante tanto en el total de los aislamientos recuperados como en el total de aislamientos productores de BLEE. En todos los casos las cefotaximasas del grupo 9 (CTX-M-G9) son las responsables de esta característica fenotípica.

Si se tiene en cuenta que 14/52 aislamientos pertenecen a un brote intrahospitalario, y se considera a los 14 aislamientos como un mismo clon, el número total de aislamientos no relacionados se reduce a 39 y la cantidad de aislamientos con resistencia a CTG (a través de enzimas del grupo CTX-M-9) disminuye a 46%.

Uno de los 39 aislamientos (3%) fue caracterizado como productor de la β -lactamasa CMY, la enzima AmpC plasmídica de mayor distribución mundial.

La vigilancia de la resistencia en *Salmonella* spp. para la detección y caracterización de aislamientos resistentes emergentes en nuestra provincia permitirá alertar rápidamente a las autoridades de salud, aplicar medidas de contención adecuadas y proponer alternativas para controlar su diseminación.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C., 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(April), 110.

CLSI, 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement., CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Colobatiu, L., Tabaran, A., Flonta, M., Oniga, O., Mirel, S., & Mihaiu, M., 2015. First description of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and β -lactamase encoding genes in non-typhoidal Salmonella isolated from humans, one companion animal and food in Romania. *Gut Pathogens*, 7(1), 16.

Frère, J.M., Nguyen-Distéche, M., Coyette, J., 1992. Mode of action: interaction with the penicillin-binding-proteins. En: M. I. Page. (Ed.), *The Chemistry of β -lactams* (pp. 148197).

Jacoby, G., 2009. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–82

Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., Corso, A., 2009. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:1631-9.

Pérez-Pérez, F. J., & Hanson, N. D., 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 2153–2162. doi:10.1128/JCM.40.6.21

Popoff, M., Bockemuhl, J., Hickman-Brenner, F., 1996. Supplement 1995 (no. 39) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 147:765-9.

Tsakris, A., Poulou, A., Themeli-Digalaki, K., Voulgari, E., Pittaras, T., Sofianou, D., Pournaras, S., Petropoulou, D., 2009. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:3420-6.

Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., Doi, Y., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Arakawa, Y., 2005. Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(6), 2551–2558.