

Identificación de cepas de enterobacterias productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en felinos domésticos.

PALABRAS CLAVE: Enterobacterias > β -lactamasas > felinos > antimicrobianos > resistencia > BLEES

MC Carlos Gerardo Castillo Sosa¹
 MVZ Candy Araceli Ramírez Cuevas¹
 DC Arnulfo Villanueva Castillo²
 MPA Mariana Aldeco Perez¹

¹ Profesor Investigador, Laboratorio de Bacteriología, Hospital Veterinario para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

² Profesor Investigador, Cuerpo Académico de Enfermedades Emergentes, Bioinformática y Modelado Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Resumen

Las bacterias productoras de BLEES en la familia *Enterobacteriaceae* han sido ampliamente estudiadas y encontradas tanto en humanos como en animales de compañía, cambiando la manera en la que actualmente son tratadas las infecciones. No obstante, es el uso de antibióticos lo que ha impulsado a la evolución de los patógenos productores de resistencia a antimicrobianos, por ello el propósito de este estudio es la identificación de cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEES) en felinos domésticos en Puebla, México. Por medio de aislamientos de pacientes felinos sin ningún signo de enfermedad, un total de 75 felinos fueron muestreados de los cuales se obtuvieron 50 enterobacterias que fueron sometidas a pruebas de sensibilidad antibiótica por difusión en disco, con la cual fueron detectadas 15 bacterias productoras de BLEES; además, se encontraron niveles altos de resistencia principalmente a ceftriaxona con un 66% (33/50), 56% (28/50) a cefotaxima, 54% (27/50) a aztreonam, 52% (26/50) a cefepime. Por otra parte, las cepas BLEES mostraron resistencia a otras familias de antibióticos (aminoglucósidos 23% (3/15), quinolonas 33% (5/15), sulfonamidas 53% (7/15) y tetraciclinas 60% (9/15). La presencia de bacterias BLEES en la microbiota de pacientes veterinarios sanos puede contribuir a la diseminación de genes de resistencia en el microbioma humano, lo cual a su vez constituye un riesgo enorme a la salud pública.



Léalo en web

Introducción

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque son miembros naturales del tracto gastrointestinal de los mamíferos, pueden ser causa de enfermedades del tracto urinario, piel, oído, tejidos blandos, y aparato respiratorio en gatos y perros. Para infecciones no complicadas, la opción terapéutica de primera línea son ampicilina, amoxicilina y ácido clavulánico o cefalosporinas de primera y segunda generación, mientras que la amikacina, fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación pueden ser apropiadas para infecciones severas⁽¹⁾.

No obstante, es el uso de antibióticos lo que ha impulsado a la evolución de los patógenos portadores de resistencia a antimicrobianos⁽²⁾. La resistencia bacteriana esta mediada por diversos mecanismos, por ejemplo, la producción de enzimas que hidrolizan e inactivan a los antibióticos, tal como las β -lactamasas⁽³⁾. Las β -lactamasas, son enzimas que inactivan antibióticos β -lactámicos, revelándose como una de las mayores causas de resistencia. El número de β -lactamasas ahora excede a las 1300, haciendo de este grupo de enzimas una de las familias más estudiadas a detalle⁽⁴⁾. El impacto clínico de estas enzimas es particularmente crítico, debido a la dependencia de las cefalosporinas y carbapenémicos para el tratamiento de enfermedades graves e infecciones especialmente en entornos sanitarios⁽⁵⁾. Sin embargo, estas bacterias han evolucionado hasta el punto donde múltiples genes que codifican las β -lactamasas se producen en un solo organismo, junto con determinantes de resistencia para muchas otras clases de antimicrobianos, en el caso de las enterobacterias a este fenómeno se le conoce como β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), como el grupo de enzimas TEM-, SHV-, (CTX)-M, las cuales son capaces de hidrolizar el aztreonam y cefalosporinas de tercera generación⁽⁶⁾. La aparición de enterobacterias que producen BLEES en animales de compañía tanto sanos como enfermos constituye un desafío cada vez mayor para el tratamiento de infecciones en la terapia veterinaria. Además, la resistencia causada por las BLEES se asocia a menudo con la resistencia a otras clases de antibióticos como los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y el sulfametoxazol / trimetoprima (SXT), que son antimicrobianos de importancia crítica en la medicina humana⁽¹⁾. En consecuencia, existe una creciente preocupación sobre las bacterias productoras de BLEES en animales de compañía ya que representan un peligro potencial para la salud de los seres humanos, ya sea a través de la transmisión directa de patógenos resistentes, o indirectamente por medio de la transmisión de genes de resistencia por medio de bacterias comensales.

Objetivo

Identificar cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido en felinos domésticos que no presentan ninguna complicación clínica.

Materiales y Métodos

Aislamiento bacteriano

Se aislaron 50 enterobacterias obtenidas de hisopados rectales de 75 pacientes felinos que se presentaron a consulta en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, teniendo como criterio de exclusión para la toma de muestra a pacientes con enfermedad gastrointestinal y a pacientes con tratamiento antibiótico en periodo previo menor a 15 días.

Las muestras obtenidas de los pacientes felinos se sembraron en medio EMB con suplementado con cefotaxima, colocándose en incubación a 37°C por 24 hrs, posteriormente, las colonias resultantes se resembraron en agar MacConkey, incubándose a 37°C por 24 hrs y por último se realizó un pase a agar TSA.

Identificación de especie

Se realizaron pruebas bioquímicas estandarizadas para enterobacterias para la identificación de las cepas aisladas.

Prueba de susceptibilidad *in vitro*.

Se utilizó el método de difusión en disco o Kirby-Bauer para el ensayo de susceptibilidad. Dicha prueba, junto con los puntos de corte para cada antibiótico se ejecutaron de acuerdo con los lineamientos del CLSI versión 2020⁽⁷⁾. Para ello, se utilizó un cultivo de 24 horas en medio TSA, del cual se obtuvo un inóculo preparado con 5 ml de agua destilada estéril que se igualó en turbidez con el tubo de 0.5 del estándar de MacFarland. Este inóculo se usó para sembrar por triplicado por cepa placas de medio Mueller Hinton, al cual posteriormente se le adicionaron los sensidiscos de los siguientes antibióticos: Imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), amoxicilina/ácido clavulánico (30 μ g), cefepime (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), aztreonam (30 μ g), tetraciclina (30 μ g), gentamicina (10 μ g), amikacina (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) y sulfametoxazol/trimetoprim (25 μ g). Una vez colocados los sensidiscos, se incubaron las placas por 24 horas, para después llevar a cabo la medición de los halos de inhibición. Para la prueba fenotípica de producción de BLEES, se colocaron en una de las placas los sensidiscos con la siguiente disposición: en el centro el disco de amoxicilina/ácido clavulánico, y alrededor de este, los discos de ceftriaxona, cefepime, aztreonam, ceftazidima y cefotaxima. ▶



Al igual que el procedimiento anterior, las placas con esta disposición de discos se inocularon a 37°C por 24 horas, después de las cuales se evalúa la presencia de los halos de sinergia entre el disco con el inhibidor de betalactamasas y los antibióticos alrededor.

Resultados

Durante seis meses se aislaron 50 enterobacterias de pacientes felinos, de las cuales el 40% (20/50) se identificaron como *Klebsiella pneumoniae*, el 16% (8/20) corresponden a *E.coli*, el 10% (5/50) a *Citrobacter diversus*, el 10% (5/50) a *Enterobacter aerogenes*, el 6% (3/50) a *Proteus vulgaris*, y el 18% (9/50) a otras enterobacterias.

En el análisis de las bacterias aisladas se identificaron por medio de la prueba de difusión en disco 15 bacterias BLEEs formando halos de sinergia, es decir, el 30% (15/50); de las cuales el 20% (3/15) pertenecen a *Proteus vulgaris*, el 20% (3/15) a *Klebsiella oxytoca*, el 13% (2/15) a *Escherichia coli*, el 13% (2/15) *Escherichia adecarboxylata*, otro 13% (2/15) a *Providencia stuartii*, el 6% a *Citrobacter diversus*, y otro 6% a *Enterobacter aerogenes* y *Serratia odorifera* respectivamente.

En cuanto al perfil de resistencia a los betalactámicos probados se obtuvo un 66% (33/50) de resistencia a Ceftriaxona, 56% (28/50) de resistencia a Cefotaxima, 54% (27/50) a Aztreonam, 52% (26/50) a Cefepime, 46% (23/50) a Ceftazidime, 30% (15/50) Amoxicilina con ácido clavulánico.

Se evaluó además la susceptibilidad in vitro a antibióticos no betalactámicos, donde las cepas BLEEs mostraron resistencia a aminoglucósidos en un 23% (3/15), a quinolonas 33% (5/15), sulfonamidas/trimetoprim 53% (7/15) y tetraciclinas 60% (9/15).



Figura 1: Prueba de sensibilidad in vitro de la cepa M19 (superior) (*Klebsiella oxytoca*) y M11 (inferior) (*Proteus vulgaris*) donde se observa el halo de sinergia con la forma de "cola de pez" entre el disco de amoxicilina/acido clavulánico (AMC) y el disco de cefepime (FEP), lo cual es evidencia de la producción de BLEEs

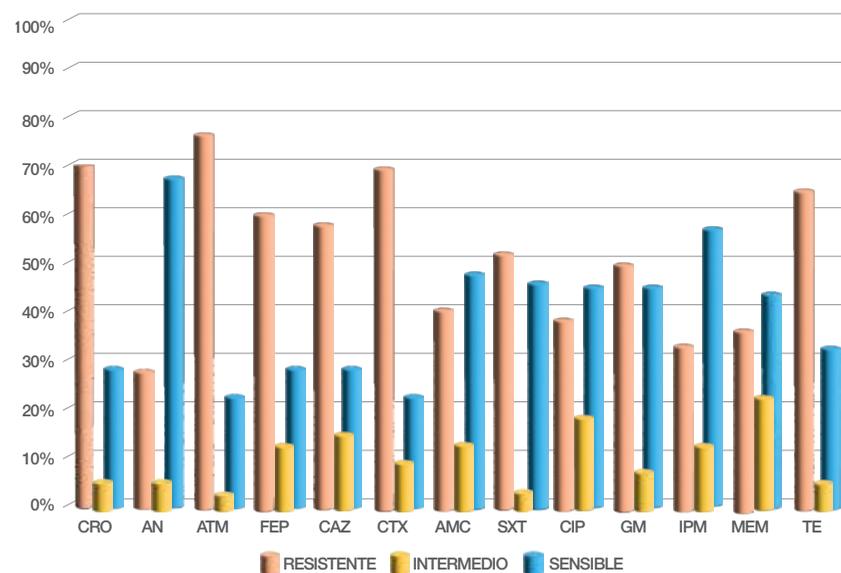


Figura 2. Perfil de resistencia a antibióticos de enterobacterias aisladas de pacientes felinos a 13 antibióticos. Ceftriaxona 30 µg (CRO); Amikacina 30 µg (AN); Aztreonam 30 µg (ATM); Cefepime 30 µg (FEP); Ceftazidima 30 µg (CAZ); Cefotaxima 30 µg (CTX); Amoxicilina/ac clavulánico 10 µg (AMC); Trimetoprim/sulfametoxazol 23.7/1.25 µg (SXT); Ciprofloxacino 5 µg (CIP); Gentamicina 10 µg (GM); Imipenem 10 µg (IMP); Meropenem 10 µg (MER); Tetraciclina 30 µg (TE).

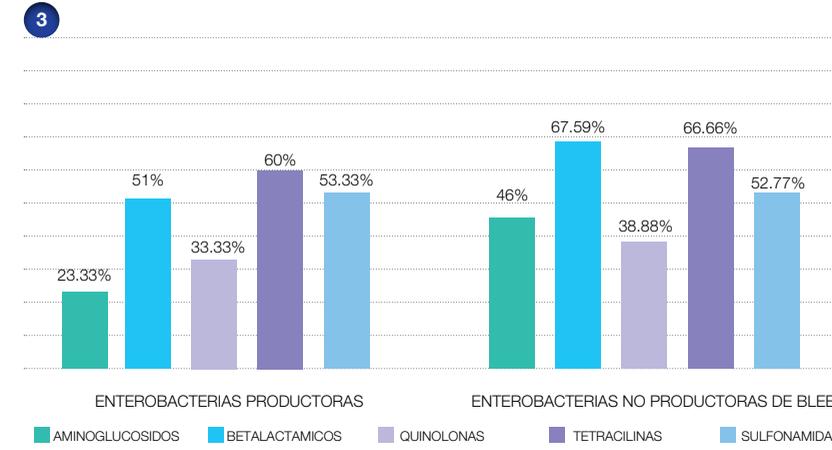


Figura 3: Comparativo entre los porcentajes de resistencia de las cepas de enterobacterias productoras de BLEEs y las no productoras de BLEEs a las familias de antibióticos utilizadas en este estudio.

Discusión

Este estudio identificó una cantidad notable 30% (15/50) de enterobacterias productoras de B-lactamasas de espectro extendido derivadas de la colección de muestras rectales de pacientes felinos sanos; esto es considerablemente alto al encontrado en estudios similares en animales, como un estudio realizado en Suiza donde solo el 6% (7/115) de las enterobacterias aisladas de felinos fueron productoras de BLEEs; las bacterias productoras de B-lactamasas fueron en su mayoría identificadas como *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de orina y de heridas en piel⁽¹⁾. Otro estudio del año 2016 sobre BLEEs en aislados fecales de *E. coli* en animales de compañía sanos en Argelia, el 7.2% de las muestras en gatos fueron positivas a la producción de B-lactamasas de espectro extendido⁽⁸⁾. En un estudio realizado en Brasil se observó una prevalencia de (6,9%, n = 2/29) en gatos callejeros sanos, así como en mascotas con infecciones del tracto urinario (8,3% en gatos)⁽⁹⁾. Sin embargo, un estudio en Japón mostró proporciones elevadas de BLEEs (21.3%) de muestras tracto urinario, pero estas fueron tomadas de animales enfermos incluyendo perros y gatos⁽¹⁰⁾. Cabe enfatizar que en este estudio solo se realizaron hisopados rectales de pacientes felinos sanos, obteniendo un mayor porcentaje de bacterias productoras de BLEEs que en otras investigaciones, siendo el único estudio realizado exclusivamente de pacientes felinos en México hasta ahora.

Otro hallazgo importante fue el nivel de resistencia encontrado a los diferentes betalactámicos; ya que en un estudio realizado en Australia se reportaron niveles de resistencia del 5.6% a Ceftriaxona⁽¹¹⁾; el cual es muy bajo comparado con el 66% de este estudio.

En otra investigación la incidencia de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam fue de 42.4% (14/33), 36.3% (12/33), 33.3% (11/33), and 9.1% (3/33), respectivamente⁽¹²⁾ los cuales fueron obtenidos de aislamientos provenientes de caninos; no obstante, en este estudio los niveles de resistencia para los mismos antibióticos fueron más altos. En otro estudio realizado también en Suiza se encontró un 38.5% de resistencia a Cefotaxima en aislamientos realizados de *E.coli* en felinos⁽¹³⁾.

El fenotipo de bacterias BLEEs, presenta, además del desafío de mostrar resistencia a gran parte de los betalactámicos, el reto adicional de mostrar coresistencia a otras importantes familias de antibióticos incluyendo amino-

glucósidos, tetraciclinas, flouroquinolonas y sulfonamidas⁽¹⁴⁾. En este trabajo, se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de las cepas de enterobacterias productoras de BLEEs contra aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas, mostrando resistencia a aminoglucósidos en 23% (3/15), a quinolonas 33% (5/15), sulfonamidas/trimetoprim 53% (7/15) y tetraciclinas 60% (9/15). Estos resultados muestran porcentajes mas elevados que lo reportado por Falodun *et al*, quienes no encontraron resistencia a aminoglucósidos e indicaron 30% y 25% de cepas BLEEs resistentes a tetraciclinas y sulfonamidas respectivamente⁽¹⁵⁾.

Datos similares se encontraron en el reporte de Liu *et al*⁽¹⁶⁾ con respecto a los porcentajes de resistencia para aminoglucósidos y sulfonamidas/ trimetoprim, sin embargo, observaron hasta 90% de resistencia a fluoroquinolonas, considerablemente mas alto que el porcentaje encontrado en el presente trabajo. Liu también encontró que el 73.95% (68/92) de las cepas BLEEs mostraban adicionalmente el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR, Multi-drug resistance), valor ligeramente por encima de lo hallado en esta investigación, con 60% (9/15) de enterobacterias BLEE que son además MDR (definiendo este fenotipo como el aislamiento que es resistente a por lo menos un antibiótico de 3 familias distintas).

La presencia de MDR suele ser común en los microorganismos productores de BLEEs. Esta combinación de propiedades puede afectar significativamente el curso y los resultados de las infecciones. Los genes de b-lactamasa comúnmente se ubican en elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones o integrones, y los plásmidos de resistencia pueden transferirse fácilmente entre aislados bacterianos mediante un mecanismo de conjugación⁽¹⁷⁾. ▶



La convivencia entre el humano y los animales de compañía ha experimentado un cambio, en el sentido de hacerse cada vez más estrecha, lo que permite un ambiente donde la transmisión de microorganismos entre unos y otros también sea viable, lo cual a su vez propicia que la posibilidad de un intercambio de genes de resistencia entre las respectivas microbiotas sea bastante probable. Este escenario, donde un animal o humano sano albergan bacterias con genes de resistencia, aumenta el panorama de pesimismo sobre nuestra capacidad de detener la propagación

de la resistencia a antimicrobianos. La diseminación de genes BLEEs en animales de compañía no solo reduce nuestra capacidad de tratar infecciones en estos pacientes, sino que además esta incapacidad puede extenderse a tratamientos en personas. Estudios como este, pueden contribuir a tener información que permita, por un lado, enfocar mayor atención a la presencia de BLEEs en enterobacterias presentes en mascotas, y por otro, en un futuro, planear estrategias encaminadas a contener el avance de esta problemática, la cual, por ahora, parece inevitable. ■

Bibliografía

- Nüesch-Inderbilen M, Zogg AL, Simmen S, Zurfluh K, Schmitt SN, Stephan R. High Prevalence of Extended-Spectrum β-Lactamase Producing Enterobacteriaceae Among Clinical Isolates From Cats and Dogs Admitted to a Veterinary Hospital in Switzerland. *Front Vet Sci.* 2018;5(March):1-8.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(12):1057-98.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(1):90-101.
- Bush K. The ABCD's of β-lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2013;19(4):549-59.
- Ju LC, Cheng Z, Fast W, Bonomo RA, Crowder MW. The Continuing Challenge of Metallo-β-Lactamase Inhibition: Mechanism Matters. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(7):635-47.
- Wieler LH, Ewers C, Guenther S, Walther B, Lübke-Becker A. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. Vol. 301, *International Journal of Medical Microbiology.* 2011. p. 635-41.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Supplement, 32nd ed. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA CLSI document M100S
- Yousfi M, Mairi A, Touati A, Hassissene L, Brasme L, Guillard T, et al. Extended spectrum β-lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2016;22(7):431-5.
- Melo LC, Lincopan N, Haenni M, Madec JY, Leigue L, Melville PA, et al. Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing Enterobacteriaceae in healthy and diseased companion animals in Brazil. *Vet Microbiol.* 2018;221(May):59-66.
- Koide S, Ohsaki Y, Osaka S, Taniguchi Y, Nagano N, Nagano Y, et al. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and feline clinical specimens in Japan. *Vet Microbiol.* 2018;216(February):183-9.
- Abraham S, Turnidge J, Saputra S, Abraham RJ, Mitchell T, Jordan D, et al. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from companion animals in Australia. *Vet Microbiol.* 2017;211(April):43-50.
- Mohammad Sharif N, Sreedevi B, Chaitanya RK, Sreenivasulu D. Beta-lactamase antimicrobial resistance in *Klebsiella* and *Enterobacter* species isolated from healthy and diarrheic dogs in Andhra Pradesh, India. *Vet World.* 2017;10(8):950-4.
- Zogg AL, Zurfluh K, Schmitt S, Nüesch-Inderbilen M, Stephan R. Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. *Vet Microbiol.* 2018;216(February):79-84.
- Dazio V, Nigg A, Schmidt JS, Brillhante M, Mauri N, Kuster SP, et al. Acquisition and carriage of multidrug-resistant organisms in dogs and cats presented to small animal practices and clinics in Switzerland. *J Vet Intern Med.* 2021 Mar 1;35(2):970-9.
- Falodun OI, Afolabi MC, Rabiou AG. Detection of extended Spectrum β-lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolated from fecal samples of apparently healthy dogs in Ibadan, Nigeria. *Animal Gene.* 2022 Sep 1;26.
- Liu X, Thungrat K, Boothe DM. Occurrence of oxa-48 carbapenemase and other β-lactamase genes in esbl-producing multidrug resistant: *Escherichia coli* from dogs and cats in the united states, 2009-2013. *Front Microbiol.* 2016 Jul 11;7(JUL).
- Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, Bauerfeind R, Prenger-Berninghoff E, Imirzalioglu C, et al. Multiresistant extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol.* 2014 Jul 12;14(1).



Equilis® TE

Vacuna subunitaria para la inmunización activa de caballos y ponies contra el tétanos.

Reg. SAGARPA B-0273-257

Presentación: Caja con 10 frascos de 1 dosis cada uno
Suspensión inyectable clara translúcida
Cada dosis de 1 ml de EQUILIS® TE contiene:

Toxide tetánico: 40 Lf1
1 Equivalentes de floculación; corresponde a ≥ 30 UI / ml
Especie de destino: Equinos (caballos y ponies)



Equilis® Prequenza

Protección contra influenza equina.

Reg. SAGARPA B-0273-255

Presentación: Caja con 10 frascos de 1 sola dosis
Suspensión inyectable clara translúcida
Cada dosis de 1 ml de EQUILIS® PREQUENZA contiene:

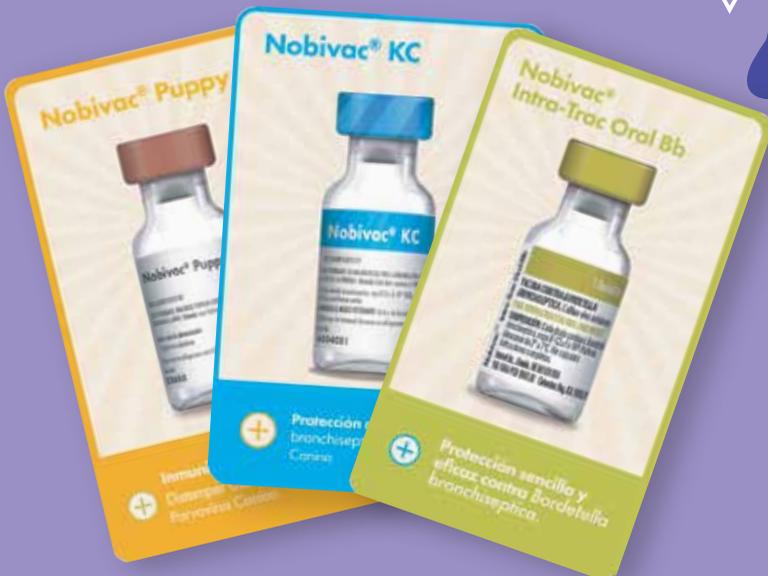
Subunidades hemaglutinina/neuraminidasa purificadas de los virus de la Influenza Equina:
A/equino-2/Sudáfrica/4/03 50 AU¹
A/equino-2/Newmarket/2/93 50 AU

Nobivac® 

Nuestro desafío es protegerlos



Descubre más



Felices y sanos desde sus primeros pasos

Sabemos que tus pacientes son lo más valioso, ofréceles la protección que necesitan con Nobivac®