# Resistencia enzimática a betalactámicos en el género *Proteus* y evaluación de los fenotipos y genotipos de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *Proteus mirabilis*

Cynthia Rodríguez<sup>a</sup>, Marcela Radice<sup>c</sup>, Beatriz Perazzi<sup>a</sup>, Silvia Castro<sup>a</sup>, Josefina Juárez<sup>a</sup>, Pilar Santini<sup>+b</sup>, Carlos Vay<sup>a</sup>, Angela Famiglietti<sup>a</sup> y Gabriel Gutkind<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Cátedra de Análisis Clínicos I. Laboratorio de Bacteriología. <sup>b</sup>Cátedra de Higiene y Sanidad. <sup>c</sup>Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Hospital de Clínicas. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

INTRODUCCIÓN. El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia a betalactámicos en el género *Proteus* y caracterizar las betalactamasas responsables de dicha resistencia.

MÉTODOS. Se analizaron 99 cepas (87 *P. mirabilis;* 10 *P. vulgaris,* y 2, *P. penneri*) aisladas de pacientes atendidos en un Hospital Universitario. Los ensayos de susceptibilidad a antibióticos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards. La presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) fue inferida por el método de difusión de doble disco y por la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cefalosporinas de tercera y cuarta generación solas y en presencia de ácido clavulánico. Se estimó el punto isoeléctrico (pl) por isoelectroenfoque y la presencia de los genes codificantes se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

RESULTADOS. Una betalactamasa de amplio espectro fue detectada en aquellos aislamientos resistentes a penicilinas y cefalosporinas de primera generación (28%), mientras que la enzima CTX-M-2 fue detectada en los aislamientos de P. mirabilis resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (18%). Uno de los P. vulgaris presentó sensibilidad disminuida a cefotaxima debido a una enzima de pl 7,4, mientras que la resistencia a cefotaxima en un P. penneri fue relacionada con una enzima de pl 6,8. Ambas enzimas fueron activas sobre cefotaxima (1.000 mg/l) en el ensayo iodométrico. CONCLUSIÓN. La betalactamasa de amplio espectro en el género Proteus fue TEM-1 mientras que CTX-M-2 fue la BLEE responsable de la resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en P. mirabilis. En P. vulgaris y P. penneri esta resistencia se asoció a la hiperproducción de la betalactamasa cromosómica.

Correspondencia: Dra. M. Radice. Junín, 956. 1113 Buenos Aires. Argentina. Correo electrónico: mradice@ffyb.uba.ar

Manuscrito recibido el 23-2-2004; aceptado el 8-9-2004.

## *Palabras clave:* Género *Proteus*. Resistencia enzimática. Betalactámicos.

Enzymatic resistance to Betalactam antibiotics within the genus *Proteus* and evaluation of third and fourth generation cephalosporins resistance phenotypes and genotypes within *Proteus mirabilis* 

INTRODUCTION. The aim of this study was to evaluate betalactam resistance within the genus *Proteus* and characterize the betalactamases responsible for this resistance.

METHODS. We analyzed 99 strains (87, *P. mirabilis*; 10 *P. vulgaris*, and 2, *P. penneri*) isolated from patients at one University Hospital. Antibiotic susceptibility tests were performed according to NCCLS recommendations. Presence of extended spectrum betalactamases (ESBL) was inferred by both double disk diffusion tests and minimum inhibitory concentration (MIC) of third and fourth generation cephalosporins alone and in the presence of clavulanic acid. Isoelectric points (pl) of the enzymes were estimated by isoelectrofocusing and the presence of the encoding genes was confirmed by polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS. A broad spectrum betalactamase could be detected in those isolates (28%) resistant to penicillin and first generation cephalosporins while CTX-M-2 enzyme could be detected in *P. mirabilis* isolates resistant to third and fourth generation cephalosporins (18%). One of the *P. vulgaris* displayed reduced susceptibility to cefotaxime due to an enzyme of pl 7.4, while resistance to cefotaxime in one *P. penneri* was related to an enzyme of pl 6.8. Both enzymes were active on cefotaxime (1,000 mg/l) in the iodometric assay.

CONCLUSION. The broad extended spectrum betalactamase within genus *Proteus* was TEM-1, while CTX-M-2 was the ESBL responsible for the third and fourth generation cephalosporins in *P. mirabilis*. In *P. vulgaris* and *P. penneri* this resistance was associated with the hyperproduction of the chromosomal encoded betalactamase.

*Key words:* Genus *Proteus.* Enximatic resistance. Betalactam.

### Introducción

La sensibilidad a los antibióticos betalactámicos difiere entre las distintas especies del género *Proteus*.

*P. mirabilis* es uno de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* más sensibles, debido entre otras causas a la ausencia de betalactamasas cromosómicas. La resistencia en esta especie se debe fundamentalmente a la adquisición de betalactamasas plasmídicas, siendo TEM-1 la más frecuentemente detectada<sup>1</sup>.

El aislamiento de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación se ha ido incrementando, alcanzando un 18% en esta especie en Argentina<sup>2</sup>.

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) de mayor prevalencia en este país son CTX-M-2, una cefotaximasa con escasa actividad sobre ceftazidima y aztreonam, y PER-2, que a diferencia de CTX-M-2 tiene también actividad de ceftazidimasa<sup>2-4</sup>. De hecho, el primer aislamiento productor de PER-2 en nuestro país fue *P. mirabilis*<sup>5</sup>.

Las otras dos especies del género presentan naturalmente una mayor resistencia a los betalactámicos, debido a la producción de una cefuroximasa cromosómica inducible, que confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera generación y cefuroxima.

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el perfil de sensibilidad a los antibióticos betalactámicos en el género *Proteus*, detectar las enzimas responsables de la resistencia a estos antimicrobianos y evaluar los fenotipos y genotipos de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *P. mirabilis*.

### Métodos

#### Microorganismos

Se estudiaron 99 aislamientos únicos, consecutivos e ininterrumpidos de *Proteus* (87, *P. mirabilis*; 10 pertenecientes al complejo *P. vulgaris*, y 2, *P. penneri*) aislados de pacientes atendidos en el Hospital de Clínicas José de San Martín de Buenos Aires, Argentina, durante el período comprendido entre septiembre de 1998 y mayo de 2000.

## Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y detección de BLEE

La sensibilidad a diferentes antibióticos betalactámicos (solos y en combinación con inhibidores de betalactamasas) se determinó por el método de dilución en agar, siguiendo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>6</sup>. Los antibióticos ensayados fueron: amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico (2:1), piperacilina, piperacilina-tazobactam (concentración de tazobactam: 4 mg/l), cefalotina, cefoxitina, cefuroxima, imipenem y ácido clavulánico. Cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam se ensayaron solos y asociados a 4 mg/l de ácido clavulánico.

Se detectó la presencia de BLEE utilizando el ensayo de sinergia de doble disco, colocando discos de ceftazidima (30 µg) y ceftriaxona (30 µg) a 25 mm de un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg) (Difco, EE.UU.)<sup>7</sup>. Se incluyó también el ensayo confirmatorio de BLEE propuesto por el NCCLS para *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar de cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam solos y asociados a 4 mg/l de ácido clavulánico<sup>6</sup>.

Se sospechó la presencia de BLEE cuando la CIM de una o más cefalosporinas de tercera o cuarta generación fue mayor o igual a 1 mg/l. Se confirmó fenotípicamente la presencia de BLEE cuando se observó sinergia entre los discos de las cefalosporinas de tercera generación y amoxicilina-ácido clavulánico y/o cuando la relación entre la CIM de cefotaxima, ceftazidima, cefepima y/o aztreonam asociados al inhibidor de betalactamasa disminuyó por lo menos tres diluciones con respecto a la CIM de las cefalosporinas solas.

## Determinación de los puntos isoeléctricos de las betalactamasas

Los extractos enzimáticos se obtuvieron a partir de cultivos de los microorganismos en 50 ml de caldo cerebro-corazón con 100 mg/l de ampicilina (Argentia, Argentina) o 50 mg/l de cefotaxima (Roche, Argentina) para las cepas productoras de BLEE. Los cultivos se centrifugaron a 8.000 rpm (Sorvall, Rotor SS 34) a 4 °C durante 20 min y las células se resuspendieron en 2 ml de búffer fosfato 20 mM de pH 7,0. Las suspensiones celulares se sometieron a rotura ultrasónica en baño de hielo para evitar la desnaturalización proteica, utilizando un sonicador Vibra Cell (Sonics & Materials Inc, EE.UU.). Se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 15.000 rpm (Sorvall Rotor SS 34) a 4 °C durante 30 min.

Se determinó el punto isoeléctrico (pI) de las enzimas por isoelectroenfoque analítico<sup>8</sup> empleando geles de poliacrilamida de amplio rango (pH 3-10). Se incluyeron enzimas de pI conocido como patrón. Se empleó un equipo LKB 2117 Multiphor II (LKB Produkter AB, Suecia). Las betalactamasas fueron reveladas por el método iodométrico en agar utilizando ampicilina (500 mg/l) y cefotaxima (1.000 mg/l)<sup>9</sup>.

## Detección molecular de los genes codificantes de BLEE

Se amplificó el gen codificante de la BLEE utilizando iniciadores deducidos a partir de la secuencia del gen *bla*CTX-M-2<sup>4</sup>: *bla*CTX-M-2 I: 5'TTAATGATGACTCAGAGCATTC 3' (GIBCO BRL, EE.UU.), *bla*CTX-M-2 II: 5' GATACCTCGCTCCATTTATTG 3'(GIB-CO BRL, EE.UU.)<sup>10</sup>.

Se utilizó ADN plasmídico obtenido por lisis alcalina<sup>11</sup> de las cepas de P. *mirabilis* resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Los parámetros de amplificación cumplidos fueron: desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 min, *annealing* a 48 °C durante 15 min y 30 ciclos que incluían 1 min a 95 °C, 1 min a 48 °C y 90 s a 72 °C; y un período de extensión final de 20 min a 72 °C. Se empleó un termociclador Matercycler 5330 (Eppendorf, Alemania).

Los fragmentos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se secuenciaron automáticamente en ambas cadenas empleando el ABI PRISM 3700 DNA.

### Resultados

Los aislamientos de *P. mirabilis* se dividieron en 3 grupos de acuerdo a su sensibilidad a los antibióticos betalactámicos. De las 87 cepas estudiadas, 47 (54%) fueron sensibles a todos los antibióticos betalactámicos ensayados (grupo I); 24 (28%) fueron sólo resistentes a las aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación (grupo II), y 16 (18%) resultaron resistentes a alguna de las cefalosporinas de tercera generación ensayadas (grupo III). Los valores de CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> y los valores de rango de CIM de cada antibiótico se detallan en la tabla 1.

	Proteus mirabilis (n = 87)								
Antibiótico	<b>Grupo I (n = 47)</b>			<b>Grupo II</b> (n = 24)			Grupo III (n = 16)		
	Rango	CIM <sub>50</sub> (mg/l)	CIM <sub>90</sub> (mg/l)	Rango	CIM <sub>50</sub> (mg/l)	CIM <sub>90</sub> (mg/l)	Rango	CIM <sub>50</sub> (mg/l)	CIM <sub>90</sub> (mg/l)
Amoxicilina Amoxicilina/ácido	0,5-8	1	1	32- > 512	> 512	> 512	512- > 512	> 512	> 512
clavulánico	0,5/0,25-2/1	0,5/0,25	1/0,5	2/1-128/64	8/4	64/32	8/4-256/128	16/8	128/64
Piperacilina Piperacilina/	0,0125-1	0,5	1	0,25-64	16	64	32-512	64	128
tazobactam	0,016/4-1/4	0,125/4	0,5/4	0,008/4-16/4	0,25/4	1/4	0,25/4-2/4	0,5/4	2/4
Cefalotina	2-8	8	8	0,5 - > 512	16	128	256 - > 512	512	> 512
Cefoxitina	2-8	4	4	1-8	2	8	2-16	4	8
Ceftazidima	0,063-0,125	0,063	0,125	0,032 - 0,25	0,125	0,125	0,125-2	1	2
Ceftazidima/ácido									
clavulánico	0,016/4-0,125/4	0,063/4	0,125/4	0,016/4-0,063/4	0,032/4	0,063/4	0,016/4-0,125/4	0,063/4	0,125/4
Cefotaxima	0,008-0,032	0,016	0,032	0,004-1	0,008	0,125	16-512	128	256
Cefotaxima/ácido									
clavulánico	0,008/4-0,016/4	0,016/4	0,016/4	0,004/4-0,032/4	0,008/4	0,032/4	0,063/4-1/4	0,125/4	1/4
Cefepima	0,063-0,5	0,125	0,125	0,125-2	0,125	1	8-256	16	128
Cefepima/ácido									
clavulánico	0,063/4-0,125/4	0,125/4	0,125/4	0,032/4-0,5/4	0,063/4	0,125/4	0,063/4-0,5/4	0,25/4	0,5/4
Aztreonam	0,008-0,032	0,032	0,032	0,008-0,032	0,008	0,032	0,125-2	1	2
Aztreonam/ácido			,				,		
clavulánico	0,008/4-0,032/4	0,032/4	0,032/4	0,004/4-0,032/4	0,004/4	0,032/4	0,008/4-0,032/4	0,008/4	0,008/4
Imipenem	0,125-1	0,25	1	0,25-1	0,25	1	0,063-2	0,5	2
Ácido clavulánico	16-256	32	64	16-256	128	256	64-256	128	128

TABLA 1. CIM de diferentes antibióticos lactámicos con y sin inhibidor de betalactamasa expresada en CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de *Proteus mirabilis* 

CIM: concentración inhibitoria mínima.

TABLA 2. CIM de diferentes antibióticos betalactámicos
con y sin inhibidor de betalactamasa expresada en CIM <sub>50</sub> y CIM <sub>90</sub>
de Proteus vulgaris

	Proteus vulgaris (n = 10)					
Antibiótico	Rango	CIM <sub>50</sub> (mg/l)	CIM <sub>90</sub> (mg/l)			
Amoxicilina	32-512	512	512			
Amoxicilina-ácido						
clavulánico	0,125/0,063-32/16	8/4	32/16			
Piperacilina	0,125-4	0,25	4			
Piperacilina-	,	,				
tazobactam	0,004/4-0,125/4	0,125/4	0,125/4			
Cefalotina	64-512	512	> 512			
Cefoxitina	2-8	4	8			
Cefuroxima	16 - > 512	512	> 512			
Ceftazidima	0,063-0,125	0,063	0,125			
Ceftazidima-ácido						
clavulánico	0,063/4-0,125/4	0,032/4	0,125/4			
Cefotaxima	0,016-1	0,032	0,032			
Cefotaxima-ácido						
clavulánico	0,016/4-0,032/4	0,016/4	0,032/4			
Cefepima	(0,063-0,25)	0,125	0,25			
Cefepima-ácido						
clavulánico	0,063/4-0,125/4	0,063/4	0,125/4			
Aztreonam	0,032-1	0,032	0,125			
Aztreonam-ácido						
clavulánico	0,004/4-0,032/4	0,016/4	0,032/4			
Imipenem	(0, 125-2)	0,5	1			
Ácido clavulánico	(64-256)	32	64			

CIM: concentración inhibitoria mínima.

Todas las cepas de *P. vulgaris* y *P. penneri* estudiadas presentaron la resistencia natural a amoxicilina, cefalotina y cefuroxima. Un solo aislamiento de *P. vulgaris* presentó una CIM de cefotaxima de 1 mg/l (tabla 2), y una de las cepas de *P. penneri* fue resistente a cefotaxima (CIM = 64 mg/l). En 2 de los 24 aislamientos de *P. mirabilis* del grupo II se observó una CIM de cefepima mayor o igual a 1 mg/l, siendo en uno de ellos la CIM de cefotaxima de 1 mg/l. Sin embargo, en ninguna de las cepas de este grupo disminuyó la CIM de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación cuando se asoció el ácido clavulánico, ni se observó sinergia con este inhibidor en la prueba de doble disco. En todas las cepas del grupo II se detectó una enzima de pI 5,4, la cual hidrolizó ampicilina (500 mg/l) pero no cefotaxima (1.000 mg/ml) cuando se reveló por el método iodométrico. Cuatro de ellas poseían además una segunda enzima con actividad sobre ampicilina (500 mg/l), de pI 5,6.

Todas las cepas del grupo III presentaron sinergia con ácido clavulánico cuando fue utilizado en la prueba de doble disco y también mostraron una disminución en la CIM de por lo menos tres diluciones al asociar este inhibidor con las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y aztreonam. Por otra parte, la CIM de cefotaxima y cefepima en todas las cepas fueron mayores a 1 mg/l, mientras que sólo 10 de 16 aislamientos presentaron CIM de ceftazidima y aztreonam mayor o igual a 1 mg/l. Las seis cepas restantes presentaron CIM de ceftazidima y aztreonam entre 0,125 y 0,5 mg/l.

Por isoelectroenfoque, en todas las cepas del grupo III se detectó la presencia de dos betalactamasas diferentes, activas sobre ampicilina (500 mg/l), una de ellas de pI 5,4 y otra de pI 8,2. Esta última hidrolizó también cefotaxima (1.000 mg/l), al ser revelada por el método iodométrico en agar.

El fragmento de amplificación obtenido por PCR tuvo un tamaño aproximado de 0,9 kb en concordancia con el gen *blaCTX-M-2*. La secuenciación de 12 de los productos amplificados por PCR correspondieron a CTX-M-2 (100% identidad) y ninguno correspondió a otra enzima relacionada<sup>10</sup>.

Especie	Número	рІ	Betalactamasa probable	Número de cepas con CIM $\ge 1 \text{ mg/l}$				
				Cefotaxima	Ceftazidima	Cefepima	Aztreonam	
P. mirabilis (30)								
Grupo II (24)	20	5,4	TEM-1	1	0	2	0	
• • •	4	5,6+5,4	TEM-2 + TEM-1	0	0	0	0	
Grupo III (16)	16	5,4+8,2	TEM-1 + CTX-M-2	16	10	16	10	
P. vulgaris (10)	9	5,4	TEM-1	0	0	0	0	
-	1	5,4+7,4	TEM-1 + crom.	1	0	0	0	
P. penneri (2)	1	5,4	TEM-1	0	0	0	0	
• · · ·	1	5,4+6,8	TEM-1 + crom.	1	0	0	0	

TABLA 3. Distribución de las probables betalactamasas observadas en las especies de *Proteus* resistentes a uno o más antibióticos betalactámicos y análisis de la cantidad de estas cepas con CIM  $\ge 1$  mg/l a cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam

CIM: concentración inhibitoria mínima; CTX: cefotaxima.

Todos los aislamientos de *P. vulgaris* y *P. penneri* presentaron una enzima de pI 5,4 que hidrolizó ampicilina (500 mg/l).

El aislamiento de *P. vulgaris* con CIM de cefotaxima de 1 mg/l, produjo además una enzima de pI 7,4, que correspondería a una de las cuatro betalactamasas cromosómicas descritas en esta especie<sup>12</sup>, que hidrolizó tanto ampicilina (500 mg/l) como cefotaxima (1.000 mg/l) al ser revelada por el método iodométrico.

En *P. penneri* la resistencia a cefotaxima (CIM, 64 mg/l), se asoció con la detección de una enzima de pI 6,8, coincidente con la betalactamasa cromosómica, propia de esta especie<sup>12</sup>, que hidrolizó cefotaxima (1.000 mg/l) en el ensayo iodométrico.

La distribución de las betalactamasas detectadas en las diferentes especies del género *Proteus*, resistentes a uno o más antibióticos betalactámicos se observa en la tabla 3.

Los 18 aislados de *Proteus* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (*P. mirabilis* [16], *P. penneri* [1], *P. vulgaris*) fueron aislamientos únicos provenientes de 5 pacientes ambulatorios y 13 pacientes internados en diferentes salas del hospital: clínica médica (7), terapia (5) y neurocirugía (1).

### Discusión

Las cefalosporinas de tercera generación constituyen una opción terapéutica fundamental en el tratamiento de las infecciones por bacilos gramnegativos. Debido a su amplia utilización se ha incrementado notablemente la resistencia en la mayoría de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *P. mirabilis*<sup>13</sup>. El principal mecanismo de resistencia a dichos antibióticos en microorganismos que carecen de enzima cromosómica de clase C lo constituye la adquisición de betalactamasas plasmídicas<sup>3,14-18</sup>.

Las enzimas de espectro extendido más frecuentemente halladas en *P. mirabilis*, en Estados Unidos y Europa son derivadas de enzimas tipo TEM, como TEM-3, TEM-10 y TEM- $26^{19\cdot21}$ . En Argentina, en cambio, las enzimas del tipo CTX-M son prevalentes en esta especie<sup>2,3,16</sup>. Recientemente en Israel se ha descrito por primera vez la presencia de CTX-M-2 en cepas de *P. mirabilis* de origen hospitalario<sup>22</sup>.

En este estudio la enzima CTX-M-2<sup>17</sup> resultó la única BLEE hallada en *P. mirabilis*, no encontrándose derivadas de SHV o de TEM, en concordancia con lo descrito previamente por Quinteros  $et al^3$ . La BLEE hallada se detectó con el punto de corte recomendado por el NCCLS para K. pneumoniae, K. oxytoca v E. coli (CIM de cefotaxima mayor o igual a 2 mg/l<sup>6</sup>) y el recomendado por la Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC (CIM de cefotaxima mayor o igual a 1 mg/l) para las mismas enterobacterias y P. mirabilis23. En este trabajo, utilizando ceftazidima y aztreonam sólo se detectó el 63% de las cepas de *P. mirabilis* del grupo III productoras de esta enzima, ya que el 37% restante presentaron CIM menor a 1 mg/l, como ya se ha demostrado previamente<sup>3</sup>. Asimismo, la CIM de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y de aztreonam asociadas a ácido clavulánico descendían en todos los casos por lo menos tres diluciones con respecto a las cefalosporinas y aztreonam solos, lo que confirmó fenotípicamente la presencia de BLEE.

En todos los aislamientos de *P. mirabilis* de los grupos II y III, se detectó la presencia de una enzima de pI 5,4 compatible con una betalactamasa de amplio espectro, probablemente TEM-1. Además, el 17% de ellos producía una segunda enzima de pI 5,6, compatible con TEM-2.

Por otra parte, en P. vulgaris y P. penneri el mecanismo más frecuente de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación se debe a la adquisición de betalactamasas plasmídicas<sup>2,14</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio los aislamientos resistentes presentaron enzimas de pI coincidentes con los de las betalactamasas cromosómicas propias de estas especies. Estas enzimas hidrolizaron cefotaxima, pero no ceftazidima, cefepima ni aztreonam y fueron inhibidas por ácido clavulánico. La hiperproducción de esta betalactamasa cromosómica es fenotípicamente indistinguible de las cefotaximasas halladas en nuestros aislamientos de *P. mirabilis* ya que ambas elevan la CIM de cefotaxima y no la de ceftazidima y aztreonam y son inhibidas por ácido clavulánico. La imposibilidad de diferenciarlas por el fenotipo de resistencia obliga a realizar su confirmación por isoelectroenfoque o por métodos genéticos.

Se puede concluir que la betalactamasa de amplio espectro más difundida en el género *Proteus* fue la enzima TEM-1 y la de BLEE correspondió en *P. mirabilis* a CTX-M-2<sup>17</sup>, la cual es indistinguible fenotípicamente de la betalactamasa cromosómica de *P. vulgaris* y *P. penneri*.

Si bien no se ha intentado la caracterización clonal de los aislamientos resistentes analizados, si cabe recordar que corresponden a diversas salas del hospital y que un número importante de ellos proviene de pacientes ambulatorios, parece improbable la diseminación de un único clon.

La metodología recomendada por el NCCLS para detección de BLEE en *E. coli, K. pneumoniae* y *K. oxytoca* resulta adecuada para *P. mirabilis* empleando cefotaxima, así como también el ensayo de doble disco que sería de gran utilidad en los laboratorios que no tienen acceso a métodos cuantitativos.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por las becas: ANPCyT-PICT 06931 a Gabriel Gutkind, UBACyT BO66 a Pilar Santini†, Beca Carillo Oñativia a Gabriel Gutkind y Fundación Roemmers a Marcela Radice.

Gabriel Gutkind es miembro de la carrera de investigador científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

#### Bibliografía

- 1. Liu PF, Gur D, Hall LMC, Livermore DM. Survey of the prevalence of  $\beta$ -lactamases amogst 1000 Gram-negative bacilli, isolated consecutively at The Royal London Hospital. J Antimicrob Chemother 1992;30:429-47.
- 2. Pasteran F, Gagetti P, Galas M, Aguilar J, Melano R, Rapoport M, et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) in *Proteus* spp. in Argentina. Proceedings of the. 40th. annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2000 Sep 17-20; Toronto, Ontario, Canada, 2000; p. 124.
- Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodríguez MM, Costa N, Korbenfeld D, et al. Extended-spectrum β-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:2864-7.
- 4. Bauerfeind A, Stemplinger Y, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of  $\beta$ -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their aminoacid sequences with those of other  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:509-13.
- 5. Rossi A, Gutkind G, Quinteros M, Marino M, Couto E, Tokumoto M, et al. A *Proteus mirabilis* with Novel Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase and 6 different Aminoglycoside (AG) Resistance Genes. Proceedings of the 31st Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Chicago, 1991.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 13th Informational Supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards Document M100-S13; Wayne, 2003.
- 7. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988;10:867-78.

- Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β-lactamases. J Gen Microbiol 1975;88:169-78.
- Rossi A, Lopardo H, Woloj M, Picandet AM, Mariño M, Galas M, et al. Non-typhoid Salmonella spp. resistant to cefotaxime. J Antimicrob Chemother 1995;36:697-702.
- Power P, Radice M, Barberis C, De Mier C, Mollerach M, Maltagliatti M, et al. Cefotaxime-Hydrolysing β-lactamases in *Morganella morganii*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 1999;18:743-7.
- Birboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979;7:1513-23.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional Classification Scheme for β-lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
- Bantar C, Famiglietti A, Goldberg M. Three-Year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. The Antimicrobial Committee, and the National Surveillance Program (SIR) Participants Group. Int J Infect Dis 2000;4:85-90.
- 14. Pasterán F y Red Whonet-Argentina. Tribu Proteeae: Proteus spp., Providencia spp. y Morganella morganii. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología. Servicio de Antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran" Buenos Aires, Argentina 2001;13:61-84.
- Chanal C, Sirot D, Romaszko JP, Bret L, Sirot J. Survey of prevalence of extended spectrum β-lactamases among *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 1996;38:127-32.
- Casellas JM, Radice M, Quinteros M, Power P, Rodríguez M, Pagniez G, et al. Valor de distintos métodos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. Reseñas de Infectología y Vacunas 2000; 1:23-7.
- 17. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1-14.
- Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, et al. Extended- Spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Community and Private Health Care Centers. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:3506-14.
- Bonnet R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J. Diversity of TEM Mutants in *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2671-7.
- 20. Palzkill T, Thomson KS, Sanders CC, Moland ES, Huang W, Milligan TW. New variant of TEM-10  $\beta$ -lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1199-200.
- Pitout JD, Thomson DKS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β-lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:1350-4.
- Morlote MM, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Venkataraman L. Presence of CTX-M-2 in *Proteus mirabilis* isolated of an Israeli Hospital. Proceedings of the 43rd annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy; 2003 sep 14-17; Chicago, Illinois, USA, 2003; p. 110.
- Casellas JM, Altshuler M, Bantar C, Couto E, De Paulis A, Famiglietti A, et al. Recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de SADE-BAC. Asociación Argentina de Microbiología 1993;99:5.