

## ***Escherichia coli* multidrogorresistente en Cuba: emergencia del clon pandémico ST 131**

Quiñones Pérez, Dianelys<sup>1</sup>  
Carmona Cartaya, Yenisel<sup>1</sup>  
Rivero Rivero, Mayrelis<sup>2</sup>  
Pereda Novales, Niurka<sup>1</sup>  
Zallas Illas, Arnaldo<sup>3</sup>  
Marrero Carralero, Deysi<sup>4</sup>  
Soe aung Meiji<sup>5</sup>  
Kobayashi, Nobumichi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), Dpto de Bacteriología-Micología, La Habana, Cuba. E mail: dia@ipk.sld.cu

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), Dpto de Bacteriología-Micología, La Habana, Cuba. E mail: yeniselc@ipk.sld.cu

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), Dpto de Bacteriología-Micología, La Habana, Cuba. E mail: niurkap@ipk.sld.cu

<sup>2</sup> Hospital Enrique Cabrera, Dpto de Microbiología, La Habana, Cuba. E mail: dia@ipk.sld.cu

<sup>3</sup> Hospital Juan Bruno Zayas, Dpto de Microbiología, Santiago de Cuba, Cuba. E mail: illas@hospclin.scu.sld.cu

<sup>4</sup> Hospital, Octavio de la Concepción y Pedraja, Dpto de Microbiología, Holguín, Cuba. E mail: deysimarr@gmail.com

Universidad Médica de Saporó, Dpto. de Higiene, Saporó, Japón. E mail: meijisoeaung@gmail.com

<sup>5</sup> Universidad Médica de Saporó, Dpto. de Higiene, Saporó, Japón. E mail: nkobayas@sapmed.ac.jp

Correo del autor principal: dia@ipk.sld.cu

### **Resumen**

**Introducción:** *Escherichia coli* (*E. coli*) es causa principal de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS) con elevada morbimortalidad. Su resistencia múltiple a los antimicrobianos es un desafío en la actualidad. **Objetivos:** Evaluar la resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de *E. coli*; determinar bases genéticas de la resistencia a betalactámicos y fluoroquinolonas y linajes clonales. **Materiales y métodos:** se desarrolló un estudio descriptivo en 204 aislados de *E. coli* procedentes de hospitales cubanos (2014-2016) en el LNR-IAAS del IPK. Se evaluó la susceptibilidad a 17 antimicrobianos y se determinaron los genes de resistencia *bla*, genes *qnr* y *aac (6)-Ib-cr* mediante PCR. Se determinaron secuencias multilocus (ST) en cepas multidrogorresistentes por secuenciación de ADN. **Resultados:** La resistencia a cefalosporinas fluctuó entre 41-64%. Se observó alta resistencia para quinolonas (47%-75%) y para trimetoprim/sulfametoxazol (51%). Entre el 14% y 37% de los aislados fue resistente a los aminoglucósidos. La mejor actividad in vitro se observó para la fosfomicina, colistina e imipenem (1- 2% de resistencia). Se detectó la producción de betalactamasa de espectro extendido en el 57% con predominio del genotipo CTX-M (70%) y dos NDM-1. La resistencia plasmídica a quinolonas obedeció a la enzima *aac (6)-Ib-cr* y las proteínas *qnr*. Cuatro aislados correspondieron a ST 131(clon pandémico) circulando en tres provincias del país. **Conclusiones:** Los carbapenémicos, la fosfomicina y colistina constituyen antibióticos eficaces frente a *E. coli*. Se notifica una emergencia de carbapanemasa NDM-1 en *E coli* con la circulación en Cuba del clon pandémico ST 131 constituyendo una alerta epidemiológica nacional. La resistencia plasmídica a fluoroquinolonas avizora un incremento marcado lo que demanda un uso más racional de estas.

**Palabras clave:** *Escherichia coli* extraintestinal, resistencia antimicrobiana, clon pandémico

## I. INTRODUCCIÓN

*E. coli* es la principal causa de infección extraintestinal por bacterias gramnegativas incluidas las infecciones del tracto urinario, infecciones en neonatos, meningitis, peritonitis y septicemias (1). Tradicionalmente los betalactámicos se utilizan en el tratamiento de las infecciones producidas por *E. coli*. Sin embargo, en los últimos años con el incremento en la prevalencia de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se afectó considerablemente su efectividad (2).

Por otra parte, la emergencia de resistencia a carbapenémicos, tratamiento de elección en las infecciones por aislados productores de BLEE, es una verdadera amenaza a la salud pública, pues conlleva al incremento en la mortalidad y limita las opciones de tratamiento efectivo para pacientes con infecciones graves por *E. coli* multirresistente (3).

De igual manera las fluoroquinolonas han sido imprescindibles en el tratamiento de las infecciones comunitarias por *E. coli* ante el incremento de la resistencia a la amoxicilina, amoxicilina clavulánico y trimetoprim-sulfametoazol. Sin embargo, en los últimos años, también, se observa un aumento importante de la resistencia a esta familia de antimicrobianos en enterobacterias. La resistencia a quinolonas es más frecuente en aislados con resistencia a betalactámicos por producción BLEE y más recientemente, por carbapenemasas (4). Esto está relacionado con la emergencia desde el 2008, del clon uropatógeno pandémico *E. coli* O25b:H4ST131 con amplia diseminación a diferentes regiones portando la enzima CTX-M, genes que median resistencia a fluoroquinolonas incluso para aminoglucósidos y cotrimoxazol. Este clon altamente patógeno ocasiona infecciones tanto en la comunidad como en los hospitales portando un gran número de genes de virulencia (5).

En Cuba, existen evidencias de una amplia diversidad genética de *E. coli* productora de BLEE en un hospital de la Habana (6), no obstante no se han informado estudios que incluyan aislados procedentes de varias provincias del país y por otra parte la resistencia a carbapenémicos no se ha documentado en este patógeno. Por tanto, se conduce la presente investigación con el objetivo de evaluar la resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de *E. coli* de diferentes provincias del país, determinar las bases genéticas de la resistencia a betalactámicos y fluoroquinolonas, así como determinar linajes clonales circulantes en Cuba.

## II. MÉTODO

**Aislamientos bacterianos.** Se estudiaron un total de 204 aislamientos clínicos no duplicados procedentes de 26 hospitales de 12 provincias del país, durante el período de enero de 2014 a diciembre de 2016. Los aislados fueron identificados mediante pruebas bioquímicas convencionales. Durante el estudio se utilizaron las siguientes cepas controles: *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 control positivo.

**Susceptibilidad antimicrobiana.** Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevaron a cabo mediante el método de difusión con discos y tiras de *E-test* y se interpretaron según los lineamientos para enterobacterias del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, siglas en inglés) (7). Se evaluaron los siguientes antimicrobianos betalactámicos: ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefotaxima (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) y cefoxitin (30 µg). También se evaluaron antibióticos no betalactámicos: amikacina (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacino (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), trimet-

hoprim/sulfamethoxazole (1,25 µg/23,75 µg), fosfomicina (200 µg). La susceptibilidad a colistina se determinó mediante tiras de E-test (0.016-256).

**Detección fenotípica de BLEE.** Se realizó en todos los aislamientos que mostraron resistencia al menos a una de las cefalosporinas de tercera, cuarta generación y el monobactam aztreonam y se utilizó el estuche comercial para la determinación de BLEE (Estuche comercial ESBL-AmpC SCREEN Kit, *Rosco Diagnóstica*, Dinamarca). Después 24 horas de incubación a 37 °C, un incremento en 5mm de la zona de inhibición entre la tableta de cefalosporina y la de cefalosporina que contiene el inhibidor de betalactamasas se interpretó como positivo de BLEE.

**Detección fenotípica de carbapenemasas.** Se realizó en todos los aislamientos que mostraron resistencia al menos uno de los carbapenémicos probados y se utilizó el estuche comercial para la determinación de carbapenemasas (KPC+MBL Confirm ID Kit, *Rosco Diagnóstica*, Dinamarca). Después 24 horas de incubación a 37 °C, un incremento en 5mm de la zona de inhibición entre la tableta de carbapenémicos y la de carbapenémicos que contiene el inhibidor de carbapenemasas dipicolínico se interpretó como positivo de metalobetalactamasa.

**Detección de genotipos de BLEE.** La presencia de los genes bla: blaTEM, blaSHV y blaCTX-M se determinó en todos los aislados de *E. coli* caracterizados fenotípicamente como positivos para BLEE. Para ello se desarrolló la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) múltiple y se usaron cebadores específicos según protocolos reportados previamente (8).

**Confirmación molecular y tipo genético de metalobetalactamasa en aislamientos clínicos de *E. coli*.** Se aplicó la técnica de PCR simple acorde al protocolo internacional descrito por Nordman y colaboradores (9) en todos los aislamientos positivos para la producción de este tipo de carbapenemasa por el método fenotípico para la búsqueda de NDM, VIM, IMP, SIM, GIM, SPM.

**Análisis de la secuenciación nucleotídica del gen *bla*<sub>NDM</sub>.** Para conocer la variante genética de NDM se llevó a cabo la secuenciación nucleotídica del gen *bla*<sub>NDM</sub> a partir de la secuenciación del producto de PCR amplificado usando BigDye Terminator version 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**Detección de la resistencia plasmídica a fluoroquinolonas.** Se aplicó la PCR para la detección de los genes *qnr*, gen *aac (6)-Ib-cr*, genes *oqxAB* y *qepA* usando cebadores específicos y condiciones de PCR según Ciesielczuk y colaboradores (10)

**Estudio de la estructura poblacional (detección de linajes genéticos) de *E. coli* multidrogorresistente mediante estudio de secuencias multilocus (MLST, siglas en inglés).** Se aplicó en 13 aislamientos siguiendo el esquema previamente publicado disponible en el sitio web [www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/E.coli.html](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/E.coli.html).

### III. RESULTADOS

Las *E coli* cracterizadas procedentes de 12 provincias del país se recuperaron, principalmente, de unidades de cuidados intensivos (27%) y consulta externa (21%) siendo causa con mayor frecuencia de infecciones del tracto urinario (46%), infecciones de herida quirúrgica (14%) y septicemias (12%). Esto ratifica la importancia de este patógeno no solo en el ámbito hospitalario sino también comunitario.

En la figura 1 se observa una elevada resistencia para la mayoría de las familias de antimicrobianos de importancia terapéutica en las infecciones por este patógeno. Es alarmante la resistencia detectada para las cefalosporinas entre 41-64% con excepción de la cefoxitina.

Los niveles de resistencia obtenidos para la gentamicina y tobramicina fueron de 37 y 34%, respectivamente. La amikacina fue la más efectiva con un 14% de aislamientos resistentes.

La resistencia a las quinolonas fue muy elevada con un 75% para el ácido nalidíxico y 72% para la ciprofloxacina lo que unido a la resistencia de un 49% para el cotrimoxazol lleva a reflexionar sobre alternativas terapéuticas para las infecciones, principalmente, del tracto urinario.

En el presente trabajo no se detectó ningún aislamiento de *E. coli* resistente a la colistina pero constituye una alarma el 9% de resistencia para el meropenem. Es de destacar la gran efectividad in vitro de la fosfomicina frente a la *E. coli*.

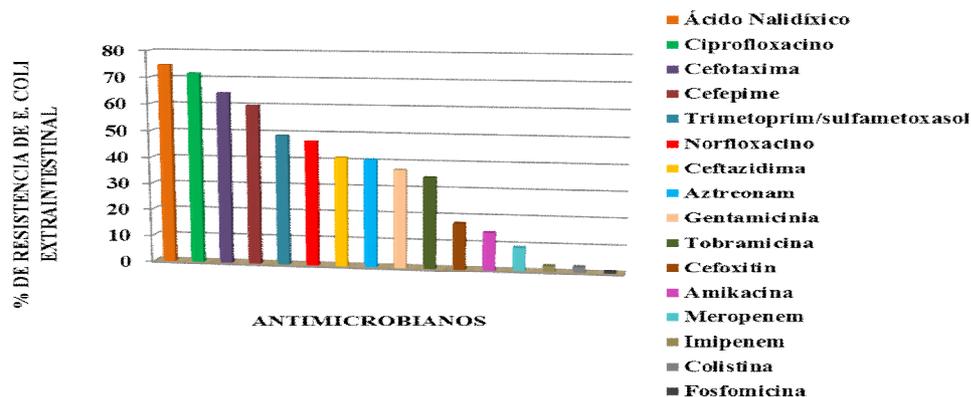


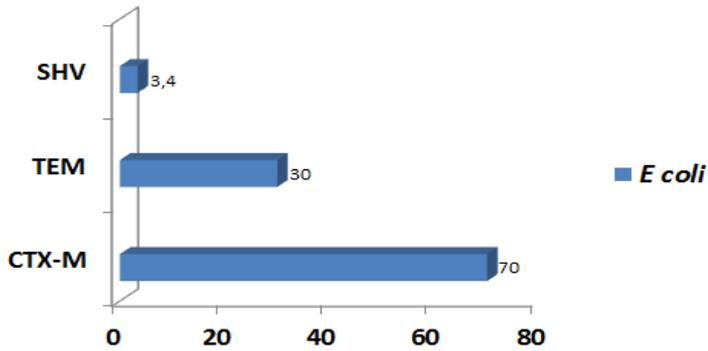
Figura.1: Resistencia a los antimicrobianos de los aislados *E. coli* extraintestinal. IPK, 2014-2016 (n=204)

**Tabla 1. Susceptibilidad a los antimicrobianos en los aislados *E. coli* extraintestinal según el tipo de muestra más frecuente. IPK, 2014-2016.**

Antimicrobiano	Urocultivo (n=94)	Herida quirúrgica (n=28)	Hemocultivo (n=24)
Ácido Nalidíxico	30	21	8
Ciprofloxacino	28	32	29
Cefotaxima	53	25	8
Cefepime	32	46	58
Trimetoprim/sulfametoxazol	48	57	46
Norfloxacino	57	57	42
Ceftazidima	84	36	33
Aztreonam	82	46	21
Gentamicina	68	46	54
Tobramicina	74	54	54
Cefoxitin	83	61	67
Amikacina	84	82	83
Meropenem	95	93	88
Imipenem	97	96	100
Colistina	97	100	100
Fosfomicina	100	96	100

Desde el descubrimiento de la primera BLEE en 1983, continuaron emergiendo nuevas enzimas capaces de hidrolizar un espectro más amplio de betalactámicos entre ellas, las carbapenemasas (6). La identificación de estos fenotipos es una prioridad en los laboratorios de microbiología clínica, ya que, su conocimiento contribuye en la elección del antibiótico más apropiado para el tratamiento de las infecciones y permite instaurar medidas adecuadas de aislamiento, que evitaría la dispersión del microorganismo entre pacientes, en el ambiente hospitalario y la comunidad.

Se detectó la producción de betalactamasa de espectro extendido en el 57% de los aislamientos. El porcentaje de detección de los determinantes genéticos codificantes de los diferentes tipos de BLEE fue: gen *bla*<sub>CTX-M</sub> (70%), gen *bla*<sub>TEM</sub> (30%) y el gen *bla*<sub>SHV</sub> (3,4%) (Figura 3). La coproducción de dos tipos de enzimas por un mismo aislamiento fue frecuente siendo mayor la asociación de CTX-M con TEM.

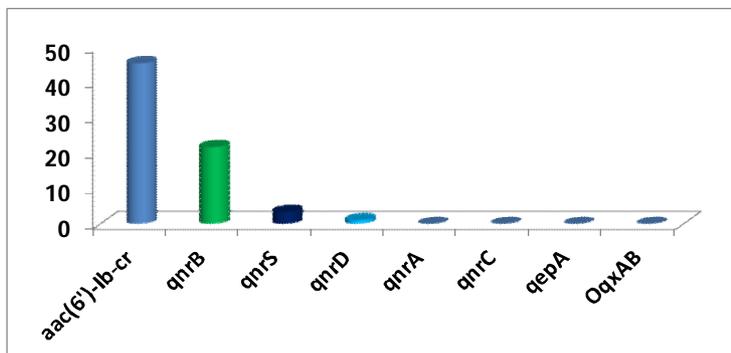


**Figura 3. Porcentaje de los determinantes genéticos de BLEE en los aislados *E. coli* extraintestinal. IPK, 2016 (n=204)**

En dos cepas resistentes a carbapenémicos se detectó la producción de la metalobetalctamasa tipo NDM-1 constituyendo el primer hallazgo en Cuba de esta enzima en el género *E. coli* desde que se notificara la circulación en Cuba en el 2012 en un *Acinetobacter soli*, especie inusual, que habita en suelos forestales y de la cual hay pocos reportes mundiales.

En relación a las fluoroquinolonas no existen marcadores fenotípicos para reconocer la resistencia plasmídica en esta familia de antimicrobianos por lo que su detección debe hacerse por métodos moleculares, no accesibles en los laboratorios de Microbiología. Por tanto el LNR-IAAS del IPK realiza los primeros estudios en Cuba sobre este mecanismo de resistencia mediado por plásmidos en aislamientos cubanos de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales.

En la figura 4 se observa el porcentaje de detección de los diferentes genes que codifican para la proteína Qnr, la enzima acetilasa y las bombas de expulsión donde se observa el mecanismo enzimático mediado por la enzima AAC (6')-Ib-cr, como el más frecuente seguida por la proteína Qnr, tipo B. También se detectó los Qnr S y D pero en baja proporción. No se encontró el mecanismo transferible de bombas de expulsión mediado por los genes qepA y OqxAB.



**Figura 4. Determinantes genético de la resistencia plasmídica a fluoroquinolonas en aislados clínicos de *E. coli* (n 174). IPK2014-2016**

Se notifica a las autoridades de salud y médicos de asistencia la resistencia plasmídica a fluoroquinolonas, por vez primera en Cuba, que avizora un incremento marcado de esta y se recomendó un uso más racional de las mismas. Esto ratifica el llamado de la OMS recientemente sobre evitar el uso de esta familia para rescatar su eficacia clínica. ([www.Resistenciantimicrobiana/OMS \\_ Uso de los antimicrobianos.htm](http://www.Resistenciantimicrobiana/OMS_Uso_de_los_antimicrobianos.htm)).

#### IV. CONCLUSIONES

- 1-Se evidencia a los carbapenémicos, colistina y fosfomicina como antibióticos eficaces en las infecciones extraintestinales por *E. coli*.
- 2-Se notifica una emergencia de carbapenemasa tipo NDM-1 en *E coli* con diseminación a la comunidad que pone en riesgo el escaso arsenal terapéutico que existe para las sepsis por bacilos gramnegativos en pacientes ingresados encareciendo aún más los costos en nuestro sistema y aumentando la morbilidad y mortalidad.
- 3-Se avala, científicamente, la resistencia plasmídica a fluoroquinolonas en Cuba lo que avizora un incremento marcado de esta lo que demanda un uso más racional de estas.

#### REFERENCIAS

1. Ananias M, Yano T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res* 2008;41(10):887-3.
2. Varela Y, Millán B, Araque M. Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud. *Biomédica* 2017;37:209-17.
3. Oliveros A, Uribe N, Sierrac P, Jaimes F, González J. Bacteriemia por enterobacterias resistentes a carbapenems. Un estudio transversal. *Infectio*. 2015;19(2):60-6.
4. Machuca J, Agüero J, Miró E, Conejo M, Oteob J, Boub G, et al. Prevalencia en España de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(8):485-90.
5. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. 2011. *Escherichia coli* O25bST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1-14. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq415>.
6. González L, González M, Zayas A, Curbelo M, Garrido Y. Relación genética de aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) Leonora González-Mesa, María de los Ángeles González-Leyva,\* Angela Mariana Zayas-Tamayo,\*\* Marah Curbelo -Álvarez, Yanelis Garrido- Nicot. en un hospital de la Habana, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2017;48(3):107-11.
7. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th. Edition ed: CLSI supplement M100S.; 2016.
8. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum betalactamasas. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:33-41.
9. Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 718-721.
10. H. Ciesielczuk, M. Hornsey, V. Choi, N. Woodford and D. W. Wareham. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants. *J of med Microbiol*. 2013, 62, 1823-182.