

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

**RESEÑA EVOLUTIVA, CLASIFICACIONES Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAS ENZIMAS  $\beta$ -LACTAMASAS CLAVES EN LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**Raul Navarro-Rosemberg <sup>1,a</sup>

## FILIACIÓN

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú.<sup>a</sup> Médico cirujano, especialista en Patología Clínica.

## RESUMEN

En el presente artículo es una revisión narrativa de la literatura sobre la evolución, clasificación y métodos de detección de las  $\beta$ -lactamasas, enzimas clave en la resistencia bacteriana a antibióticos, con la finalidad de aumentar el interés en torno a estas proteínas, cuyo conocimiento es esencial para un diagnóstico preciso y el desarrollo de estrategias terapéuticas oportunas, especialmente frente a bacterias multirresistentes, que constituyen una causa significativa de morbimortalidad a nivel mundial. Se revisan en detalle las clasificaciones propuestas, los criterios utilizados para categorizarlas estas enzimas, las cuales, ordenadas en un sistema de clasificación, se presentarán más inteligibles. Además, se analizan las secuencias aminoacídicas de algunas proteínas con capacidad  $\beta$ -lactamasas, describiendo las sustituciones que modifican sus espectros de hidrólisis, lo cual es crucial para entender su evolución y las presiones selectivas que han influido en su diversificación. Asimismo, se pone énfasis en la historia y el impacto clínico de estas enzimas en la práctica médica diaria. Aunque se cubre un amplio periodo de la literatura científica, se reconoce la imposibilidad de abarcar todos los aspectos. Finalmente, se invita a los lectores a profundizar en áreas de interés que puedan haber sido abordadas de manera tangencial, con el fin de contribuir a un control más efectivo de la resistencia antimicrobiana.

**Palabras claves:** Revisión, Evolución, Resistencia a Antibióticos, beta-Lactamasas, Caracterización, Molecular, Funcional. (Fuente: DeCS BIREME)

## Citar como:

Navarro-Rosemberg R. Reseña evolutiva, clasificaciones y métodos de detección de las enzimas  $\beta$ -lactamasas claves en la resistencia a antibióticos. Rev Pediatr Espec. 2024;3(3):120-130. doi: 10.58597/rpe.v3i3.80.

**EVOLUTIONARY REVIEW, CLASSIFICATIONS, AND DETECTION METHODS OF  $\beta$ -LACTAMASE ENZYMES KEY TO ANTIBIOTIC RESISTANCE.**

## ABSTRACT

This article is a narrative review of the literature on the evolution, classification, and detection methods of  $\beta$ -lactamases, key enzymes in bacterial resistance to antibiotics. The aim is to increase interest in these proteins, whose knowledge is essential for accurate diagnosis and the development of timely therapeutic strategies, especially against multidrug-resistant bacteria, which are a significant cause of morbidity and mortality worldwide. The proposed classifications and criteria used to categorize these enzymes are reviewed in detail, and their systematic classification is presented to enhance understanding. Additionally, the amino acid sequences of several  $\beta$ -lactamase-capable proteins are analyzed, highlighting substitutions that modify their hydrolysis spectra, which is crucial for understanding their evolution and the selective pressures that have driven their diversification. Emphasis is also placed on the history and clinical impact of these enzymes in daily medical practice. Although a broad period of scientific literature is covered, it is acknowledged that not all aspects can be addressed. Finally, readers are encouraged to explore areas of interest that may have been treated tangentially, in order to contribute to more effective control of antimicrobial resistance.

**Keywords:** Review, Evolution, Antibiotic Resistance, beta-Lactamases, Characterization, Functional, Molecular. (Source: MeSH NLM)

## Correspondencia:

Raul Navarro-Rosemberg  
Correo: [navarro@insn.gob.pe](mailto:navarro@insn.gob.pe)

Recibido: 03/05/2024

Aprobado: 09/09/2024

Publicado: 30/09/2024



Esta es una publicación con licencia de Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es una de las principales amenazas para la salud global, afectando tanto a entornos hospitalarios como comunitarios. La selección de cepas resistentes está dejando ineficaces y obsoletos a muchos antibióticos, generando una “pandemia silenciosa” que, aunque no recibe tanta atención mediática como otras crisis, impacta gravemente la salud pública mundial.<sup>1</sup>

La teoría de la selección natural de Darwin, podría explicar cómo las especies, incluidas las bacterias, se adaptan para sobrevivir en entornos hostiles.<sup>2</sup> Esta teoría, aplicada a la resistencia bacteriana, nos ayuda a comprender cómo las cepas sensibles son desplazadas por cepas resistentes tras la exposición a antibióticos. Además de los plásmidos, las mutaciones inducidas por la presión selectiva también contribuyen a esta resistencia, surgiendo espontáneamente en tasas de una por cada  $10^6$  a  $10^9$  bacterias.<sup>3</sup>

Un mecanismo relevante es la exaptación, fenómeno en el que se presentan caracteres no delineados por la selección natural, vale decir, genes concebidos para otros fines<sup>4</sup> que, ante la exposición de un antibiótico, adquieren una función distinta para la que fue concebida, a saber: la resistencia a antibióticos, es una forma alternativa y complementaria encaminada al entendimiento de la evolución de las bacterias.

La rápida aparición de resistencias tras el uso masivo de penicilina es un claro ejemplo de lo anterior. En 1940 se publicó el primer caso de *Escherichia coli* productora de penicilinasas,<sup>5</sup> una enzima capaz de hidrolizar la penicilina, que hasta ese momento se consideraba una “medicina milagrosa”. Sin embargo, el uso generalizado no regulado del antibiótico con el tiempo condicionó la selección de cepas portadoras de penicilinasas. Desde entonces, este fenómeno ha superado la capacidad de innovación de la industria farmacéutica, haciendo que las resistencias aparezcan más rápidamente que los nuevos tratamientos.

La vigilancia constante de los mecanismos de resistencia es crucial para garantizar que se prescriban los tratamientos más adecuados y para acelerar el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas. En este esfuerzo, la caracterización estructural y funcional de las proteínas involucradas en la resistencia es fundamental. Desde un punto de vista estructural, las características químicas, las secuencias aminoácidas y la conformación terciaria varían entre proteínas; desde un enfoque funcional, los espectros de hidrólisis tienen implicaciones importantes en la práctica clínica diaria. Las proteínas involucradas en la resistencia a antimicrobianos son diversas, abarcando desde proteínas estructurales hasta enzimas con capacidad hidrolítica. Entre estas últimas, las más conocidas y estudiadas son las  $\beta$ -lactamasas.

Los mecanismos de resistencia bacteriana incluyen la modificación del sitio diana, mutaciones en porinas, la hiperexpresión de bombas de eflujo y la producción de enzimas con capacidad hidrolítica sobre los antimicrobianos. En este trabajo nos enfocaremos en las  $\beta$ -lactamasas, enzimas con afinidad por anillos  $\beta$ -lactámicos, cuyo espectro de acción abarca desde penicilinas hasta carbapenémicos.

La clasificación más conocida de  $\beta$ -lactamasas fue propuesta por Ambler, quien inicialmente dividió estas enzimas en clases A y B, para luego agregar las clases C y D a medida que se identificaban nuevas secuencias.<sup>6</sup> Aunque han surgido otras clasificaciones desde los años 70, la de Ambler sigue siendo fundamental para comprender la diversidad de estas enzimas. Estudios que analizan la homología de las secuencias, utilizando programas de alineación como *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), han determinado que, aunque existen discrepancias entre las diferentes clases, todas parecen derivar de una secuencia ancestral común.<sup>6</sup>

No obstante, en la práctica clínica diaria, aún no se conoce si la clasificación de Ambler pueda ser suficiente para guiar las decisiones terapéuticas. En este contexto, la clasificación funcional, que proporciona información sobre los espectros de hidrólisis, se torna de mayor utilidad para la elección de tratamientos. Esta clasificación, propuesta por Karen Bush y modificada posteriormente,<sup>7</sup> agrupa las enzimas según su resistencia o sensibilidad a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. A medida que las enzimas mutan y adquieren un mayor espectro de hidrólisis, se crean nuevas categorías, manteniendo esta clasificación en constante revisión y expansión.

El objetivo de esta revisión es proporcionar un panorama general de los antecedentes históricos, clasificaciones y métodos de detección de las  $\beta$ -lactamasas asociadas a la resistencia a antibióticos en bacilos gram negativos.

## METODOLOGÍA

La presente revisión es de tipo narrativa, no sistemática, que recopiló información con artículos científicos, revisiones, informes técnicos, guías, y trabajos académicos, con bibliografía actualizada que el autor consideró relevante para los objetivos de la revisión. Las fuentes consultadas fueron PubMed, Medline, y entre otras.

## DESARROLLO

### 1. La clasificación de Ambler

En 1980, en un estudio titulado *The structure of  $\beta$ -lactamasas*,<sup>8</sup> Ambler esbozó una clasificación de las  $\beta$ -lactamasas. Para ello, aisló enzimas de diferentes cepas que, por el alineamiento de secuencias, dedujo que eran muy parecidas, sobre todo en las regiones con actividad enzimática (sitio catalítico), y observó que había discrepancias importantes en las regiones N-terminales. Esto determina que, al menos en los sitios catalíticos, la homología de las secuencias sea muy estable. Ambler comparó las secuencias de las enzimas que había catalogado como clase A; así, comparó las secuencias de varias bacterias y tras considerar los puntos isoeléctricos y pesos moleculares, reconoció que todas podían ser incorporadas dentro de una clase, dadas las características comunes que compartían. Por otro lado, una enzima aislada en *B. cereus* reunía características que diferían en peso o tenían un mayor grado de divergencias en las secuencias con la clase A, por lo cual fue necesario incorporarla en una categoría aparte, a saber, la clase B. Estas enzimas dependen, además, de la presencia de  $Zn^{2+}$  para su correcto funcionamiento, característica compartida por los miembros de la clase B.

Posteriormente, hubo la necesidad de incorporar más clases (C y D), las cuales, si se alinean con programas como BLAST, no muestran similitudes, pero estructuralmente sí presentan homologías, lo que lleva a pensar que comparten un ancestro común.<sup>9</sup> Las enzimas metalo- $\beta$ -lactamasas (clase B) no están tan estrechamente relacionadas como las serina-betalactamasas (clases A, C y D), pues hay algunas enzimas de clase B que no pueden ser alineadas.

Si bien las homologías entre las serina- $\beta$ -lactamasas son evidentes, la comunidad científica debió subclasificarlas, debido a las discrepancias encontradas en las secuencias de la misma clase. Por ejemplo, se puede subclasificar la clase A en A1 y A2, de igual manera podría procederse con la clase B, lo que evidencia que la clasificación Ambler debe estar en constante actualización para adaptarse a las nuevas enzimas que se van descubriendo. Un ejemplo de esta vertiginosa aparición de enzimas responsables de resistencias

es el último hallazgo de una enzima desconocida hasta ahora, con naturaleza Ambler B, reportada en la Argentina, específicamente en un aislado de *Chromobacterium violaceum*, llamada CVI-1.<sup>10</sup>

Si pretendemos esbozar una línea evolutiva donde se sitúen las penicilinasas como las primeras enzimas provistas de capacidad hidrolítica sobre  $\beta$ -lactámicos y, en el otro extremo, las carbapenemasas, notaremos que estas enzimas son el resultado de la selección de cepas productoras de enzimas con capacidad hidrolítica creciente, pero que, en la mayoría de los casos, provienen del mismo ancestro.

Es así que encontramos cepas productoras de penicilinasas con un espectro de hidrólisis restringido a penicilinas, y también las IRT u OXA-1 que, al ganar capacidad hidrolítica, afectan las penicilinas y presentan resistencia a la asociación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las enzimas BLEE, con un espectro de hidrólisis más amplio, son, por lo general, derivados de mutaciones de las enzimas con espectro más reducido. Para ofrecer un panorama simple y permita al lector un mejor entendimiento, se han identificado un promedio de 2000 enzimas solo de clase A, como TEM, CTX-M, KPC, etc. Todas descenderían de un ancestro común que, según un estudio,<sup>11</sup> siguiendo un alineamiento de secuencias múltiples (ClustalO), tendrían algunas discrepancias que permitirían agrupar en 6 lados distintos, pero que, en términos de fenotipo, varían desde un espectro reducido a uno tan grande que alcance a carbapenémicos. La diversidad de esta clase es considerable, solo 16 % de identidad entre CfxA y CARB-2 (PSE-1) o PER-1 y 204 % entre PER-1 y varias enzimas CTX-M,<sup>10</sup> entendiéndose por identidad las secuencias con los mismos aminoácidos.

Todo lo anterior revela una gran heterogeneidad, incluso dentro de la misma clase, lo que impacta negativamente al pretender identificarlos por métodos tradicionales. Conscientes de esto, un grupo en la India ha diseñado una técnica, un *Machine-Learning* (aprendizaje automático), cuya precisión es del 100 %. Esta herramienta promete una gran capacidad predictiva de la clase y, por supuesto, orienta al espectro de hidrólisis de la enzima, lo que es decisivo para la toma de decisiones.<sup>12</sup>

## 2. La clasificación de Bush

Hasta que Karen Bush publicó su artículo en 1989, no se había intentado ordenar las enzimas, es decir, tabularlas, según las características del sustrato y su respuesta a la relación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. La clasificación de Bush ofrece información funcional, por cuanto obedece a los espectros de hidrólisis y a su asociación con inhibidores,<sup>13</sup> lo cual permite un mayor orden al categorizar la enzima, posibilita un mejor enfoque clínico y la correlación con su fenotipo en aislados clínicos. Vale decir que las clasificaciones de Bush y de Ambler son análogas.

La clasificación de Bush ha sido sometida a varias actualizaciones, en la medida que se han ido descubriendo enzimas con un espectro más amplio, fruto de la selección de cepas con resistencias a nuevos medicamentos incorporados al arsenal terapéutico. En su primera versión, Bush distinguió dos grupos, los resistentes a la asociación con ácido clavulánico y los no resistentes a dicha asociación. Por tanto, denominó Grupo 1 a las enzimas resistentes a la asociación con ácido clavulánico y que preferían las cefalosporinas como sustrato. Denominó Grupo 2 a las inhibidas por la asociación con ácido clavulánico y cuya subclasificación dependerá del sustrato preferido; por ejemplo, el Grupo 2a hidrolizan penicilinas y el 2b tienen un espectro extendido. El Grupo 3 requiere ion metálico para su actividad enzimática y el Grupo 4 está conformado por penicilinasas no inhibidas por ácido clavulánico.

Sin embargo, fue apareciendo una serie de nuevas enzimas que exigió la modificación o actualización de la clasificación primigenia. En la actualización de Bush, Jacoby y Madeiros<sup>14</sup> de 1995, la estructura general de Bush se conserva, pero, ante el creciente número de enzimas, se fue subclasificando, como ocurrió con el Grupo 2b, donde se incorporaron las derivadas de las enzimas TEM y SHV. Ahora bien, si las enzimas derivan del Grupo 2b, pero además tienen un espectro de hidrólisis ampliado, se las categorizará en el Grupo 2be. Por otro lado, como las enzimas del Grupo 2b comenzaron a demostrar afinidad reducida a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, se las incorporó en la actualización del 2010, dentro del Grupo 2ber, como fue el caso de la TEM 50 o TEM 158.<sup>14, 15</sup>

A la par de la clasificación Ambler, la actualización de Bush del 2010 permite inferir el mecanismo de resistencia subyacente, con lo que se estimaría el probable espectro de resistencia. Es así como, al disponer de clasificaciones adaptadas al panorama de la resistencia actual, la probabilidad de traslucirse el mecanismo es cada vez mejor. Esto, naturalmente, demanda la incorporación de nuevos grupos que contengan enzimas con características diferenciales, como es el caso del Grupo 2ber, referido líneas arriba, o en el caso de los Ambler D, el Grupo 2de, con compromiso de oximino- $\beta$ -lactámicos, y el Grupo 2df, que alcanza a carbapenémicos.<sup>7</sup> Como se puede colegir, esto demuestra el gran dinamismo en la producción de mecanismos de resistencia, que debe ser abordado con actualizaciones constantes; es, pues, indiscutible la necesidad de procurar una nueva versión de la presente clasificación, que, en su intento por conciliar estructura y función, es de suma importancia en la práctica clínica diaria.

## 3. Las enzimas en la resistencia

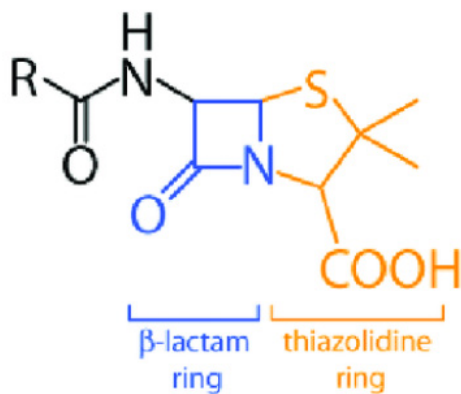
En 1928 Fleming hizo un descubrimiento que dio un giro de 180 grados en la medicina: la penicilina. Tanta fue su repercusión que se destaca como un hito que divide la historia de la humanidad en la era antibiótica y la era preantibiótica. Sin embargo, como suele ocurrir en ciencia, los descubrimientos son alcanzados encaramándose en los descubrimientos de científicos precedentes. El físico inglés John Tyndall, allá por 1875,<sup>16</sup> ya se había topado con la capacidad del hongo *Penicillium* para inhibir el crecimiento bacteriano, pero, como en la época ni siquiera se sabía si las bacterias eran responsables de producir enfermedades en los seres humanos, las investigaciones cesaron para ser retomadas por Fleming 50 años después. El hallazgo fue fortuito. Luego de ver zonas inhibidas de *Staphylococcus* por el crecimiento del *Penicillium*, dedujo que este guardaba un compuesto con capacidad antibacteriana. Las experimentaciones, sin embargo, no hicieron progresos notables, por lo cual, se limitaron a la aplicación de extractos en los ojos, senos maxilares, etc., con resultados halagüeños.

No fue sino hasta inicios de los cuarenta que los investigadores lograron demostrar que la penicilina purificada podía distribuirse por los fluidos corporales con resultados positivos. En 1942, Fleming visitó Oxford y quedó asombrado ante las bondades de la penicilina purificada. Ante la negativa de varias farmacéuticas, excepto AstraZeneca, Fleming solicitó apoyo del gobierno inglés a la sazón en guerra. Fue en Estados Unidos donde se trató el primer paciente con penicilina endovenosa, lo que no desmerece el trabajo colaborativo entre ambos países.<sup>16, 17</sup>

Sin embargo, las bacterias resistentes comenzaron a ser seleccionadas y, dado el uso masivo del antibiótico, comenzaron a hacerse predominantes, esto es, comenzaron a predominar las bacterias portadoras

de enzimas con capacidad hidrolítica de la penicilina, sin perjuicio de otros mecanismos de resistencia.

La penicilina (Figura 1) es un compuesto con un anillo β-lactámico y un anillo tiazolidínico.<sup>18</sup> La cadena lateral izquierda define la capacidad antimicrobiana, mientras que la cadena derecha está asociada con la solubilidad de la molécula. El anillo β-lactámico es esencial para sus propiedades antimicrobianas, pues, mediante un impedimento estérico, oculta el sitio catalítico de las transpeptidasas, enzimas indispensables para mantener firmes las uniones entre aminoácidos, lo que condiciona la producción de polímeros de azúcares complejos firmes, que fomentan la integridad de la pared bacteriana.



**Figura 1.** Estructura química de la penicilina. Se muestran los anillos las cadenas laterales.

Fuente: Watkinson A. Antibiotics and antibiotic resistant bacteria in the aquatic environment: A global issue, an Australian perspective [Doctoral Thesis]. Queensland: University of Queensland, 2008.

Las bacterias portadoras de penicilinasas, seleccionadas por la exposición al antibiótico, tendrán la capacidad de escindir el enlace amida,<sup>15</sup> lo que determina la inestabilidad del anillo β-lactámico, con la consiguiente falta de interferencia de la transpeptidasa.

La penicilina empezó su gran difusión en la década de 1940, y en 1944 se estableció y publicó la relación entre penicilinasas y la resistencia a penicilinas.<sup>19</sup> Desde entonces la escalada de resistencia a antibióticos no ha hecho más que ascender, ora asociado a enzimas, ora a otros mecanismos de resistencia, como la modificación del sitio diana, etc. Este panorama sombrío obligó a la industria farmacéutica a buscar otras alternativas, apuntando a eludir las enzimas hidrolíticas para que, una vez infundidos los antibióticos, sigan interfiriendo con la polimerización de la pared bacteriana. Las penicilinas semisintéticas y las cefalosporinas son un ejemplo de esos esfuerzos, pues con la modificación de la configuración espacial de la molécula se hace más inaccesible el enlace amida, lo que garantiza la estabilidad de la molécula con la consiguiente transpeptidación normal del peptidoglicano.

No obstante, conforme se va ampliando el arsenal terapéutico, se seleccionan las bacterias expuestas a la presión selectiva, las cuales expresan fenotipos de resistencia; esto a su vez empuja a la industria hacia la elaboración de nuevas moléculas. De otro lado, los ancestros de los β-lactámicos se remontarían a miles de años atrás y se habrían producido en respuesta a los β-lactámicos ambientales.<sup>20</sup>

Las penicilinasas, por tanto, son β-lactamasas con espectro estrecho capaces de hidrolizar el anillo β-lactámico de las penicilinas y sensi-

bles a la asociación con inhibidores de las β-lactamasas. Se identificaron también penicilinasas que alcanzaban a hidrolizar la asociación con inhibidores de β-lactamasas, las que se llamaron IRT. Estas enzimas comparten secuencias y sus mutaciones son las responsables de ampliar el espectro de hidrólisis. En la década de 1960, apareció la enzima TEM-1, caracterizada por hidrolizar hasta las primeras generaciones de cefalosporinas.<sup>21</sup> Desde entonces se han reportado variantes de este TEM ancestral y esto ha ido condicionando un aumento en el espectro de hidrólisis. Este cambio de espectro depende de sustituciones simples de hasta uno o dos aminoácidos, tal como lo exponen José-Luis Morales *et al.*, quienes alinearon secuencias de dos enzimas TEM-1 y TEM-10, ambas muy cercanas en alineación (discrepancia de solo 2 aminoácidos que no son iguales ni de naturaleza química parecida, es decir, no hay similitud ni identidad). En la Figura 2, se aprecian las sustituciones aminoacídicas verificadas entre TEM-1 y TEM-10.<sup>22</sup>

	70	80	90	100	110	120
TEM-1	EE	RF	FM	ST	FK	VLL
TEM-10	EE	RF	FM	ST	FK	VLL
C4	EE	RF	FM	ST	FK	VLL
C11	EE	RF	FM	ST	FK	VLL
	130	140	150	160	170	180
TEM-1	CS	AA	IT	MS	DN	TA
TEM-10	CS	AA	IT	MS	DN	TA
C4	CS	AA	IT	MS	DN	TA
C11	CS	AA	IT	MS	DN	TA
	190	200	210	220	230	240
TEM-1	PA	AM	AT	LR	KL	TG
TEM-10	PA	AM	AT	LR	KL	TG
C4	PA	AM	AT	LR	KL	TG
C11	PA	AM	AT	LR	KL	TG
	250	260	270	280		
TEM-1	SR	GI	IA	AL	GP	-DG
TEM-10	SR	GI	IA	AL	GP	-DG
C4	SR	GI	IA	AL	GP	-DG
C11	SR	GI	IA	AL	GP	-DG

**Figura 2.** Se aprecian las sustituciones en aminoácidos en la posición 164 y 240.<sup>23</sup> Fuente: Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de β-lactamasas plasmídicas de espectro extendido. 2005. Control de calidad. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Se muestra, además, que no hay similitud ni identidad entre los aminoácidos discrepantes en la posición 164 y 240, pues una arginina cambia por una serina en el primero, y un ácido glutámico por una lisina en el segundo. De aquí se intuye que las sustituciones de uno o dos aminoácidos con naturaleza química distinta influyen significativamente en el espectro de hidrólisis.<sup>23</sup>

Evidentemente, conforme se van agregando más sustituciones, mayor será el espectro de hidrólisis que exhibirá la enzima. Para el caso de las enzimas BLEE, son muchas las identificadas y la mayoría deriva de penicilinasas como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las mutaciones del centro activo cambian el espectro de hidrólisis, virando de un espectro limitado a penicilinas a un espectro que alcanza cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y aztreonam. Sin perjuicio de las BLEE plasmídicas, existen enzimas que pueden dar el mismo fenotipo, pero las de localización cromosómica se presentan de forma natural en algunas especies del género *Kluyvera*. El caso más elocuente es la CTX-M, que deriva de estas especies, exhibe un fenotipo BLEE y que es la enzima con un espectro ampliado más predominante en la actualidad.<sup>23</sup> Históricamente, la primera enzima identificada con espectro ampliado fue la SHV-2, reportada en Alemania en 1983, y sensible a las cefamicinas, los carbapenémicos y a la asociación con inhibidores de β-lactamasas. Cuando analizamos la clasificación de Bush, sostuvimos que algunas enzimas con espectro BLEE, como la TEM-50, son resistentes a la asociación con inhibidores de β-lactamasas.



Las CTX-M también presentan variantes, las primeras tienen mayor afinidad por la cefotaxima; sin embargo, las variaciones han ido ganando mayor capacidad hidrolítica sobre la ceftazidima, como sucede con las CTX-M-15, CTX-M-16 y CTXM27. En la Figura 3, se observa el grado de discrepancia mínimo de las secuencias aminoacídicas entre las CTX-M-3 y las CTX-M-15, se reconoce solo un aminoácido divergente, a saber, el ácido aspártico por glicina en la posición 243.<sup>24</sup>

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment

KU200455	PMVKKSLRQFTLMATATVTLILGSLVFLYAQTADVQKLAELERQSGGRLGVALINTADNS	60
Y10278	-MVKKSLRQFTLMATATVTLILGSLVFLYAQTADVQKLAELERQSGGRLGVALINTADNS	59
AY044436	-MVKKSLRQFTLMATATVTLILGSLVFLYAQTADVQKLAELERQSGGRLGVALINTADNS	59
*****		
KU200455	QILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLRKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGT	120
Y10278	QILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLRKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGT	119
AY044436	QILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLRKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGT	119
*****		
KU200455	MSLAELSAALQYSDNVAMNKLIHVGGPASVTFARQLGDETFRDLRTEPTLNTAIPGD	180
Y10278	MSLAELSAALQYSDNVAMNKLIHVGGPASVTFARQLGDETFRDLRTEPTLNTAIPGD	179
AY044436	MSLAELSAALQYSDNVAMNKLIHVGGPASVTFARQLGDETFRDLRTEPTLNTAIPGD	179
*****		
KU200455	PRDTSFRAMAQTLRNLTLGRALGDSQRAQLVTWVGKNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTG	240
Y10278	PRDTSFRAMAQTLRNLTLGRALGDSQRAQLVTWVGKNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTG	239
AY044436	PRDTSFRAMAQTLRNLTLGRALGDSQRAQLVTWVGKNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTG	239
*****		
KU200455	SCDYGTNDIAVIWPKDRAFLILVTTYFTQPQKAEARRDVLASAARKIVTDGL 292	
Y10278	SCDYGTNDIAVIWPKDRAFLILVTTYFTQPQKAEARRDVLASAARKIVTDGL 291	
AY044436	SCDYGTNDIAVIWPKDRAFLILVTTYFTQPQKAEARRDVLASAARKIVTDGL 291	
*****		

**Figura 3.** Entorno genético y localización del gen blaCTX-M en cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos. Fuente: Carrasco Anabalón SA. Entorno genético y localización del gen blaCTX-M en cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos. Tesis [trabajo de grado]. Universidad de Concepción, Chile, 2017

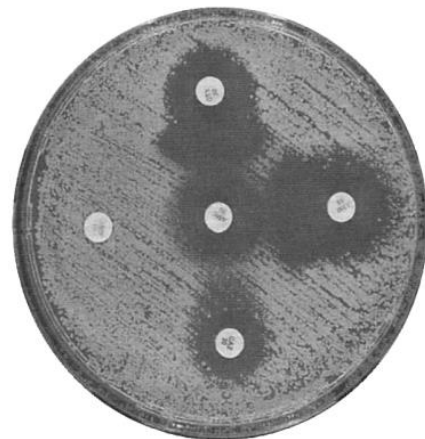
Se han identificado, además, 3 nucleótidos divergentes en las secuencias del gen de la enzima CTXM3 y CTX-M-15, que, al analizar su correlato proteico, solo incide en un aminoácido diferente. Esto encontraría explicación en el hecho de que las otras sustituciones nucleotídicas no perturban los codones, de modo que el aminoácido seguirá siendo el mismo. Como se mencionó anteriormente, la sustitución de los 3 nucleótidos en diferentes posiciones solo determina un cambio aminoacídico en la posición 243, pues la alteración de los otros codones sigue dando el mismo aminoácido (degeneración del código genético). El cambio en el nucleótido de la posición 789 es el responsable de la perturbación completa del codón, con el consiguiente cambio de ácido aspártico por glicina.<sup>24</sup>

En la actualidad, la enzima CTX-M-15 es la más prevalente en todo el mundo y tiene algunas características diferenciales, al margen del espectro BLEE, con respecto a otras variantes, pues se ha reportado una tasa alta de resistencia a las quinolonas.<sup>25</sup>

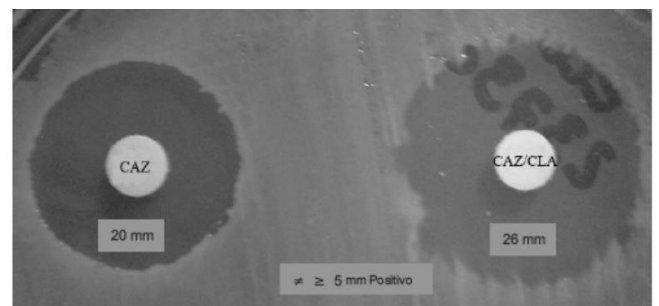
### 3.1 β-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Este tipo β-lactamasas son enzimas con un espectro de hidrólisis que compromete penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, y, según la identidad de la enzima, se pueden predecir fracasos terapéuticos a otros grupos de antimicrobianos. El caso de la CTX-M15 y la resistencia a las quinolonas se explicaría por la transmisión conjunta del gen de la enzima con el gen qmB.<sup>26</sup> Esto revela que las bacterias portadoras de enzimas de espectro extendido suponen altas tasas de morbilidad y mortalidad en los ambientes hospitalarios, por lo que su identificación en el laboratorio es una prioridad en la medida que permita dar tratamiento oportuno e implementar las medidas de aislamiento necesarias para evitar la dispersión.<sup>15</sup>

Los métodos fenotípicos de identificación se basan en la capacidad de respuesta de estas enzimas la asociación con inhibidores de β-lactamasas (ácido clavulánico) y demoran, como mínimo, 48 horas; por tanto, desde que ingresa el espécimen al laboratorio hasta el reporte del antibiograma, suelen pasar más de 48 horas. Están descritos varios métodos que aprovechan la propiedad de inhibición de la enzima ante la asociación con ácido clavulánico, por ende, tanto los métodos cuantitativos como los cualitativos se basarán en la detección de la longitud del halo o los MIC, por un lado, con el antibiótico de amplio espectro solo, y por otro, con la asociación con ácido clavulánico. El método de discos combinados, aproximación de discos, microdilución y E test son, en la mayoría de los casos, los métodos más utilizados en los laboratorios clínicos. El método de doble disco (Figura 4) aproxima cefalosporinas de amplio espectro a un disco de amoxicilina más ácido clavulánico, el cual, en las cepas próximas, induce sinergia, lo que se traduce en un aumento del halo de inhibición de las cefalosporinas de amplio espectro. En segundo término, los discos combinados (Figura 5) también destacan la sinergia con el ácido clavulánico y se establece una probable BLEE cuando, habiendo hecho la resta de los halos de la cefalosporina de amplio espectro sola y la cefalosporina con la asociación, se obtiene una diferencia de más de 5 mm.<sup>26</sup> Debido a que no siempre las BLEE producen incrementos de los MIC a niveles de resistencia, el método de aproximación de discos y el de discos combinados son una alternativa rápida y rentable.<sup>27</sup>



**Figura 4.** Prueba de aproximación de discos, o prueba de doble difusión por discos. Fuente: García-Hernández A, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero J, et al. Bacteremia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamasas (ESBL): clinical relevance and today's insights. Rev Esp Quimioter. 2011;24(2):57–66.



**Figura 5.** Método de discos combinados. Una diferencia mayor de 5 mm es altamente sugestiva de BLEE. Fuente: Perozo Mena AJ, Castellano González MJ. Detección de Betalactamasas de espectro extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. Kasmera [Internet]. 2009;37(1):25–37.

La microdilución en caldo y el E test son pruebas cuantitativas utilizadas para determinar el MIC. El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés),<sup>26</sup> en su trigésimo tercera edición, recomienda la microdilución y el método de discos combinados (Figura 5) como métodos fenotípicos para la detección de BLEE.

Sin duda, los métodos moleculares están ganando terreno en los laboratorios clínicos; sin embargo, su expansión se limita por su alto costo. Es probable que, a mediano plazo, una reducción del costo permita el uso generalizado de estos métodos y se obtenga así un diagnóstico mucho más preciso. Los métodos moleculares aluden a todas las pruebas de detección de secuencias de ácidos nucleicos, es decir, para detectar especies y genes de resistencia. Con esta finalidad, se puede utilizar la secuenciación, la PCR, etc.

Actualmente, el método molecular más difundido, por su rapidez y precio, es la PCR. Las PCR de primera generación consisten en la extracción del material genético, seguido de la amplificación y el análisis con electroforesis del producto final, es decir, el amplicón. Este proceso puede demorar hasta 12 horas, lo que dilataría la obtención del informe de resultados. Esta dificultad fue salvada por la PCR en tiempo real (qPCR), pues, a medida que se va amplificando la secuencia diana, sugiere mediante la emisión de fluorescencia una idea de la concentración del amplicón, lo que reduce significativamente el tiempo de detección de la secuencia diana.

Tanto han calado en la práctica diaria estas ventajas, que se han propuesto qPCR con capacidad de detectar secuencias de genes de resistencia directamente de especímenes clínicos (hisopados rectales), pero, dado que con estos métodos se ha identificado una alta tasa de falsos positivos, se recomienda usarla en contextos de alta prevalencia y limitándose a una prueba de tamizaje, en atención a su rapidez. Esta prueba no excluye la confirmación, que puede realizarse con métodos fenotípicos o con métodos de secuenciación.<sup>29</sup>

Se ha incorporado la PCR múltiple, con la posibilidad de detectar varios tipos de BLEE y de enzimas, como las carbapenemasas, que ofrece una ventaja inestimable para el tamizaje de enterobacterias, por tratarse de pruebas de procesamiento rápido.<sup>30</sup> Con el ánimo de reducir aún más el tiempo o franquear la dificultad que supone implementar pruebas costosas como la qPCR, algunos investigadores afirman que utilizar la PCR convencional con tecnología CRISPR-cas es una alternativa válida para laboratorios con recursos limitados.<sup>31</sup>

Los microarreglos también son una alternativa molecular. Son pruebas de hibridación en fase sólida, que presentan inmovilizada la sonda y permiten detectar un margen amplio de enzimas, al reconocerse complementariedad entre la sonda fija y la secuencia de nucleótidos. Sin embargo, esta prueba depende de un PCR previo con cebadores universales, que luego son clasificados según la complementariedad de las sondas. En el artículo publicado por Lascols C,<sup>32</sup> en la tabla 1 se correlacionan los resultados de los microarreglos y la secuenciación. Aquí se verifica que, al ser reconocida la secuencia de estudio por una sonda específica de SHV, en la secuenciación se logró reconocer el 94,7 % de diversas variedades de SHV, incluso genes SHV sin espectro BLEE.<sup>32</sup> De lo anterior se colige que las pruebas de microarreglos tienen un buen rendimiento. No obstante, algunas variantes nuevas no podrán ser reconocidas por las sondas de los microarreglos, lo cual impone que se siga realizando la secuenciación. Los microarreglos pueden ser actualizados sobre la base de la elaboración de nuevas sondas específicas de variantes.

En relación con la proteómica, su avance y difusión es cada vez mayor, sobre todo debido a que ofrece resultados precoces conducentes a la identificación. Asimismo, según algunos protocolos, tiene la capacidad de detectar mecanismos de resistencia. Existen varias modalidades; estas se enfocan en los picos de las formas hidrolizadas y no hidrolizadas o en la identificación de las mismas proteínas efectoras de resistencia, según el peso molecular.<sup>33</sup> Estos avances suponen la posibilidad de reportar etiología y mecanismos de resistencia en tiempos óptimos para la administración eficaz de antibióticos. Las enzimas susceptibles de ser identificadas por los métodos proteómicos, más precisamente por el sistema de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés), no solo son las BLEE, sino también las AmpC y las carbapenemasas.

En suma, los métodos proteómicos presentan muchas ventajas de las cuales el tiempo, parámetro que determina el pronóstico del paciente y que es una prioridad en los laboratorios de microbiología, será determinante para que los métodos tradicionales se vean desplazados por esta prometedora herramienta. Sin embargo, por lo menos desde una proyección inmediatista, hasta que no se complete su validación y estandarización, estos métodos permanecerán relegados a un complemento sin poder prescindir todavía de los métodos tradicionales.

Los métodos tradicionales fenotípicos, como la aproximación de discos o la de discos combinados, junto con los sistemas automatizados tipo Vitek<sup>®</sup>2, son todavía métodos de referencia, aunque con algunas salvedades con respecto a los sistemas automatizados en general. En una comparación entre sistemas de uso común en los laboratorios, como el Vitek<sup>®</sup>2 y Phoenix<sup>®</sup>, arrojó que el Vitek<sup>®</sup>2 tenía mejor sensibilidad que el Phoenix<sup>®</sup>, en concreto durante la identificación de la BLEE en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.<sup>34</sup>

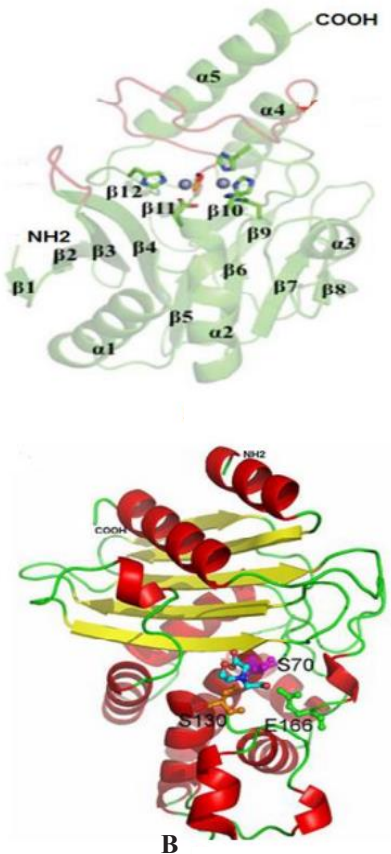
### 3.2 Carbapenemasas

Durante la evolución de las enzimas, se producen sustituciones en la secuencia que acumula diferentes identidades de enzimas, que, en virtud de su capacidad de conferir ventaja evolutiva, se seleccionan las enzimas con un espectro de hidrólisis mayor, alcanzando incluso antimicrobianos como los carbapenémicos. Las enzimas seleccionadas por la bacteria en respuesta a la presión selectiva, o sea, la exposición a carbapenémicos, hidrolizarán estos, limitando significativamente el arsenal terapéutico, lo que destaca como un grave problema de salud pública. En un inicio, se circunscribía a determinadas regiones geográficas, mas en los últimos años se ha observado la expansión de las cepas portadoras de carbapenemasas. Según Ambler, las carbapenemasas se dividen en tres clases, según sus características moleculares: A, B y D, las que se denominan, también, serina-carbapenemasas, metalo- $\beta$ -lactamasas y OXA, respectivamente.

En un intento por relacionar las enzimas con espectro que alcanza a carbapenémicos, se secuenció y alineó las secuencias de aminoácidos de las enzimas usando sistemas BLAST. De este experimento se obtuvo que las secuencias eran disímiles si se comparaban blaKPC con blaNDM-1 (Figura 6 A). No se aprecia un alto grado de identidad ni de similitud, y el NDM-1 presenta mutaciones, sobre todo, en puntos críticos de la enzima, a diferencias de las KPC.<sup>35</sup> Además, las estructuras cristalizadas (Figura 6 B) confirman que, en efecto, las secuencias difieren considerablemente en sus estructuras terciarias y constituyen un reflejo de las secuencias discrepantes. Por otro lado, las secuencias encuadradas (Figura 6 B) son los sitios activos de las KPC, pues se evidencian serinas.

	1	10	20	30	40	50	60	
b1aKPC-1	MSLYRRLVLLSCLSWPLAG	FSAATALNIVAE	PPFAKLEQDPFGSGIVYAMDT	GSGATVSYR	60			
b1aNDM-1	MELPNIMHPVAKLSTALAAALMISGCM	FGEIIRPTIQQMETGDQRF	GDLVFRQLAPNVWQ	60				
b1aKPC-1	AEERFPLCS	SFKGFLAAAVLAR	SQQQAGLLDTP	IRYGNALVFW	SPISSEKYLTTG	MTVAE	120	
b1aNDM-1	HTSYLDMFG	FQAVASNGLI	VRDGGKVLVVD	TAMTDDQTAQILN	WIKQEINL	FVALAVVTH	120	
b1aKPC-1	LSAAVQF	STDAANLLKELGGP	AGLTAEMRSIGTT	TPFLDRWELLSA	IPSTARDTS	180		
b1aNDM-1	AHQQWQEM	IALHAAQIATYANAL	ENQLAPQGGVAAQHS	LTTPAANGWVEPAFA	HPFPL	180		
b1aKPC-1	SPRAVTE	SLQKLTLGSALA	APQRFVDWLK	GNITGNHR	IRAAVPA	DWAVGDKTGT	CGVY	240
b1aNDM-1	KVFYFGP	GHTSDNITV	IGDIDIA	FGGCLIKDSKAKS	LGNLGDA	DTEHYAASARAF	GAAF	240
b1aKPC-1	GTANDYAVV	WFTGRAPIVLAVY	TRAPNKDKHSEAVIA	AAAAARLAL	ELGLVNGQ	292		
b1aNDM-1	PKASMI	VMSHSAFDSRAAI	THTAR	MADKLR	270			

A



B

**Figura 6 A.** Alineamiento entre secuencias aminoacídicas de KPC y NDM. Se aprecia que las secuencias no son similares. **B.** Estructuras cristalizadas de KPC y NDM. Se confirma que las secuencias no son similares, dado que las estructuras terciarias son disímiles. Fuente: Chakraborty AK. In silico analysis of hotspot mutations in the bacterial NDM-1 and KPC-1 carbapenemasas that cause severe MDR phenotypes. *Biochem Biotechnol Res.* 2016;4(1):17-26.

La primera carbapenemasa transferible, es decir, la primera carbapenemasa con importancia epidemiológica, se rastreó en Japón en 1991. Fue una carbapenemasa plasmídica detectada en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, con naturaleza metalo-β-lactamasas, es decir, un Ambler B y, según Bush Jacoby, del Grupo 3. La enzima recibió el nombre de IMP-1 (por imipenemasa) y se la localizó en el integrón de un plásmido. En consecuencia, podemos afirmar que la primera carbapenemasa plasmídica se descubrió en 1991, sin perjuicio de la primera carbapenemasa cromosómica descubierta en 1982, una enzima Ambler A, y se la nombró enzima *Serratia marcescens* (SME). En 1997, se descubrió en Italia otra enzima con las mismas características moleculares y funcionales, y recibió el nombre de metalo-β-lactamasas codificadas por el integrón Verona (VIM1).<sup>15</sup>

En 1996, en Estados Unidos, se aisló una cepa portadora de carbapenemasa Ambler A, perteneciente al Bush 2f, que terminó expandiéndose por todo el mundo.<sup>36</sup> En términos generales, la identificación molecular y funcional de la enzima es crucial, en la medida en que permitirá predecir la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, ante infecciones de cepas portadoras de KPC, es muy eficaz la asociación ceftazidima más avibactam, recientemente aprobada por la FDA en 2015; sin embargo, las metalo-β-lactamasas son resistentes a esa asociación. No obstante, existen enzimas KPC que, si bien son sensibles a la asociación CAZ/AVI, ya se van caracterizando como resistentes a dicha asociación. Variantes de KPC- 2 y KPC-3 tienen demostrada elevación de resistencia a CAZ/AVI, lo que demuestra que, en términos de resistencia, no hay nada inmutable.<sup>36</sup>

Dicho esto, se confirma la necesidad de implementar métodos de detección de enzimas que ofrezcan al médico clínico las herramientas y los insumos necesarios para una adecuada intervención terapéutica. Los métodos de detección pueden dividirse en fenotípicos, que son los más difundidos, y genotípicos. A continuación, presentamos una revisión tangencial de los métodos fenotípicos e información sobre los métodos genotípicos.

El CLSI<sup>26</sup> consigna la necesidad de desarrollar pruebas rápidas como método de screening. Para ese fin propone el Carba NP que, en menos de dos horas, permite predecir la presencia de carbapenemasas. En Latinoamérica está más popularizada una variante del Carba NP, llamada Blue Carba®, que es más sencilla de realizar técnicamente. En las dos técnicas anteriores su rendimiento baja sustancialmente ante la presencia de carbapenemasas tipo OXA, pues puede demorar el viraje de color o, lo que es más preocupante, dar la prueba negativa. Por lo tanto, hay que tener mucho cuidado cuando, por el perfil de resistencia del antibiograma o por el estudio de cepas de la bacteria *Acinetobacter baumannii*, se sospeche la presencia de carbapenemasas tipo OXA.

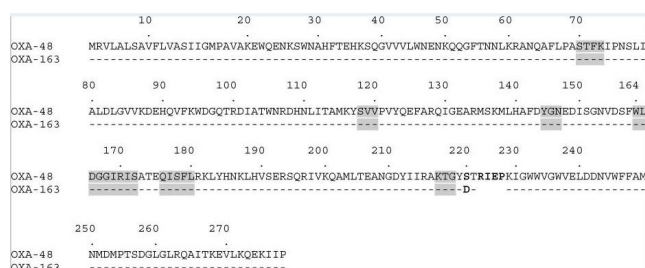
Inmediatamente después se somete la cepa de estudio a pruebas dependientes de cultivos para lo que se requiere más tiempo. El CLSI recomienda complementar el Carba NP con un método de inactivación de carbapenémicos (mCIM), para luego, ante un resultado de positivo, se le complemente con las pruebas de sinergia con ácido borónico o EDTA, en aras de determinar la naturaleza de la enzima. Existen presentaciones como el eCIM, que permiten detectar enzimas con capacidad carbapenemasas y, a la vez, discriminar enzimas con naturaleza metaloβlactamasas. Estas pruebas son también dependientes de cultivo, por lo que se requieren varias horas de incubación. Completado este flujo, se puede indagar la naturaleza de la enzima responsable de la resistencia a carbapenémicos. Posteriormente, la inmunocromatografía detecta la identidad de la enzima; de esta manera, termina el flujo de estudio de la carbapenemasa.

A fin de ejemplificar el flujo de investigación de cepas portadoras de carbapenemasas, analizaremos un caso concreto, el de la *Klebsiella pneumoniae*, con un perfil de resistencia compatible con carbapenemasas, por la hidrólisis de penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Se halló sensibilidad a CAZ/AVI en el antibiograma y, debido a la resistencia a carbapenémicos, se justificó la realización de Blue-Carba, el cual salió positivo. Seguidamente, el mCIM dio positivo, y la prueba de sinergia con ácido borónico también fue positiva. Teniendo en cuenta que el ácido borónico es un inhibidor de las enzimas Ambler A y analizando lo anterior, como la sensibilidad a CAZ/AVI, la sospecha se cernió sobre una KPC. Esto se demostrará cuando se identifique la enzima en la inmunocromatografía o, si fuera el caso, en las pruebas moleculares.



Si los métodos Blue-Carba y mCIM resultan positivos, se verifica sinergia con el EDTA durante las pruebas de sinergia, y si, además, hay resistencia a CAZ/AVI con sensibilidad a aztreonam, la sospecha recae sobre una metalo-β-lactamasa. Naturalmente, se hace necesario identificar la enzima con una prueba inmunocromatográfica. Este grupo de enzimas viene, por lo general, con un espectro de hidrólisis que no se limita a los β-lactámicos, sino que, debido a otros genes presentes en los *cassettes* de transmisión, puede alcanzar otros grupos de antimicrobianos, como los quinolonas o los aminoglucósidos.

Ahora bien, si el BlueCarba resulta negativo o con un viraje tardío y, además, se muestra negativo a las pruebas de sinergia con EDTA y ácido borónico, y con sensibilidad a CAZ/AVI,<sup>37</sup> se debe sospechar una OXA, sobre todo, si la cepa de estudio es un *Acinetobacter baumannii*. El antibiograma conduce a sospechar el mecanismo de resistencia y si se evidencia sensibilidad a las cefalosporinas de amplio espectro (tercera y cuarta)<sup>38</sup> con niveles bajos de resistencia a carbapenémicos, la posible responsable será la OXA-48. Esto se demuestra con la inmunocromatografía o con las pruebas moleculares. Sin embargo, hay algunas circunstancias en las que pueden resultar las pruebas negativas en la investigación de carbapenemasas, incluso con la inmunocromatografía, pese a que el antibiograma presenta resistencias a los carbapenémicos. En estos casos, además de descartar la posibilidad de otros mecanismos de resistencia, como la mutación de porinas o la hiperexpresión de bombas de flujo, es necesario descartar la presencia de otros tipos de OXA. La OXA163 es de naturaleza plasmídica, por lo que entraña importancia epidemiológica, y presenta un perfil de hidrólisis que compromete cefalosporinas de amplio espectro, pero con una capacidad más baja que la OXA48 para hidrolizar carbapenémicos.<sup>39</sup> En la Figura 7, se alinean las secuencias de la OXA48 y la OXA163, y en el óvalo azul se puede apreciar una sustitución y una región de 4 aminoácidos delecionados en el caso de la OXA163. Esto confirma lo observado líneas arriba, que las sustituciones mínimas pueden afectar significativamente el perfil de hidrólisis de la enzima. La sustitución identificada en un aspartato por una serina, que presenta propiedades químicas distintas, descarta similitud y menos identidad. La enzima OXA23 es de naturaleza plasmídica y cromosomal; en la actualidad, se aprecia que tiene una gran capacidad de expansión global.<sup>40</sup> Su perfil de resistencia alcanza la ceftazidima, con altos MIC, el imipenem y el meropenem. La OXA51 es un gen intrínseco del *Acinetobacter baumannii*, cromosomal, que, ante la movilización de secuencias de inserción, puede hiperproducirse.



**Figura 7.** Alineamiento de secuencias aminoácidas del OXA 48 y OXA 163. Fuente: Poirel L, Castanheira M, Carrère A, Rodríguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-Related Class D β-Lactamase with Extended Activity Toward Expanded-Spectrum Cephalosporins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011; 55(6):2546-51.

En conclusión, en el estudio de las OXA, es posible encontrar pruebas de screening negativas para la investigación de carbapenemasas y pruebas de sinergia también negativas, habida cuenta que no hay

inhibidores específicos. Si la inmunocromatografía arroja un valor negativo, se deben sospechar las OXA mencionadas anteriormente. La sospecha será dirimida por una prueba molecular, ya que las pruebas fenotípicas tradicionales no son de utilidad en estos casos.

Las pruebas moleculares son una herramienta de gran ayuda en la detección de genes de resistencia, incluidas las carbapenemasas Ambler D. Para tal fin se utilizan cebadores específicos y, una vez hibridados, comienza la acumulación del amplicón, el cual se medirá según la generación de la PCR aplicada. En una PCR de punto final, se estudia el amplicón en una prueba de electroforesis, mientras que, en una PCR en tiempo real, el amplicón se deduce de la cantidad de fluorescencia emitida. En el artículo publicado por Cuaical Ramos NM., se muestra las secuencias de algunos cebadores desarrollados, además del análisis del amplicón en electroforesis. Se exponen las secuencias de los cebadores para la detección de OXA 51, seguido del análisis del amplicón en electroforesis. En la posición tres se puede apreciar el control positivo para OXA 51.

Hasta aquí podemos reconocer con facilidad varias dimensiones diagnósticas, de acuerdo con el hallazgo. Primero, las basadas en el crecimiento, como el método de inactivación de carbapenémicos modificado; segundo, los métodos que dependen de la medición de productos de degradación de los carbapenémicos, como MALDI-TOF o Carba-NP; tercero, los métodos encaminados a la detección de genes de resistencia mediante la amplificación o la secuenciación, es decir, los métodos moleculares; y por último, los métodos de dependen de anticuerpos, como la inmunocromatografía. El flujo para utilizar dependerá de factores como el tiempo de respuesta, que, en la realidad de los laboratorios de microbiología, es uno de los factores más determinantes, pues condiciona consecuencias tanto clínicas como epidemiológicas. Sin embargo, ninguno de los métodos listados cumple con todo lo necesario para ser una prueba rápida y suficiente para la identificación de carbapenemasas. El BlueCarba, por ejemplo, es una prueba de gran sensibilidad, pero necesita ser complementado con una serie de pruebas en tándem para llegar a la identidad de la carbapenemasa. En este panorama, la espectrometría de masas (MALDI-TOF) es una herramienta rápida y se puede incorporar en los algoritmos según el contexto del laboratorio.

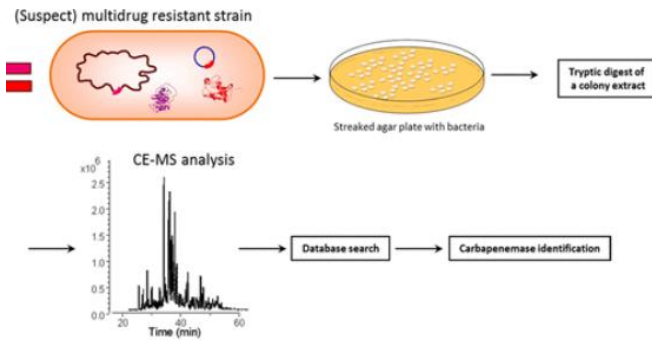
El MALDI-TOF puede utilizarse para la detección de carbapenemasas a partir de dos enfoques. El primer enfoque que, aún no ha sido estandarizado, busca detectar productos de hidrólisis de carbapenémicos al incubarse con extractos de proteínas de cultivos; el segundo enfoque es el enfoque de pico asociado a plásmidos y se fundamenta en la detección de los picos proteicos de plásmidos asociados a la resistencia a carbapenémicos. Este tiene un tiempo de respuesta de 4 horas, con sensibilidades entre 77 % y 100 %, y una especificidad entre 94 % y 100 %.<sup>42</sup>

En la Figura 8, se comparte *grosso modo* el flujo de trabajo para los dos enfoques aplicados a la espectrometría de masa, la cual se presenta como una alternativa valiosa en los flujos de estudio en los laboratorios de microbiología de todo el mundo.

Lo anterior resume las aristas involucradas en la detección de carbapenemasas, enzimas de repercusión clínica y epidemiológica significativa, lo que pone al laboratorio de microbiología en una posición relevante para la toma de decisiones de impacto; por lo mismo, necesita nutrirse de la mayor cantidad de métodos de vanguardia.

La Figura 9, se observa el flujo adoptado por la mayoría de los laboratorios de Microbiología para la investigación de carbapenemasas<sup>44</sup>.





**Figura 8.** Flujo de trabajo para la espectrometría de masas, orientada a la detección rápida de proteínas asociadas a resistencia. Fuente: Fleurbaaij F, Heemskerck AA, Russcher A, Klychnikov OI, Deelder AM, Mayboroda OA, Kuijper EJ, van Leeuwen HC, Hensbergen PJ. Capillary-electrophoresis mass spectrometry for the detection of carbapenemases in (multi-)drug-resistant Gram-negative bacteria. *Anal Chem.* 2014;86(18):9154-61.

## CONCLUSIÓN

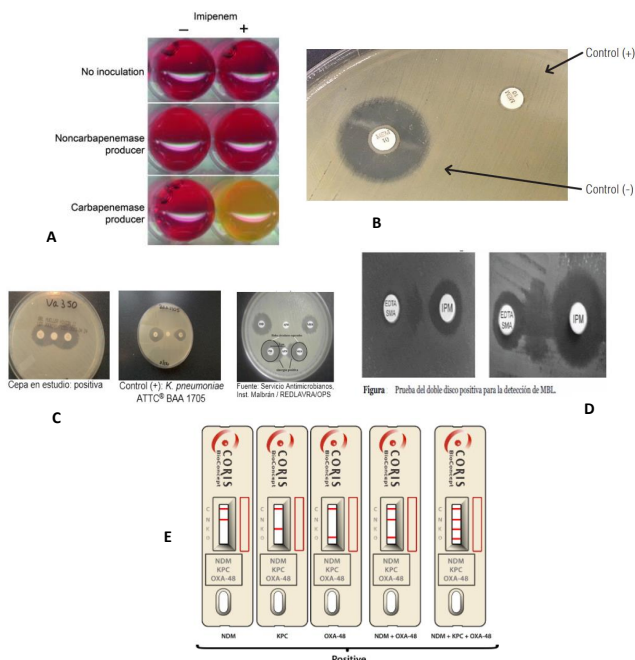
La resistencia a los antibióticos es un problema en aumento que representa un desafío significativo tanto para la industria farmacéutica y los sistemas sanitarios. Por ello, es urgente no solo fortalecer la capacidad de producción de nuevos antibióticos, sino también explorar estrategias alternativas para eliminar bacterias con mecanismos de resistencia. Para lograr esto, es fundamental un conocimiento profundo de las moléculas involucradas en la resistencia, lo que permitirá diseñar estrategias de tratamiento efectivas contra estas bacterias, que se han convertido en una causa importante de morbilidad a nivel mundial.

Esta revisión se ha enfocado acerca del mecanismo enzimático de resistencia, que en bacterias Gram negativas es el más prominente. Las enzimas con afinidad por los enlaces amida del anillo  $\beta$ -lactámico son responsables de un espectro de hidrólisis que abarca desde las penicilinas hasta las cefalosporinas, y en el caso de las  $\beta$ -lactamasas más avanzadas, incluso los carbapenémicos. A pesar de las diferencias en sus espectros de acción, la mayoría de estas enzimas derivan de un ancestro común, por lo que presentan cierta homología en sus secuencias aminoacídicas. Sin embargo, las diferencias en las secuencias de los sitios catalíticos determinan la variedad en sus espectros de hidrólisis.

**Fuente de financiamiento:** Autofinanciado por el autor.

**Conflicto de interés:** El autor declara no tener ningún conflicto de interés.

**Contribuciones del autor:** RNR se encargó de la conceptualización, diseño de metodología del estudio, redacción, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito



**Figura 9.** En la figura A) se ilustra el CARBA-NP, el cual es un método que usa el producto de hidrólisis para la detección. B) Se aprecia la interpretación de mCIM. C) y D) son los métodos fenotípicos de sinergia que permite sospechar la identidad por clase de la enzima. E) En esta imagen, a través de métodos de detección dependiente de anticuerpos, se detecta la identidad de la enzima que, evidentemente, debe estar en concordancia con la clase identificada en niveles de detección anteriores. Fuente: Instituto de Salud Pública de Chile. Recomendaciones para detección de carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Ministerio de Salud, Departamento de Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia; 2018

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. Resistencia a los antibióticos [Internet]. World Health Organization: WHO; 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Darwin C. El origen de las especies por medio de la selección natural. Tomo II. 1921.
- Oromí Durich J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Med Integr* [Internet]. 2000;36(10):367-70. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-losantibioticos-10022180>
- Martínez JL. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front Microbiol.* 2012;3:1. doi: 10.3389/fmicb.2012.00001.
- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 1940;146(3713):837.
- Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamasas. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(6):1050-1. doi: 10.1093/jac/dki130.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamasas. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3):969-76. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
- Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamasas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 1980;289(1036):321-31. Dis-

- ponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6109327>
9. Garau G, Di Guilmi AM, Hall BG. Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(7):2778-84. doi: 10.1128/AAC.49.7.2778-2784.2005.
  10. Gomez SA, Sanz MB, Rapoport M, Sucin G, Corallo TA, Poklepovich T, et al. Novel Metallo- $\beta$ -Lactamase blaC-VI-1 Isolated from a *Chromobacterium violaceum* Clinical Strain Resistant to Colistin. *Pathogens* [Internet]. 2023; 12(7):961. Available from: [http://antimicrobianos.com.ar/wp-content/uploads/2023/07/Gomez-SA-et-al-CVI-1\\_pathogens-12-00961-v2.pdf](http://antimicrobianos.com.ar/wp-content/uploads/2023/07/Gomez-SA-et-al-CVI-1_pathogens-12-00961-v2.pdf).
  11. Philippon A, Jacquier H, Ruppé E, Labia R. Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. *Curr Res Transl Med.* 2019;67(4):115-122. doi: 10.1016/j.retram.2019.05.003.
  12. Pandey D, Singhal N, Kumar M.  $\beta$ -LacFamPred: An online tool for prediction and classification of  $\beta$ -lactamase class, subclass, and family. *Front Microbiol.* 2023;13:1039687. doi: 10.3389/fmicb.2022.1039687.
  13. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(3):259-63.
  14. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-33.
  15. Guerrero C, Sánchez C. Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Cercenado E, Cantón R, editores. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentos-cientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientosmicrobiologia1a.pdf>
  16. Marin M. Penicilina [Internet]. Trabajo presentado durante el Curso de Toxicología y Química Forense. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano. Argentina, 2011. Disponible en: <http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/753>
  17. Acuña Leiva G. Descubrimiento de la penicilina: un hito de la medicina cómo el azar puede ayudar al científico. *Rev Méd Clín.* 2002;13: 30-34. Disponible en: [https://www.clc.cl/Dev\\_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2002/1%20enero/DescubrimientoPenicilina-7.pdf](https://www.clc.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2002/1%20enero/DescubrimientoPenicilina-7.pdf)
  18. Mendoza N. Actualidades farmacológicas. Penicilina. *Rev Fac Med UNAM.* 2006;49(4):169-171
  19. Abarca G, Herrera M. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev méd Hosp Nac Niños (Costa Rica).* 2001;36( 1-2 ):77-104. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85462001000100011&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100011&lng=en).
  20. Bush K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e01076-18. doi: 10.1128/AAC.01076-18.
  21. Salverda ML, De Visser JA, Barlow M. Natural evolution of TEM-1  $\beta$ -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34(6):1015-36. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x.
  22. Morales JL, Reyes K, Monteghirfo M, Roque M, Irey J. Presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. *An Fac Med Lima.* 2005;66(1):24-32.
  23. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro extendido. 2005. Control de calidad. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
  24. Carrasco SA. Entorno genético y localización del gen blaC-TX-M en cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos. Tesis [trabajo de grado]. Universidad de Concepción, Chile, 2017. Disponible en: [http://repositorio.udec.cl/jsps/bitstream/11594/2720/3/Tesis\\_Entorno\\_genetico\\_y\\_localizacion\\_del\\_gen.pdf](http://repositorio.udec.cl/jsps/bitstream/11594/2720/3/Tesis_Entorno_genetico_y_localizacion_del_gen.pdf)
  25. Coral D, Yauri MF, Alcocer I. Caracterización molecular de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas.* 2021;42(1):63-77. doi: 10.26807/remcb.v42i1.886
  26. M100: Antimicrobial Susceptibility Testing Standards [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. CLSI; 2019. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
  27. García-Hernández A, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero J, et al. Bacteraemia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): clinical relevance and today's insights. *Rev Esp Quimioter.* 2011;24(2):57-66. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2011/06/garcia.pdf>
  28. Perozo AJ, Castellano MJ. Detección de Betalactamasas de espectro extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. *Kasmera.* 2009;37(1):25-37. Disponible en: [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222009000100004](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222009000100004)
  29. Souverein D, Euser SM, van der Reijden WA, Herpers BL, Kluytmans J, Rossen JWA, et al. Clinical sensitivity and specificity of the Check-Points Check-Direct ESBL Screen for BD MAX, a real-time PCR for direct ESBL detection from rectal swabs. *J Antimicrob Chemother.* 2017 ;72(9):2512-2518. doi: 10.1093/jac/dkx189.
  30. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(3):490-5. doi: 10.1093/jac/dkp498.
  31. Wang S, Wang S, Tang Y, Peng G, Hao T, Wu X, et al. Detection of *Klebsiella pneumoniae* DNA and ESBL positive strains by PCR-based CRISPR-LbCas12a system. *Front Microbiol.* 2023;14:1128261. doi: 10.3389/fmicb.2023.1128261
  32. Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel  $\beta$ -lactamasas: A snapshot of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5):1632-9. doi: 10.1128/JCM.06115-11.
  33. Di Conza JA. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la microbiología clínica. *Revista Argentina de Microbiología.* 2022; 54(3):163-165. doi: 10.1016/j.ram.2022.08.001
  34. Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung P, Varón C, Moldes L, García-Riestra C, et al. Comparación entre las pruebas para la detección de betalactamasas de espectro extendido de los sistemas Vitek 2 y Phoenix. *Enferm In-*

- fecc *Microbiol Clin*. 2009;27(10):566-70. doi: 10.1016/j.eimc.2009.02.005.
35. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*. 2014;22(12):686-96. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.003.
  36. Findlay J, Poirel L, Juhas M, Nordmann P. KPC-Mediated Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Collateral Effects in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021; 65(9):e0089021. doi: 10.1128/AAC.00890-21.
  37. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de Posicionamiento Terapéutico de ceftazidima/avibactam (Zavicefta®). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. IPT, 1/2018. V1. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-ceftazidima-avibactam-Zavicefta-antibioticos.pdf>
  38. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(7):524-34. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.011
  39. Poirel L, Castanheira M, Carrère A, Rodríguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-Related Class D  $\beta$ -Lactamase with Extended Activity Toward Expanded-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(6):2546-51. doi: 10.1128/AAC.00022-11.
  40. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2009;16(1):35-40. doi: 10.3201/eid1601.090852
  41. Cuaical NM, Delgado YA, Anzola YM, Marcano D, Torres LC. Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Rev Soc Venez Microbiol*. 2012;32(2):95-110. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562012000200004](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000200004)
  42. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(11):e01140-18. doi: 10.1128/JCM.01140-18.
  43. Fleurbaey F, Heemskerk AAM, Russcher A, Klychnikov OI, Deelder AM, Mayboroda OA, et al. Capillary-Electrophoresis Mass Spectrometry for the Detection of Carbapenemases in (Multi-)Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Anal Chem*. 2014;86(18):9154-61. doi: 10.1021/ac502049p.
  44. Instituto de Salud Pública de Chile. Recomendaciones para detección de carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Ministerio de Salud, Departamento de Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia; 2018. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20detecci%C3%B3n%20carbapenemasas%20en%20enterobacterias%20y%20pseudomonas%20aeruginosa.pdf>
  45. Watkinson A. Antibiotics and antibiotic resistant bacteria in the aquatic environment: A global issue, an Australian perspective [Doctoral Thesis]. Queensland: University of Queensland, 2008. Disponible en: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:151291>.
  46. Chakraborty AK. In silico analysis of hotspot mutations in the bacterial NDM-1 and KPC-1 carbapenemases that cause severe MDR phenotypes. *Biochem Biotechnol Res*. 2016;4(1):17-26. Available in: [https://www.netjournals.org/z\\_BBR\\_16\\_012.html](https://www.netjournals.org/z_BBR_16_012.html)