

Presencia de CTX-M-14 en distintas serovariedades de *Salmonella entérica* no Thypi

Chuard, Daniela Victoria^{1*}

¹*Cientibecaria. 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

Las bacterias del género *Salmonella* son agentes productores de zoonosis, de amplia distribución en el mundo. En el hombre la infección es usualmente adquirida al consumir alimentos de origen animal y a través de la contaminación fecal de agua y alimentos (Basualdo y col., 2006).

En la mayoría de los casos, *Salmonella* es causante de gastroenteritis, en otros es capaz de provocar infecciones sistémicas, resultando esencial el tratamiento antimicrobiano (Colobatiu y col., 2015). Una alternativa antibiótica muy utilizada son las Cefalosporinas de Tercera Generación (CTG) (Frère y col., 1992).

La producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Cantón y col., 2012), y en menor medida las de tipo AmpC plasmídica (AmpCp) (Jacoby, 2009), es el principal mecanismo de resistencia a las CTG en enterobacterias.

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* (antibiograma), empleadas para predecir el comportamiento de los microorganismos frente a distintos antimicrobianos, pueden ser poco fiables, por lo tanto, pruebas adicionales suelen ser necesarias para detectar el/los mecanismos de resistencia involucrados, ya sean de índole fenotípico o molecular a fin de que los informes de sensibilidad puedan ser fidedignos y proteger la seguridad del paciente (Thomson, 2010).

El conocimiento de los mecanismos de resistencia a antibióticos en *Salmonella* permitirá optimizar los recursos terapéuticos, alertar rápidamente sobre su emergencia y aplicar medidas de contención adecuadas y proponer alternativas para controlar su diseminación.

OBJETIVOS

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

METODOLOGIA

Se incluyeron en este estudio todos los aislamientos 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.

Los aislamientos fueron conservados por congelamiento a -20°C y -80°C empleando como agente crioprotector glicerol a una concentración del 10-15 %.

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

La serotipificación de los aislamientos se llevó a cabo 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 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), cefotaxima (CTX), cefoxitina (FOX), cefalotina (CTN), 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 ceftazidima (CAZ) CAZ/ácido clavulánico (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 fenilborónico (ABP) (300 μg) (Pasteran y col., 2009; Tsakris y col., 2009; Yagi y col., 2005), y CAZ o CTX, mediante la disposición estratégica de estos discos.

La caracterización genotípica de las β -lactamasas se llevó a cabo mediante ensayos de PCR. 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 se evaluó mediante PCR multiplex la presencia de los genes CMY, DHA, MOX (Pérez-Pérez y col., 2002). Como molde se empleó el ADN total obtenido por la lisis del microorganismo por calentamiento. Los productos obtenidos mediante amplificaciones por PCR se purificaron utilizando el *kit* comercial *AccuPrep purification kit* (Bionner Corporation, Korea). Posteriormente los fragmentos de ADN purificados fueron derivados a *MacroGen* para determinar la secuencia nucleotídica. Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el servidor *BLAST*, provisto por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, NIH, Md, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) y con el software *CLUSTALW2* disponible *on line* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Para la determinación de 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 XbaI (Van Belkum y col., 2007; Goering y col., 2004).

Además para establecer la relación epidemiológica entre los aislamientos de *Salmonella* no pertenecientes al mismo brote intrahospitalario, pero que presentaban idéntico perfil de resistencia a antibióticos se emplearon las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR (Fernández-Cuenca y col., 2004).

RESULTADOS

Se estudiaron 52 aislamientos de *Salmonella* provenientes de diferentes instituciones de salud de la provincia de Santa Fe, recolectados por el Laboratorio Central durante el año 2014. Todos los aislamientos fueron agentes causales de gastroenteritis.

Se tipificaron 40/52 aislamientos como *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).

Su perfil de sensibilidad a β -lactámicos mostró que 40/52 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.

Entre los 52 aislamientos recuperados durante el año 2014 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 sensibilidad. Mediante PFGE, se pudo establecer la relación génica entre estos aislamientos.

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

Mediante ensayos de PCR se determinó que el principal mecanismo de resistencia a CTG en *S. entérica* no typhi son las cefotaximasas donde CTX-M del grupo 9 es el responsable de dicha resistencia. El 90% (27/30) de los aislamientos productores de BLEE corresponden a *S. entérica* serovariedad Typhimurium, el resto pertenecen a otras serovariedades: *S. Javiana*, *S. Infantis* y *S. Newport* (3% cada una). Posteriormente, mediante el análisis de las secuencias se confirmó que la variante perteneciente al grupo 9 responsable de la producción de BLEE es CTX-M-14.

En el aislamiento caracterizado como portador de AmpCp (*S. entérica* serovariedad Typhimurium), se confirmó la presencia de CMY.

Mediante REP-PCR se pudo establecer la existencia de relación clonal entre todos los aislamientos de *S. Typhimurium* portadores de BLEE aislados durante el año 2014.

Es importante remarcar la exclusiva presencia de CTX-M-14 y la ausencia de otras BLEE tipo CTX-M que están ampliamente diseminadas como las variantes CTX-M-15 (Sennati y col., 2012) y CTX-M-2 (Bado y col., 2012) reportadas en Argentina y Sudamérica.

CONCLUSIONES

El 59% de los aislamientos de *S. entérica* recuperados en la provincia de Santa Fe fueron resistentes a CTG. Las BLEE fueron el principal mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos (97%). En todos los casos, las cefotaximasas CTX-M-14 fueron las responsables de esta característica fenotípica. Si bien *S. entérica* serovar Typhimurium fue el serotipo predominante portador de CTX-M-14 también se describió en otros serotipos menos frecuentes. Un aislamiento (3%) fue portador de AmpCp tipo CMY.

BIBLIOGRAFÍA

Bado, I., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N., 2012. First Human Isolate of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Harboring *bla*_{CTX-M-14} in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(4):2132-4.

Basualdo, J.; Coto, C.; de Torres, R., 2006. *Microbiología Biomédica*. Buenos Aires, Editorial Atlante. 324-327p.

Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C., 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(4):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.

Fernández-Cuenca, F., 2004. Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(6):355-60.

Frère, J.M., Nguyen-Distéche, M., Coyette, J., 1992. *The Chemistry of β -lactams* Ed. Page, Ml.148197p.

Goering, R., 2004. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Persing, D., Tenover, F., Versalovic, J., Tank, Y., Unger, B., Relman, D., White, T. (Eds.), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. ASM Press, Washington, D.C., 185-196 p.

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(6):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.

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

Sennati, S; Santella, G., Di Conza, J., Pallecchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., Rossolini, G., Radice, M., Gutkind, G., 2012. Changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(11):6003-5.

Thomson, K. S., 2010. Extended spectrum β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4):1019-25.

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-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11):3420-6.

Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fusing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectology*. 3:1–46.

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.