

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León**  
**Facultad de Ciencias Médicas**  
**Escuela de Bioanálisis Clínico**



**Tesis para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico**

**Frecuencia de genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas aisladas de urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios de los municipios de León y Juigalpa.**

**Integrantes:** Bra. Claudia Mercedes Pérez Rodríguez  
Br. Johann René Pérez Poveda

**Tutores:** Lic. Margarita Paniagua, MSc.  
Profesor Titular  
Departamento de Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

Lic. Erick Amaya, PhD.  
Profesor Titular  
Departamento de Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

**Asesor:** Lic. Samuel Vilchez, PhD.  
Profesor Titular  
Departamento de Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León

## Resumen

Con el objetivo de investigar la frecuencia de los genes de resistencia *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en enterobacterias aisladas a partir de urocultivos de pacientes ambulatorios, en los municipios de León y Juigalpa entre Enero-Julio 2010; se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, no probabilístico por conveniencia. La identificación bacteriana y el estudio de sensibilidad antibacteriana se realizaron de acuerdo al Manual de procedimientos de bacteriología médica del MINSA. Para el tamizaje de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se utilizó la prueba de sinergia de triple disco con una variación para la detección simultánea de AmpC y carbapenemasas. Posteriormente las cepas productoras de BLEE fueron analizadas y confirmadas por PCR para una mejor caracterización de la enzima BLEE. Se aislaron 110 enterobacterias de urocultivos, 50% de ellas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León y el otro 50% en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional La Asunción, Juigalpa, resultando en total 30 aislados productores de  $\beta$ -lactamasas. Mediante el análisis por PCR se determinó la presencia de los genes *bla*TEM (1/30), *bla*CTX-M (11/30) y de *bla*TEM/*bla*CTX-M (10/30) en las bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas, confirmándose que un 73.3% (22/30) eran cepas productoras de BLEE. En León se logró identificar con más frecuencia el gen *bla*CTX-M, 13 de los aislados tenían el gen *bla*CTX-M-1; mientras que en Juigalpa solo 4 aislados poseían el mismo gen. En León también se encontró con mayor frecuencia el gen *bla*TEM con 8 aislados; mientras que en Juigalpa sólo se identificaron 3. Estos hallazgos son de suma importancia ya que la adecuada detección de las verdaderas bacterias productoras de BLEE, por medio de los métodos moleculares empleados en este estudio, incorpora la posibilidad de una mejora al diagnóstico del proceso infeccioso de los pacientes en un futuro. Pudiéndose reducir el tiempo de resolución de la enfermedad, a través de un diagnóstico más preciso y por ende manejo clínico más adecuado. Paralelamente, estos datos proveen información epidemiológica adicional y esencial para la prevención de las infecciones de vías urinarias, que vendrían a fortalecer o complementar los métodos ya establecidos en la práctica diaria.

# Agradecimiento

Agradecemos a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo con sus consejos y apoyo; principalmente a:

Nuestros tutores:

MSc. Margarita Paniagua, por su confianza, paciencia y principalmente su apoyo incondicional durante este proceso de aprendizaje.

Dr. Erick Amaya, por su orientación, su tiempo, por ayudarnos, proporcionarnos información importante y materiales para la realización de este trabajo.

Nuestro asesor:

Dr. Samuel Vilchez, por apoyarnos, motivarnos, por sus valiosos consejos y por dedicarnos tiempo.

Dr. Félix Espinoza por sus gestiones y apoyo para la finalización de este proyecto.

MSc. Oscar Arbizú por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

Al personal del Departamento de Microbiología y Parasitología que colaboraron en la realización de este estudio.

Lic. Ismael Martínez, por permitirnos la recolección de muestras en el área de bacteriología del Hospital Regional La Asunción, Juigalpa.

*Dedicamos este trabajo a Dios por ser nuestra principal guía y soporte.  
A nuestros padres por apoyarnos incondicionalmente para cumplir nuestras metas.*

## Contenido

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	3
3. Justificación .....	5
4. Problema .....	6
5. Objetivos .....	7
6. Marco Teórico .....	8
6.1 Enterobacterias .....	8
6.2 Antibióticos betalactámicos .....	9
6.2.1 Penicilinas: .....	9
6.2.2 Inhibidores de $\beta$ -lactamasas: .....	9
6.2.3 Otros betalactámicos: .....	9
6.2.4 Cefalosporinas: .....	10
6.3 Mecanismos de trasmisión de resistencia .....	11
6.3.1 Transformación: .....	11
6.3.2 Transducción: .....	11
6.3.3 Conjugación: .....	12
6.4 Mecanismos de resistencia: .....	12
6.4.1 Impermeabilidad de la membrana bacteriana externa: .....	12
6.4.2 Alteración de los blancos: .....	13
6.4.3 Bombas de flujo: .....	13
6.4.4 Alteración de Rutas Metabólicas: .....	13
6.4.5 Producción de enzimas: .....	13
6.5 Enterobacterias productoras de $\beta$ -lactamasas causantes de infecciones de vías urinarias .....	20
6.6 Tratamiento a enterobacterias productoras de $\beta$ -lactamasas que causan infecciones de vías urinarias .....	22
6.6.1 Carbapenems: .....	23
6.6.2 Cefalosporinas: .....	23
6.6.3 Cefamicinas: .....	23
6.6.4 Combinaciones de betalactámicos/ inhibidores de $\beta$ -lactamasas: .....	23
6.6.5 Aminoglucósidos: .....	23
6.6.6 Fluroquinolonas: .....	24
6.6.7 Otros agentes: .....	24
6.7 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar .....	24
6.7.1 Factores que afectan el diámetro del halo de inhibición: .....	25
6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (Siglas en inglés: PCR) .....	26
7. Metodología .....	28
8. Resultados .....	33
9. Análisis de Resultados .....	36
10. Conclusiones .....	39
11. Recomendación .....	40
12. Bibliografía .....	41
13. Anexos .....	47

# 1. Introducción

Las infecciones de vías urinarias (IVU) son la segunda causa de infecciones en la comunidad, cerca de 150 millones de personas alrededor del mundo son diagnosticadas con IVU cada año<sup>1, 2</sup>. La etiología de estas infecciones es variable y usualmente, dependen del tiempo, área geográfica y edad del paciente. No obstante entre las bacterias más importantes asociadas a esta patología están *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* que representan el 70% de los casos<sup>3</sup>.

Los fármacos que usualmente se prescriben basados en las recomendaciones del MINSA son: cotrimoxazole, amoxicillina, ampicilina, aminoglucósidos, cefalosporinas, ácido nalidíxico y nitrofurantoína<sup>4</sup>. Sin embargo, muchos reportes tanto a nivel mundial como local indican la presencia de multiresistencia a antimicrobianos en organismos asociados a IVU<sup>1, 2, 5</sup>.

La identificación de la primera bacteria resistente a betalactámicos fue en 1940<sup>6</sup>. El problema de los microorganismos resistentes ha venido en aumento desde esta fecha, principalmente en las últimas dos décadas, sobre todo en bacterias Gramnegativas asociadas a infecciones del tracto urinario<sup>7</sup>.

La mayor causa de resistencia a cefalosporinas en Enterobacteriaceae son la  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE); que pertenecen a las enzimas A de la clasificación de Ambler; muchas de estas enzimas resultan de las variantes de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA) TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que por mutaciones extienden su sustrato específico a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, en particular a cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima. De este modo las BLEE muestran un amplio rango de sustitución de aminoácidos lo que extiende la especificidad de sustratos<sup>8</sup>. No obstante, las betalactamasas de las familias TEM, SHV y CTX-M son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam. Esta propiedad sirve como una importante prueba fenotípica que es convenientemente utilizada para la identificación de bacterias productoras de estas  $\beta$ -lactamasas<sup>9</sup>.

Se determinó la frecuencia de los genes *bla*TEM y *bla*CTX-M en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, aisladas de urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios de los municipios de León y Juigalpa.

## 2. Antecedentes

Las bacterias productoras de BLEE son actualmente un problema a nivel mundial en pacientes hospitalizados y la comunidad. Estas fueron detectadas por primera vez en Alemania alrededor de 1980, posteriormente la mayoría de los reportes fueron de Francia<sup>6</sup>. Por su rápido esparcimiento, alrededor del mundo han habido reportes sobre la prevalencia de bacterias productoras de BLEE en diferentes países como Estados Unidos (porcentaje de BLEE: *K. pneumoniae* 7.6%, *E. coli* 3.3% y *P. mirabilis* 4.9%)<sup>10</sup>; Europa (porcentaje de BLEE: *K. pneumoniae* 22.6%, *E. coli* 5.3% y *P. mirabilis* 11.1%)<sup>10</sup>; América Latina (Porcentaje de BLEE: *K. pneumoniae* 47.3%, *E. coli* 6.7%)<sup>11</sup>; Pacífico de Asia (Porcentaje de BLEE: *K. pneumoniae* 25.2%, *E. coli* 10.1% y *P. mirabilis* 1.4%)<sup>12</sup>.

En Nicaragua información referente a la prevalencia de bacterias Gramnegativas multirresistentes y productoras de BLEE es escasa. Sin embargo es importante indicar que el Ministerio Nacional de Salud posee un sistema de vigilancia en algunos departamentos del país para la detección de BLEE, no así de los genes que lo producen, sin embargo no ha habido un reporte oficial hasta la fecha de hoy. Entre las publicaciones que abordan este problema en Nicaragua, Amaya y col., en su estudio realizado en 2010 sobre resistencia antimicrobiana en bacterias Gramnegativas aisladas de neonatos con sepsis y del ambiente de la sala de cuidados intensivos de neonatos (UCIN) del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales (HEODRA) León, indican que la mayoría de estos patógenos fueron altamente resistentes y con una alta prevalencia de producción de enzimas TEM, SHV y CTX-M. Además, se encontraron clones similares de *K. pneumoniae* multi-resistentes y productores de BLEE que afectaron a los neonatos y que también fueron aislados del ambiente<sup>13</sup>. Otro ejemplo es el de Matute y col., en su estudio en el año 2004, sobre resistencia antimicrobiana en uropatógenos, indican que *E. coli* (56%), *Klebsiella spp.* (18%), *Enterobacter spp.* (11%), *Proteus spp.* (3%) fueron los microorganismos más aislados; siendo *E. coli* resistente a amoxicilina (74%), trimetoprim-sulfametoxazole (63%), ciprofloxacina (29%), gentamicina (11%) y amoxicilina-ácido clavulánico (34%)<sup>14</sup>. En otro estudio más reciente (2010) Bours y col. analizaron el perfil de resistencia de uropatógenos, los

resultados muestran porcentajes altos de resistencia ante antibióticos comúnmente utilizados; por ejemplo, en *E. coli* se encontró alta resistencia a ampicilina (61.4%), amoxicilina-ácido clavulánico (18.6%), ceftriaxona (20.5%), gentamicina (25.0%), trimetoprim-sulfametoxazole (38.6%), ciprofloxacina (31.8%), y cefalotina (45.5%)<sup>5</sup>.

### 3. Justificación

Mientras las penicilinas y cefalosporinas siguen siendo los antibióticos betalactámicos que se prescriben generalmente en infecciones de vías urinarias, del torrente sanguíneo y varias intraabdominales. A la par, los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* han incrementado el desarrollo de mecanismos de resistencia para asegurar su supervivencia; uno de ellos es la producción de  $\beta$ -lactamasas.

El aumento de la resistencia antimicrobiana y multiresistencia induce a tratamientos no satisfactorios contra infecciones bacterianas. Los organismos productores de  $\beta$ -lactamasas son un problema creciente de salud pública, debido a que cada vez es más difícil dar solución a este tipo de infecciones; por lo cual es de suma importancia la detección adecuada con el propósito de evitar posibles complicaciones como las bacteremias derivadas de infecciones causadas por microorganismos resistentes. La situación se complica cuando la infección avanza y las opciones terapéuticas disminuyen si la bacteria es productora de BLEE; lo que consecuentemente aumenta el costo de hospitalización y cuidados al del paciente.

La detección de BLEE se realiza de manera rutinaria por el método de Kirby-Bauer; un método fenotípico de fácil utilización y bajo costo; sin embargo, se puede observar poca sensibilidad cuando el aislado productor de BLEE expresa otros tipos de  $\beta$ -lactamasas tales como AmpC. La identificación genotípica de las enzimas provee información adicional para la prevención de la infección y control de las enfermedades; proporcionando datos epidemiológicos para crear posibles soluciones, fortalecer o complementar los métodos ya establecidos en la práctica diaria.

Por lo anterior expuesto, este estudio pretende determinar la frecuencia de los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M por métodos moleculares para enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas aisladas de urocultivos en los municipios de León y Juigalpa.

## 4. Problema

¿Cuál es la frecuencia de los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en enterobacterias aisladas a partir de urocultivos de pacientes ambulatorios, en los municipios de León y Juigalpa entre Enero-Julio 2010?

## 5. Objetivos

- **General:**

- a) Investigar la frecuencia de los genes de resistencia *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en enterobacterias aisladas a partir de urocultivos de pacientes ambulatorios, en los municipios de León y Juigalpa entre Enero-Julio 2010.

- **Específicos:**

- a) Identificar la producción fenotípica de  $\beta$ -lactamasas por el método de Kirby-Bauer en las enterobacterias aisladas.
- b) Comprobar la presencia de genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M por la técnica de PCR en las enterobacterias aisladas positivas para  $\beta$ -lactamasas.

## 6. Marco Teórico

### 6.1 Enterobacterias

La familia Enterobacteriaceae es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gramnegativos con importancia clínica. Se han descrito 40 géneros con más de 150 especies. Estos géneros se han clasificado según sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica e hibridación y secuenciación de los ácidos nucleicos. A pesar de la complejidad de esta familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 95% de las infecciones. Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal incluso en el hombre. Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, del 30-35% de las septicemias, más del 70% de las infecciones del aparato urinario (IAU) y muchas infecciones intestinales<sup>15, 16</sup>.

Las características metabólicas de las enterobacterias permiten diferenciarlas con fines diagnósticos y entre las que causan IVU con más frecuencia están:

*Escherichia*: por lo general, la *E. coli* reacciona positivas para el indol, lisina descarboxilasa y fermentación del manitol, además de producir gas a partir de la glucosa. Si se siembran sobre agar sangre producen hemólisis, las colonias poseen un brillo metálico en medio EMB (Eosin-Metilene blue) característico<sup>17</sup>.

*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*: poseen crecimiento mucoide, grandes cápsulas de polisacáridos, son inmóviles, lisina descarboxilasa positivo y citrato positivo. Las especies de *Enterobacter* producen gas a partir de glucosa, *Serratia* produce ADNsa, lipasa y gelatinasa. En general, las tres especies producen una prueba de Voges-Proskauer positiva<sup>17</sup>.

*Proteus*, *Morganella*, *Providencia*: desamina fenilalanina, son motiles y fermentan la xilosa. *Proteus* y *Morganella* son ureasa positiva, *Proteus* y *Providencia* fermentan lactosa lentamente o en absoluto<sup>17</sup>.

## 6.2 Antibióticos betalactámicos

Los betalactámicos son la familia de antibióticos mayormente empleada en el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por enterobacterias. Estos fueron descubiertos en 1928 cuando Fleming encontró un hongo del género *Penicillium* que producía una sustancia, posteriormente denominada penicilina, capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*; más tarde en 1948 Botzu obtuvo, a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*, material activo frente a *S. aureus* iniciando con esto el surgimiento de las cefalosporinas<sup>18</sup>.

Se ha empleado una gran variedad de antibióticos betalactámicos naturales y derivados semisintéticos para el control de enfermedades infecciosas. Estas moléculas representan más de la mitad del consumo total de los antibióticos, principalmente por su alta efectividad y baja toxicidad para los humanos y los animales. El objetivo de los antibióticos betalactámicos es interferir en la síntesis de peptidoglicano, un componente de la pared bacteriana<sup>19</sup>.

**6.2.1 Penicilinas:** son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintéticos que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo donde cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana<sup>18</sup>.

**6.2.2 Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas:** conservan en su estructura el anillo betalactámico. En el ácido clavulánico, el anillo tiazolidínico de las penicilinas es sustituido por un anillo oxazolidínico; el sulbactam es la 6-desaminopenicilinasulfona y el tazobactam es la sulfona del ácido penicilánico. Ambos compuestos carecen de actividad antibacteriana propia, pero al inhibir competitivamente las  $\beta$ -lactamasas de diferentes especies bacterianas, potencian la actividad de penicilinas y cefalosporinas<sup>18</sup>.

**6.2.3 Otros betalactámicos:** los monobactámicos se caracterizan por la presencia de un anillo betalactámico monocíclico, al cual se unen diferentes radicales que confieren

al aztreonam una elevada resistencia a la inactivación por  $\beta$ -lactamasas de bacterias Gramnegativas (enterobacterias, Pseudomonas y otras bacterias Gramnegativas aerobias). En el caso de los carbapenemes, el azufre endocíclico es sustituido por un grupo metileno, quedando el átomo de azufre en posición adyacente al anillo bicíclico<sup>18</sup>.

**6.2.4 Cefalosporinas:** contienen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrothiazida. Sustituciones en las posiciones 3 y 7 modifican su actividad antibacteriana y sus propiedades farmacológicas<sup>18</sup>.

Clínicamente las cefalosporinas se han dividido en compuestos de primera, segunda tercera y cuarta generación. Las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a cocos Grampositivos como *S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* y tienen actividad limitada contra *E. coli*, *P. mirabilis* (indol negativo) y *K. pneumoniae*<sup>15</sup>.

Las cefalosporinas de segunda generación deben ser considerados en dos grupos: cefalosporinas y cefamicinas (cefotaxima, cefotetán, y cefmetazol). En comparación con los de primera generación. Las verdaderas cefalosporinas de este grupo incluyen una gama de antibióticos parenterales y orales, que proporcionan de manera significativa mejora en la actividad frente a *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, comparable a la actividad contra estafilococos y estreptococos y en determinados casos contra algunas enterobacterias. Cepas productoras de BLEE parecen sensibles *in vitro* a cefamicinas, pero estos agentes no han demostrado su fiabilidad cuando se utilizan para el tratamiento de la infección *in vivo*<sup>20</sup>.

Las cefalosporinas de tercera generación son activas contra bacilos Gramnegativos facultativos. Además, tienen una potente actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, y otros estreptococos. También, tienen una excelente actividad frente a *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, y *M. catarrhalis*. A pesar de su amplia utilización, estos agentes han conservado un grado excepcionalmente alto de actividad contra *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *P. mirabilis* (indol positivo), *Proteus spp.*, *Providencia spp.* y *Serratia spp.* La actividad de estos agentes

contra las enterobacterias se ha cuestionado recientemente por la resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas codificadas cromosómicamente de tipo AmpC, que son inducibles o que pueden ser derreprimidas de forma estable y transfieren resistencia a todas las cefalosporinas han dado lugar a un número de infecciones por *Enterobacter spp.* y *C. freundii*. Además, las BLEE mediadas por plásmidos, que transfieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación tienen como consecuencia mutaciones puntuales en los genes TEM o SHV<sup>20</sup>.

En las cefalosporinas de cuarta generación encontramos dos compuestos cefepime y cefpirome. Puesto que son compuestos eléctricamente neutros les es posible cruzar rápidamente la membrana externa de bacterias Gramnegativas y alcanzar una significativa concentración en el espacio periplásmico. Esta característica combinada con su relativa resistencia a hidrólisis por  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC y alta afinidad por PBP de bacilos Gramnegativos denota a estos compuestos con actividad específica contra las enterobacterias y *P. aeruginosa*, así como *H. influenzae* y *Neisseria spp.* Cefepime y cefpirome son inductores débiles de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC y seleccionan de manera estable a enterobacterias derreprimidas con menos frecuencia que las cefalosporinas de tercera generación, característica que puede proteger contra la aparición de resistencia entre los bacilos Gramnegativos<sup>20</sup>.

### **6.3 Mecanismos de transmisión de resistencia**

Las formas más comunes de transmisión de mecanismos de resistencia en las bacterias son: Transformación, transducción y conjugación<sup>21</sup>.

**6.3.1 Transformación:** las bacterias podrían encontrar fragmentos desnudos de ADN que transportan genes de resistencia antimicrobiana. Estos fragmentos son introducidos en la célula mediante un proceso denominado transformación. El fragmento de ADN es incorporado en el cromosoma de la célula huésped por recombinación y la célula resultante es resistente<sup>21</sup>.

**6.3.2 Transducción:** es una forma de transferencia de ADN mediada por bacteriófagos. A baja frecuencia, pueden accidentalmente empaquetar segmentos de ADN del

huésped en su cápside e inyectar este ADN en un nuevo huésped, en el cual puede recombinarse con el cromosoma celular y ser heredado<sup>21</sup>.

**6.3.3 Conjugación:** esta requiere de elementos genéticos independientemente replicables llamados plásmidos conjugativos o elementos cromosómicamente integrados, que incluyen transposones. Estos elementos codifican proteínas que facilitan su propia transferencia<sup>21</sup>.

*6.3.3.1 Transposones:* son elementos que pueden existir en los plásmidos o integrarse en otros transposones o en el cromosoma de la célula huésped. Estas piezas de ADN contienen regiones terminales que participan en la recombinación y especifican una proteína que facilitan la incorporación dentro y fuera de regiones genómicas específica. Los transposones conjugativos son los únicos que tienen cualidades de plásmidos y pueden facilitar la transferencia de plásmidos endógenos de un organismo a otro. El movimiento intracelular de ADN es una propiedad de los transposones, los cuales aleatoriamente recombinan o saltan entre los replicones<sup>21</sup>.

*6.3.3.2 Integrones:* contienen colecciones de genes que son generalmente clasificados de acuerdo a su secuencia de proteínas (integrasas) que imparten la función de recombinación. Tienen la habilidad de integrarse establemente en regiones de otros ADNs donde envían, por intercambio único, múltiples genes nuevos, particularmente de resistencia antimicrobiana<sup>21</sup>.

*6.3.3.3 Plásmidos:* contienen genes de resistencia y muchos otros; se replican independientemente del cromosoma del huésped y puede diferenciarse por sus orígenes de replicación. Múltiples plásmidos pueden existir en una sola bacteria, donde sus genes se agregan a los genes del microorganismo<sup>22</sup>.

## **6.4 Mecanismos de resistencia:**

**6.4.1 Impermeabilidad de la membrana bacteriana externa:** las bacterias Gramnegativas pueden volverse resistentes a los antibióticos betalactámicos mediante

el desarrollo de barreras de permeabilidad. Esto es usualmente provocado por porinas alteradas en la membrana externa que ya no permiten la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico dentro de la célula. Cuando los betalactámicos no pueden alcanzar las proteínas fijadoras de penicilinas (siglas en Inglés: PBPs), la célula es resistente<sup>23</sup>.

**6.4.2 Alteración de los blancos:** las PBPs tanto en bacterias Grampositivas y Gramnegativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los betalactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto la célula es resistente a agentes antimicrobianos<sup>23</sup>.

**6.4.3 Bombas de flujo:** una amplia variedad de bombas de flujo proveen resistencia antimicrobiana tanto en bacterias Grampositivas como en Gramnegativas. El flujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembrana insertadas en la membrana citoplásmica y, en el caso de los organismos Gramnegativos involucra también componentes en la membrana externa y periplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra<sup>23</sup>.

**6.4.4 Alteración de Rutas Metabólicas:** algunos microorganismos desarrollan una ruta metabólica alterada que elude la reacción inhibida por el antimicrobiano. Mutaciones que inactivan la timidilato sintetasa bloquean la conversión de deoxiuridilato a timidilato. Estos mutantes requieren timina o timidina exógena para la síntesis de ADN y por ende son resistentes a los antagonistas de la ruta del folato como las sulfonamidas y trimetoprim<sup>23</sup>.

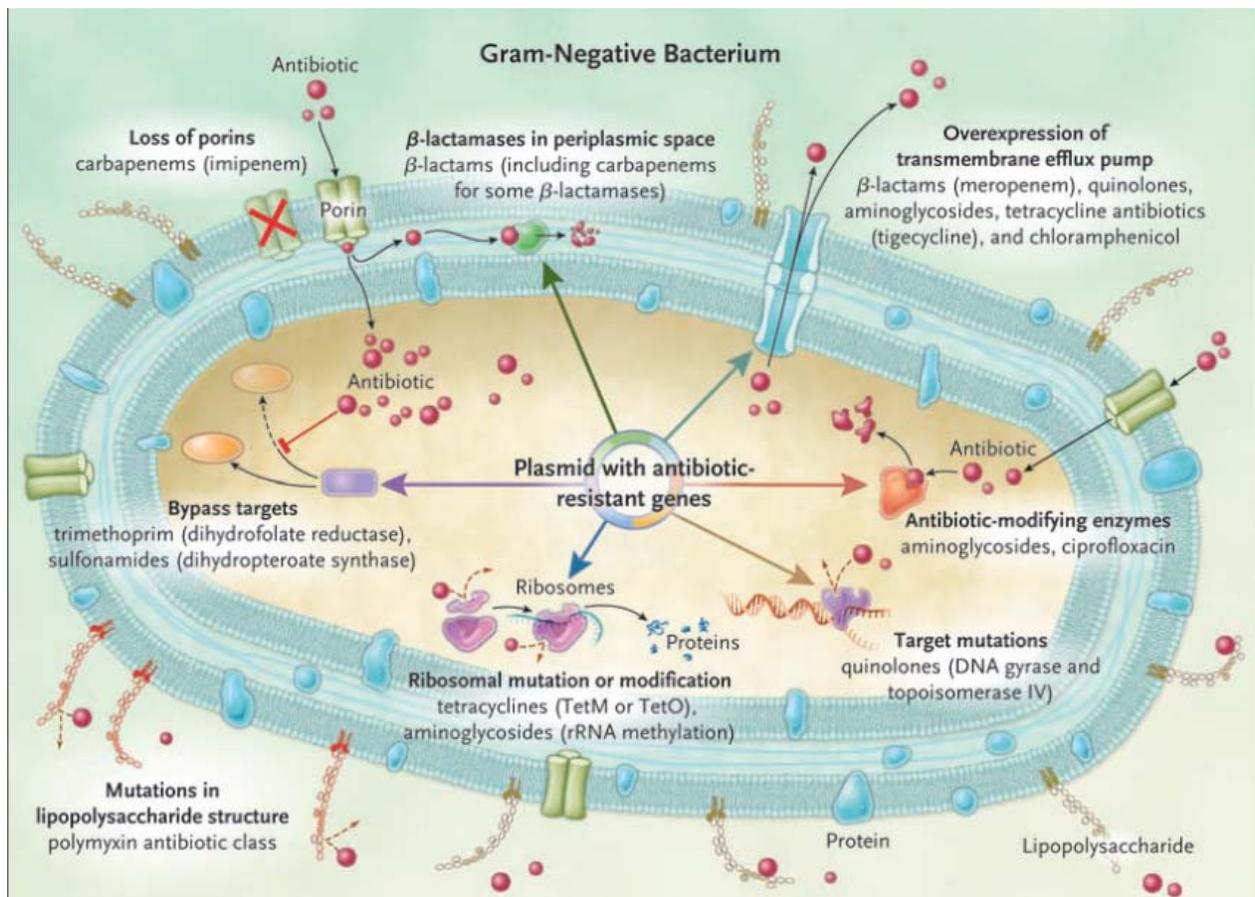
#### **6.4.5 Producción de enzimas:**

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámicos de estos antibióticos y los convierte en compuestos biológicamente inactivos. En bacterias Gramnegativas, las  $\beta$ -lactamasas se sintetizan de forma constitutiva y en pequeña cantidad, secretándose posteriormente al periplasma. Su situación es estratégica y

escasas moléculas de enzima pueden inactivar al antibiótico a su paso al periplasma a través de las porinas<sup>18</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas son comúnmente clasificadas de acuerdo a dos esquemas generales: el esquema de clasificación molecular de Ambler y el sistema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medieros<sup>24</sup>.

El esquema de Ambler divide a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro grupos mayores (A-D). La base de este esquema de clasificación recae sobre la homología de las proteínas (similitud de aminoácidos) y no en las características fenotípicas. A la vez en este esquema de clasificación de  $\beta$ -lactamasas las clases A, C y D son  $\beta$ -lactamasas con residuos de serina. En contraste, las enzimas de clase B son metalo- $\beta$ -lactamasas con residuos de zinc. Por otro lado en el esquema de clasificación de Bush-Jacoby-Medieros es acorde a las similitudes funcionales (sustrato y perfil de inhibidores). Hay cuatro grupos mayores y múltiples subgrupos en este sistema. Este esquema es de mayor utilidad para el diagnóstico de laboratorio porque considera los inhibidores y sustratos de  $\beta$ -lactamasas que son clínicamente relevantes<sup>24</sup>.



**Figura 1. Mecanismos de resistencia en bacterias Gramnegativas y el efecto ante los antibióticos.** Varios mecanismos de resistencia se presentan en bacterias Gramnegativas, algunas son mediadas por plásmidos móviles. Estos incluyen pérdida de porinas, que reducen el movimiento de antibióticos a través de la membrana celular. Presencia de  $\beta$ -lactamasas en el espacio periplasmático, que degradan betalactámicos. Aumento en la expresión de bombas de flujo que expulsan el antibiótico antes de que este pueda hacer efecto. Presencia de enzimas que modifican a los antibióticos, las cuales hacen al antibiótico incapaz de interactuar con su objetivo. Mutaciones en los sitios de unión, que evitan que el antibiótico se una a su objetivo. Mutaciones o modificaciones ribosomales, que evitan que el antibiótico se una y de esta manera inhibe la síntesis de proteínas. Alteración metabólica, esta utiliza una enzima resistente alternativa para desviar el efecto inhibitorio del antibiótico<sup>25</sup>.

6.4.5.1 *Enzimas tipo SHV*: estas enzimas puede ser el tipo de BLEE más frecuente en aislados clínicos de cualquier tipo. La SHV se refiere a una variable de sulfidrilo. Esta designación se realizó debido a que se pensó que la inhibición de la actividad de SHV por p-cloromercuriobenzoato era relacionada al sustrato, pero se observó que era variable acorde al sustrato utilizado en el ensayo<sup>26</sup>.

La familia de  $\beta$ -lactamasas tipo SHV parecen haber sido derivadas de *Klebsiella* spp. El progenitor de la clase de enzimas SHV, SHV-1 es universalmente encontrada en *K. pneumoniae*. En muchas de estas cepas, el gen que codifica SHV-1 o su precursor aparente, LEN-1, reside en el cromosoma bacteriano también. Puede ser que el gen SHV-1 evolucionó como un gen cromosómico en *Klebsiella* spp. y luego fue incorporado en el plásmido, el cual ha sido extendido a otras especies de enterobacterias. La SHV-1 confiere resistencia a penicilinas de amplio espectro como la ampicilina, ticarcilina y piperacilina, pero no a las cefalosporinas con sustitución de oxamino<sup>26</sup>.

Para 1983 en Alemania, se demostró que la causa de resistencia transferible a cefotaxima, así como a otras cefalosporinas, llamada SHV-2, deriva de la mutación de SHV-1. La mutación, cambió el aminoácido en la posición 238 de glicina por serina, dando lugar a una afinidad mejorada de SHV-2 por cefalosporinas oxamino, con un incremento significativo en MIC (Concentración mínima de inhibición) a cefotaxima y más limitado aumento en MIC de ceftazidima. Ahora hay alrededor de 40 BLEE tipo SHV<sup>27</sup>.

En Latino América el primer aislamiento de bacteria productora de BLEE fue reportado en Argentina en 1981 en una cepa de *K. pneumoniae* productora de betalactamasa tipo SHV-5<sup>28</sup>. Igualmente se descubrió otra cepa de *K. pneumoniae* en Chile para 1985 que era productora de betalactamasa tipo SHV-5<sup>29</sup>. En la actualidad SHV-5 y SHV-12 predominan en Sur America en estudios de resistencia<sup>30</sup>. En México, se reportaron  $\beta$ -lactamasas tipo SHV-5 y SHV-2 en *K. pneumoniae* aisladas de infecciones del torrente sanguíneo<sup>31</sup>.

6.4.5.2 *Enzimas tipo TEM*: la familia de  $\beta$ -lactamasas tipo TEM son derivadas de TEM-1

y TEM-2. TEM-1 fue reportada de una cepa de *E. coli* aislada de un paciente en Atenas, Grecia, llamado Temoneira. TEM-1 puede hidrolizar la ampicilina a mayor rango que carbenicilina, oxacilina o cafalotina y tiene una actividad insuficiente contra cefalosporinas de espectro extendido. Es inhibido por ácido clavulánico. TEM-2 tiene el mismo perfil hidrolítico que TEM-1, pero difieren de TEM-1 en tener promotor nativo más activo pero con diferente punto isoeléctrico<sup>26</sup>.

TEM-1 es la responsable de más de 50-60% de la resistencia a ampicilina mediado por plásmido en *E. coli*, que normalmente se encuentra localizado en el transposon Tn3, una serie de eventos de transposiciones y reordenamientos han permitido al gen TEM-1 migrar un número creciente de *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Es capaz de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera generación pero incapaz de atacar a cefalosporinas oxamino<sup>32</sup>.

Alrededor de 100 tipos de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido de tipo TEM han sido descritas. De las cuales la mayoría son BLEE. Un número de derivados de TEM se han descubierto que tienen afinidad reducida a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, estas tienen actividad hidrolítica insignificante contra cefalosporinas de espectro extendido y no son consideradas BLEE<sup>33</sup>.

Las enzima tipo TEM se reportaron por primera vez en Latinoamérica en el 2003, describiendo las enzimas TEM-10 y TEM-12 en aislamientos de *K. pneumoniae*<sup>34</sup>. Sin embargo las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM han sido reportadas muy raramente en países latinoamericanos<sup>24</sup>. Un reporte muestra que TEM-10 y TEM-12 están entre las enzimas tipo TEM más comunes detectadas en Latinoamérica<sup>30</sup>.

**6.4.5.3 Enzimas tipo CTX-M:** son mayormente activas contra cefotaxima y ceftriaxone que contra ceftazidima, pero puntos de mutación cerca del sitio de acción de algunas enzimas de los grupos CTX-M-1 y 9 han incrementado su habilidad para hidrolizar significativamente ceftazidima. Estas enzimas pertenecen a la clase A de la clasificación de Ambler, pero no están relacionadas a otras BLEE como las TEM y SHV. En la actualidad, las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M incluye más de 80 diferentes enzimas que

están divididas en 6 grupos basadas en las diferencias de sus aminoácidos e incluyen: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 y CTX-M-45<sup>35</sup>.

A diferencia de la mayoría de BLEE adquiridas, la fuente original de genes que codifican las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M es conocida. Las fuentes de los factores determinantes de CTX-M residen en los cromosomas de los miembros del género *Kluyvera*; que incluye un número de especies del medio ambiente con poca o sin actividad patógena contra los humanos<sup>36</sup>.

Aunque las enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M han sido relacionadas con infecciones nosocomiales, las cepas de *E. coli* productoras de estas enzimas son responsables de la mayoría de las infecciones adquiridas en la comunidad<sup>37</sup>.

CTX-M fueron primeramente reportadas en Japón en 1986. Organismos productores de CTX-M específica han sido aislado en diferentes países: La CTX-M-9 y CTX-M-14 son las más frecuentes en España; CTX-M-14 en Canadá y China; CTX-M-1 en Italia; CTX-M-3 en Polonia; CTX-M-2 en Japón e Israel, mientras que la CTX-M-15 se ha encontrado en todos los continentes exceptuando La Antártica. Durante los años 90 se reportaron pequeños brotes de origen nosocomial, principalmente de enterobacterias productoras de CTX-M-2, en Sur América (especialmente Argentina)<sup>38</sup>; Sin embargo, desde el 2000, cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas CTX-M han surgido a nivel mundial como una causa importante de infecciones de vías urinarias adquiridas en la comunidad y a esto se le ha llamado "CTX-M pandémica"<sup>39</sup>. Este fenómeno ha avanzado rápidamente; especialmente en los últimos 5 años y ahora estas enzimas son las BLEE más comunes encontradas en vastas partes del mundo<sup>36</sup>.

**6.4.5.4 Carbapenemasas:** son  $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a los carbapenémicos (por ejemplo, imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem). Muy a menudo estas enzimas confieren resistencia a otros agentes betalactámicos, incluyendo cefalosporinas de espectro extendido. Las enzimas se encuentran generalmente en las bacterias aisladas que ya son resistentes a casi todos los otros antimicrobianos y las opciones de tratamiento para las infecciones causadas por estos organismos se

reducen considerablemente<sup>40</sup>.

Las Carbapenemasas pertenecen a los tipos moleculares A, B y D. La clase A (grupo 2F de Bush) se inhiben en diversos grados por ácido clavulánico y por lo general hidrolizan las penicilinas o cefalosporinas de manera más eficiente que carbapenems. Por esta razón algunas enzimas, como las KPC, carecen de fuerte actividad y pueden ser considerados como BLEE que también hidrolizan carbapenems. La clase A incluyen las enzimas de la familia KPC, IMI, SME, NMC-A, y GES. Estas enzimas son comúnmente producidas por los miembros de la familia Enterobacteriaceae<sup>41</sup>.

Las enzimas Clase B (Grupo 3 de Bush) son metalo- $\beta$ -lactamasas, que normalmente hidrolizan carbapenems de manera eficiente, pero no aztreonam, son resistentes a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, pero son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA. Las más importantes incluyen las familias VIM y IMP y SPM-1, que se han detectado en las cepas de *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* y *A. baumannii*<sup>41</sup>.

Las carbapenemasas de clase D hidrolizan carbapenems débilmente y se inhiben de forma eficaz por ácido clavulánico. Pertenecen a la familia OXA y son comúnmente producidos por *Acinetobacter spp.*, Pero también se han reportado en algunos *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*<sup>41</sup>.

6.4.5.5 Enzimas tipo AmpC: son enzimas codificadas en los cromosomas de muchas de las enterobacterias y otros pocos organismos, hidrolizan preferentemente cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación y cefamicinas, y resisten a la inhibición por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam<sup>42</sup>.

En muchas bacterias, las enzimas AmpC son inducibles y se puede expresar altos niveles de mutación. La sobreexpresión confiere resistencia a cefalosporinas de amplio espectro como la cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona. Estas enzimas se han detectado en algunos aislamientos de *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* y *E. coli* y son típicamente asociados con resistencia a múltiples fármacos<sup>42</sup>.

<sup>43</sup>.

La resistencia a las enzimas AmpC mediada por plásmidos es menos común que la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en la mayor parte del mundo. Las AmpC más comunes pertenecen a las familias: CMY, FOX, y DHA<sup>42</sup>.

## **6.5 Enterobacterias productoras de $\beta$ -lactamasas causantes de infecciones de vías urinarias**

La distribución de infecciones causadas por bacterias Gramnegativas productoras de  $\beta$ -lactamasas es mundial. Debido a la frecuencia con que se presentan estas infecciones se han realizado muchos estudios en diferentes partes del mundo, con el propósito de describir la magnitud del problema. Pero a simple vista es difícil tener una incidencia a escala geográfica que sea acertada porque ha sido difícil de determinar debido a que esta puede variar entre diferentes hospitales.

Sin embargo se han realizado estudios recientes en diferentes zonas como en Estados Unidos y Europa publicado por Winokur y col. Con los siguientes resultados: Estados Unidos (Porcentaje de BLEE *K. pneumoniae* 7.6%, *E. coli* 3.3% y *P.mirabilis* 4.9%)<sup>9</sup>; Europa (Porcentaje de BLEE *K. pneumoniae* 22.6%, *E. coli* 5.3% y *P.mirabilis* 11.1%)<sup>9</sup>. En America Latina Sader y col. encontraron entre los aislamientos que el porcentaje de BLEE *K. pneumoniae* era de 47.3% y *E. coli* 6.7%<sup>10</sup>. En el pacifico de Asia Bell y col. obtuvieron un porcentaje de BLEE en *K. pneumoniae* 25.2%, *E. coli* 10.1% y *P. mirabilis* 1.4%)<sup>11</sup>.

En Nicaragua información referente a la prevalencia de bacterias Gramnegativas multirresistentes y productoras de BLEE es escasa. Sin embargo es importante indicar que el Ministerio Nacional de Salud posee un sistema de vigilancia en algunos departamentos del país para la detección de BLEE, no así de los genes que lo producen, sin embargo no ha habido un reporte oficial hasta la fecha de hoy. Entre las publicaciones que abordan este problema en Nicaragua, Amaya y col., en su estudio de resistencia antimicrobiana en bacterias Gramnegativas aisladas de neonatos con sepsis y del ambiente de la sala de cuidados intensivos de neonatos (UCIN) del Hospital

Escuela Oscar Danilo Rosales (HEODRA) León, indican que la mayoría de estos patógenos fueron altamente resistentes y con una alta prevalencia de producción de TEM, SHV y CTX-M. Además, se encontraron clones similares de *K. pneumoniae* multi-resistentes y productores de BLEE que afectaron a los neonatos y que también fueron aislados del ambiente<sup>12</sup>. Otro ejemplo es el de Matute y col., en su estudio sobre resistencia antimicrobiana en uropatógenos, indican que *E. coli* (56%), *Klebsiella spp.* (18%), *Enterobacter spp.* (11%), *Proteus spp.* (3%) fueron los microorganismos más aislados; siendo *E. coli* resistente a amoxicilina (74%), trimetoprim-sulfametoxazole (63%), ciprofloxacina (29%), gentamicina (11%) y amoxicilina-ácido clavulánico (34%)<sup>13</sup>. En otro estudio más reciente Bours y col. analizaron el perfil de resistencia de uropatógenos, los resultados muestran porcentajes altos de resistencia ante antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento contra este patógeno; por ejemplo, en *E. coli* se encontró alta resistencia a ampicilina (61.4%), amoxicilina-ácido clavulánico (18.6%), ceftriaxona (20.5%), gentamicina (25.0%), trimetoprim-sulfametoxazole (38.6%), ciprofloxacina (31.8%), y cefalotina (45.5%)<sup>14</sup>.

Las infecciones de vías urinarias pueden ocurrir en cualquier parte del tracto urinario pero usualmente en la vejiga, riñones o próstata. Desde el punto de vista microbiológico el crecimiento de  $\geq 10^5$  organismos por mililitro en la muestra de orina indica infección<sup>44</sup>.

Muchos microorganismos pueden infectar el tracto urinario, pero la mayoría de los agentes son bacilos Gramnegativos. *E. coli* causa el 80% de infecciones agudas. Otros bacilos Gramnegativos, especialmente *Proteus* y *Klebsiella spp.* ocasionalmente. *Enterococcus spp.* y *Staphylococcus coagulasa* negativos son Grampositivos que se aislan comúnmente. Ciertas levaduras como *Candida albicans* (más común), *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* también se pueden aislar del tracto urinario<sup>44, 45</sup>.

En la gran mayoría de las infecciones, las bacterias ganan acceso a la vejiga a través de la uretra. El ascenso de las bacterias desde la vejiga puede darse a continuación y es probablemente la vía de entrada para la mayoría de las infecciones del parénquima renal<sup>44</sup>.

La virulencia de un organismo se relaciona con su capacidad de adhesión a las células epiteliales. *E. coli* tiene muchas proyecciones, en forma de pelo, llamadas fimbrias o pili que interactúan con la glicoproteína y los receptores de glucolípidos en el epitelio renal. Hay dos grandes tipos de fimbrias tipo I y tipo P. La adhesina de fimbrias tipo I se conoce como “FimH” y se une a un receptor de glicoproteína en la célula que expresa manosa en su sitio de unión. La adhesina en la fimbrias tipo P (PapG) se une a un receptor glicosfingolípido que expresa el azúcar Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$  (uno de los P antígenos de grupo sanguíneo). Fimbrias tipo I con unión de manosa permiten la colonización del epitelio por *E. coli*, mientras la fimbria P inicia la cascada inflamatoria<sup>46</sup>.

## **6.6 Tratamiento a enterobacterias productoras de $\beta$ -lactamasas que causan infecciones de vías urinarias**

El tratamiento para las infecciones de vías urinarias requiere de antibióticos específicos dirigidos a un agente conocido o que se presume que está causando la infección<sup>45</sup>. En relación al microorganismo infectante y la localización anatómica de este se emplean diversos tratamientos empíricos para tratar de eliminar a estos agentes como: trimetoprim-sulfametazole, quinolonas, macrólidos y nitrofurantoina (cistitis no complicada); quinolonas, ceftriazona o gentamicina y trimetoprim-sulfametazole (pielonefritis no complicada); ampicilina y gentamicina, quinolonas, aztreonam y ticarcillin/clavulanato (infección de vías urinarias complicada)<sup>44</sup>. Los fármacos que usualmente se prescriben basados en las recomendaciones del MINSA son: cotrimoxazole, amoxicillina, ampicilina, aminoglucósidos, cefalosporinas, ácido nalidíxico y nitrofurantoina<sup>4</sup>.

La presencia de BLEE complica la selección del antibiótico a emplearse especialmente en pacientes con infecciones serias como bacteremia. La razón de esto es que las bacterias productoras de BLEE son usualmente multiresistentes a varios antibióticos, un dato interesante es que las cepas productoras de CTX-M acarrean co-resistencia a fluoquinolonas<sup>37</sup>.

**6.6.1 Carbapenems:** son considerados el tratamiento de elección contra infecciones serias causadas por bacterias productoras de BLEE ya que varios estudios han puesto de manifiesto la efectividad clínica y los resultados de infecciones graves tratadas con los carbapenems<sup>47</sup>.

**6.6.2 Cefalosporinas:** las cefalosporinas de segunda y tercera generación no son consideradas como opciones de tratamiento debido al alto nivel de resistencia. Sin embargo, cefepima, una cefalosporina de cuarta generación muestra una mejor actividad (en comparación con otras cefalosporinas) contra algunas bacterias que producen BLEE. Estudios *in vitro* han confirmado que los microorganismos son generalmente susceptibles a la acción antimicrobiana de cefepima, lo que sugiere la elección de este antibiótico para el tratamiento de algunas infecciones causadas por cepas que son resistentes a cefalosporinas de tercera generación<sup>47</sup>.

**6.6.3 Cefamicinas:** se evita la prescripción de estas por la co-resistencia a estos agentes contra enterobacterias productoras de BLEE, principalmente por la pérdida de porinas o expresión concomitante de  $\beta$ -lactamasas tipo AMP-C<sup>47</sup>.

**6.6.4 Combinaciones de betalactámicos/ inhibidores de  $\beta$ -lactamasas:** el grado de actividad de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas contra la hidrólisis de betalactámicos por enzimas BLEE puede variar por el tipo de inhibidor así como el tipo de BLEE.<sup>16</sup> Diferentes estudios sugieren que piperacilin/tazobactam puede ser de gran ayuda en el tratamiento de algunas infecciones de patógenos productores de BLEE. Sin embargo esta recomendación debe ser interpretada cuidadosamente debido a la poca base de datos<sup>47</sup>.

**6.6.5 Aminoglucósidos:** desde que la mayoría de las BLEE están localizadas en plásmidos grandes que albergan genes de resistencia a otra clase de antibióticos, especialmente gentamicina y tobramicina; la resistencia a aminoglucósidos se ha aumentado recientemente con el surgimiento de *E. coli* productora de CTX-M-15 en la comunidad. Por lo tanto el uso de estos antibióticos es limitado<sup>47</sup>.

**6.6.6 Fluroquinolonas:** la resistencia a las fluoroquinolonas ha llegado a inmensas proporciones en Enterobacteriaceae productoras de CTX-M, con tasas de resistencia que van del 55% al 100% en diferentes áreas del mundo. Por lo tanto, las fluoroquinolonas tienen un papel limitado en el tratamiento de la infección causada por las bacterias productoras de BLEE. Sin embargo siguen siendo una opción si el aislamiento a prueba es susceptible a estos agentes<sup>47</sup>.

**6.6.7 Otros agentes:** la Fosfomicina es un bactericida que actúa como inhibidor de la pared celular interfiriendo en el primer paso de biosíntesis de peptidoglicano. Tiene un amplio espectro de actividad y la resistencia en aislamientos clínicos es rara. Después de muchos años de uso, la fosfomicina sigue siendo activa frente a uropatógenos más comunes y la incidencia de cepas resistentes de *E. coli* es baja (alrededor de 2%)<sup>47</sup>.

La Nitrofurantoina es un nitrofurano restringido para tratamiento o prevención de cistitis no complicada; y es una opción para las infecciones de vías urinarias no complicadas por bacterias productoras de BLEE<sup>47</sup>.

La tigeciclina, un derivado de la minociclina, es el primer miembro de la clase de gliciliclinas disponible para uso clínico. Tiene la propiedad de evadir los mecanismos comunes de resistencia a las tetraciclinas que expresan bacterias Gramnegativas y Grampositivas. La tigeciclina ha demostrado una excelente actividad frente *E. coli* productora de BLEE, especialmente las productoras de enzimas CTX-M<sup>47</sup>.

Otros agentes como temocilina y colistina muestran buena actividad *in vitro* contra bacterias productoras de BLEE. Sin embargo, no hay muchos datos clínicos sobre el uso de estos medicamentos para las infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE<sup>47</sup>.

## **6.7 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar**

La prueba de sensibilidad por difusión con discos o método de Kirby-Bauer consiste en colocar discos de papel impregnados de antibióticos en la superficie de un agar

previamente inoculado con una suspensión bacteriana de concentración conocida<sup>48</sup>.

Se produce simultáneamente la difusión de antibiótico y el crecimiento bacteriano en la superficie del agar. Cuando se alcanza la masa celular crítica de bacterias, después de 4 ó 10 horas, aparece el crecimiento bacteriano. En el área donde la concentración de antibiótico es suficiente para evitar el crecimiento bacteriano se observa un halo de inhibición con borde definido claramente y con el disco ubicado en el centro del círculo. En el borde de este halo la concentración del antibiótico, conocida también como concentración crítica se aproxima a la MIC obtenida en las pruebas de dilución<sup>48</sup>.

De los muchos medios disponibles, se considera el Agar Mueller-Hinton como el mejor para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas por las siguientes razones: reproducibilidad aceptable lote a lote para ensayos de susceptibilidad, es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetoprim, y tetraciclina, crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos no fastidiosos<sup>48</sup>.

### **6.7.1 Factores que afectan el diámetro del halo de inhibición:**

*6.7.1.1 Profundidad:* la medición de la profundidad del agar debe realizarse con cada nueva preparación de Mueller-Hinton y debe ser de 4mm. Este grosor se logra agregando 25 ml de agar por cada plato de 100 mm de diámetro. Cuando se tengan lotes de Petri mayores de este diámetro se debe agregar mayor cantidad de agar de tal manera que la profundidad del agar sea siempre de 4mm<sup>48</sup>.

*6.7.1.2 pH:* el pH de cada lote de agar Mueller- Hinton debería ser chequeado cuando el medio es preparado. El agar debe tener un pH entre 7.2 y 7.4 después de gelificar a temperatura ambiente. Si el pH es muy bajo, ciertas drogas parecería que pierden potencia (por ej. aminoglicósidos, quinolonas y macrólidos), mientras otros agentes pueden presentar excesiva actividad (por ej. tetraciclinas). Si el pH es muy alto, puede esperarse efectos opuestos. El pH puede ser controlado por ejemplo macerando una cantidad suficiente de agar para sumergir la punta del electrodo<sup>48</sup>.

6.7.1.3 *Humedad*: un exceso de humedad justo antes del uso se presenta en la superficie del agar, las placas deberían ponerse en una incubadora (35°C) o una cámara de flujo laminar con las placas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se haya perdido por evaporación (usualmente 10 a 30 minutos). La superficie debe ser húmeda, pero sin gotas de humedad en la superficie del medio o en la tapa de la placa antes de ser inoculada<sup>48</sup>.

6.7.1.4 *Efectos de Timidina y Timina*: el medio que contiene excesiva cantidad de Timidina o Timina puede invertir los efectos inhibitorios de sulfonamidas y trimetoprim, dando zonas más pequeñas, menos nítidas o ninguna zona, lo que podría resultar en un falso informe de resistencia. El agar Mueller-Hinton a usar debe ser de tan bajo contenido en Timidina como sea posible. Un medio satisfactorio dará esencialmente zonas nítidas de inhibición de  $\geq 20$  mm<sup>48</sup>.

6.7.1.5 *Efectos de cationes divalentes*: la variación en cationes divalentes, principalmente Magnesio y Calcio, afecta los resultados de ensayo de aminoglicósidos y tetraciclinas con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Un contenido excesivo de cationes reduce el tamaño de las zonas, mientras que el bajo contenido podría resultar en un tamaño inaceptable de la zona de inhibición<sup>48</sup>.

## **6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (Siglas en inglés: PCR)**

El PCR es un método libre de células, rápido y sensitivo de clonación de fragmentos de ADN. El PCR estándar es un procedimiento *in vitro* para la amplificación de una secuencia específica de ADN, desde cantidades muy pequeñas de material genético o de origen antiguo. La amplificación específica requiere alguna información primordial sobre las secuencias del ADN objetivo. Basado en esta información, dos primers de alrededor 15-25 pares de bases son diseñados. Los primers son complementarios para unirse a los extremos 3' del sitio de unión y se une específicamente a este<sup>49</sup>.

El PCR es una reacción en cadena porque las nuevas bandas de ADN actúan como plantillas para futura síntesis de ADN que son alrededor de 25-35 ciclos subsecuentes.

Teóricamente cada ciclo duplica la cantidad de ADN amplificado. Al final, al menos están presentes 105 copias del objetivo específico a secuenciar. Esto puede ser visualizado como una banda de tamaño específico después de la electroforesis en gel<sup>49</sup>.

Cada ciclo, involucra 3 tiempos estrictamente controlados y reacciones a temperaturas controladas en termocicladores automatizados, toma alrededor de 1-5 minutos. Los 3 pasos en cada ciclo son: desnaturalización de la doble cadena de ADN, entre 93-95°C, la fusión de los primers entre 50-70°C dependiendo de la temperatura de fusión esperada del ADN de doble cadena, y la síntesis de ADN utilizando ADN polimerasa termoestable (a partir de microorganismos que viven en fuentes calientes como el *Thermophilus aquaticus*, taq polimerasa), casi siempre entre 70-75°C. En cada ciclo posterior el ADN sintetizado sirve como plantilla para otra ronda de síntesis. El primer ciclo da como resultado ADN sintetizado de longitudes variables que terminan en 3' porque la síntesis continúa más allá del sitio de secuencia. Lo mismo pasa durante los ciclos subsecuentes, pero las cadenas variables son rápidamente superadas por ADN nuevo con longitudes corregidas a ambos extremos porque la síntesis no puede continuar pasado el término de los primers en la plantilla opuesta<sup>49</sup>.

## 7. Metodología

- **Tipo de estudio:** Descriptivo de corte transversal.
- **Periodo de estudio:** Enero a Julio del 2010
- **Población de estudio:** Todas las enterobacterias aisladas a partir de urocultivos en los Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León y en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional La Asunción, Juigalpa, en el período comprendido de Enero a Julio del 2010.
- **Muestreo:** No probabilístico por conveniencia.
- **Muestra:** 110 enterobacterias aisladas de urocultivos.
- **Criterios de inclusión:** Solamente enterobacterias aisladas de urocultivos recolectados.
- **Aislamiento bacteriano e identificación:** Las bacterias fueron aisladas de los centros: Laboratorio de Microbiología y Parasitología (Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León) y el laboratorio de bacteriología del Hospital Regional La Asunción (Juigalpa). Siguiendo los criterios de identificación para Enterobacterias del Manual de procedimientos de bacteriología médica del MINSA<sup>50</sup>.
- **Colección:** Las enterobacterias aisladas se guardaron en crioviales de rosca (NUNC, Rochester, Estados Unidos) que contenían 2 ml caldo leche (Oxoid Hampshire, Inglaterra) y 5 gotas de glicerina. Seguidamente se refrigeraran a -20° C hasta su procesamiento final.
- **Perfil de resistencia y detección fenotípica de BLEE:** Las muestras refrigeradas se sembraron en agar MacConkey para su refrescamiento. Posteriormente se resembraron en agar Müeller-Hinton para realizar sensibilidad

antimicrobiana y se utilizaron los antibióticos recomendados por CLSI para la detección fenotípica de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas. Los antibióticos utilizados fueron<sup>23,51</sup>:

- Aztreonam 30  $\mu$ g (ATM; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
  - Cefotaxima 30  $\mu$ g (CTX; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
  - Cefpodoxima 30  $\mu$ g (CPD; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
  - Ceftazidima 30  $\mu$ g (CAZ; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
  - Ceftriaxona 30  $\mu$ g (CRO; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- **Confirmación fenotípica de BLEE:** Para la confirmación de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se utilizó la prueba de sinergia de triple disco con una variación para la detección simultánea de AmpC y carbapenemasas. Los antibióticos utilizados fueron<sup>50, 52</sup>.
    - Imipenem 10  $\mu$ g (IMP; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
    - Meropenem 10  $\mu$ g (MER; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
    - Amoxicilina con ácido clavulánico 10  $\mu$ g (AMC; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
    - Ceftazidima 30  $\mu$ g (CAZ; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
    - Ceftriaxona 30  $\mu$ g (CRO; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
    - Piperacilina/tazobactam 10  $\mu$ g (TZP; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
    - Cefoxitina 30  $\mu$ g (FOX; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
  - **Análisis de resultados:** Los resultados fueron analizados con el programa WHONET 5.6.
  - **Detección de genes *bla*SHV, *bla*TEM y *bla*CTX-M en enterobacterias por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**
    - **Extracción de ADN:** 5 colonias por cada muestra fueron suspendidas en 500

µl de PBS. La suspensión bacteriana fue hervida por 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 14000 RPM por 3 minutos para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se utilizó para PCR<sup>53</sup>.

**Multiplex PCR:** El PCR para la detección de los genes que codifican para β-lactamasas se realizó utilizando cebadores universales, siguiendo el procedimiento descrito por Fang et al<sup>54</sup>. Como control positivo para la detección de los genes se utilizó una cepa previamente analizada y publicada sobre la misma temática abortada en este estudio.

**Tabla1. Primers utilizados para el multiplex PCR:**

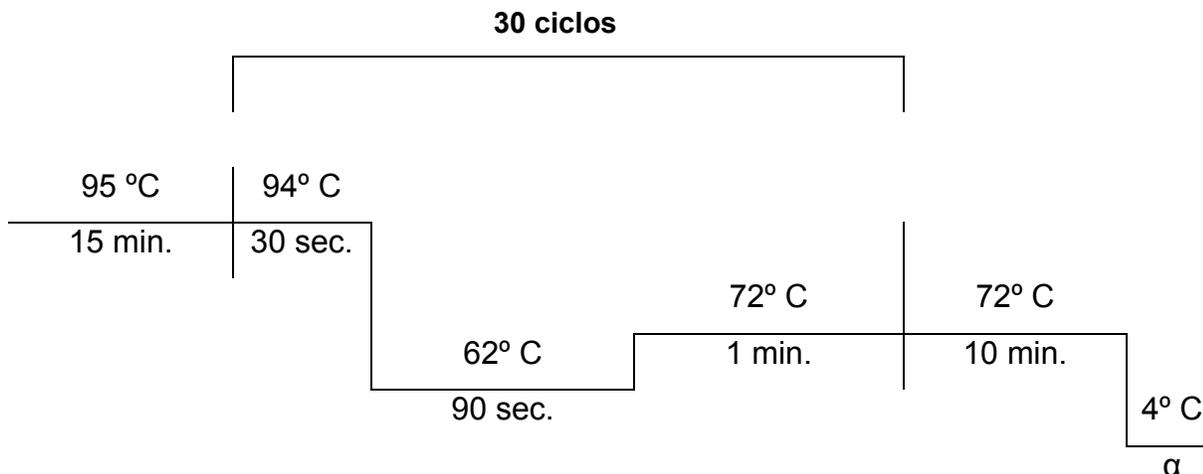
Objetivo	Secuencia (5´-3´)	Producto
<i>blaSHV</i>	f: CTT TAT CGG CCC TCA CTC AA r: AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG	273 pb
<i>blaTEM</i>	f: CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA r: ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT	445 pb
<i>blaCTX-M</i>	f: ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC r: TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGAAYC AGC GG	593 pb

Para la amplificación del ADN molde se utilizó puReTaq Ready-To-Go PCR beads, por cada tubo de PCR bead se agregaron las cantidades de la mezcla de PCR como se detalla a continuación.

**Tabla 2. Mezcla de PCR**

Material	µL por reacción	Concentración final
<i>blaCTX-Mf</i> 10 µM	0.5	0.2 µM
<i>blaCTX-Mr</i> 10 µM	0.5	0.2 µM
<i>blaTEMf</i> 10 µM	0.5	0.2 µM
<i>blaTEMr</i> 10 µM	0.5	0.2 µM
<i>blaSHVf</i> 10 µM	0.5	0.2 µM
<i>blaSHVr</i> 10 µM	0.5	0.2 µM
Agua MilliQ	20	
ADN molde	2	

**Figura 2. Programa de amplificación para *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M***



- **PCR para grupos de CTX-M:** Se realizó single PCR para la detección de los grupos *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2* y *blaCTX-M-9* siguiendo el procedimiento descrito por Pitout et al<sup>55</sup>.

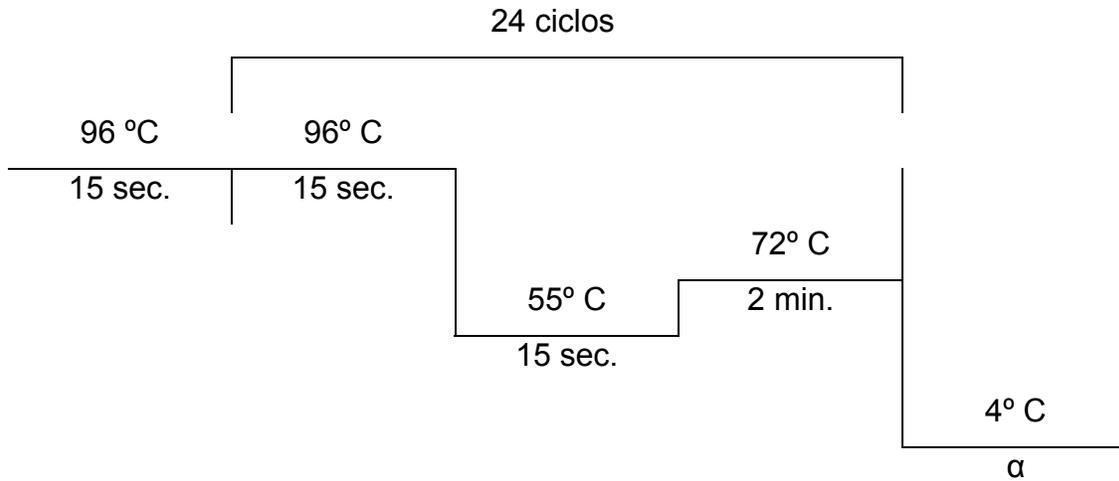
**Tabla 3. Primers utilizados:**

Objetivo	Secuencia (5´-3´)	Producto
CTX-M Grupo 1	f: GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC r: AGC CG C CGA CGC TAA TAC A	499 pb
CTX-M Grupo 2	f: GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C f: CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	351 pb
CTX-M Grupo 9	f: GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG r: GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG	474 pb

Para la amplificación del ADN molde se utilizaron puReTaq Ready-To-Go PCR beads, por cada tubo PCR bead se agregaron:

**Tabla 4. PCR para la detección enzimas del tipo CTX-M grupo 1 y 2**

Material	µL por reacción	Concentración final
Primer f 10 µM	2	0.8 µM
Primer r 10 µM	2	0.8 µM
Agua MilliQ	19	
<i>ADN molde</i>	2	



**Figura 3. Programa de amplificación para *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2 y *bla*CTX-M-9**

El equipo que se utilizó fue el DNA Thermal Cycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.3% con marcador de 100 pb (New England Biolab), teñido con bromuro de etidio, expuesto a luz ultravioleta y fotografiado.

## 8. Resultados

### Identificación bacteriana:

Se aislaron 110 enterobacterias, 50% de ellas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León y el otro 50% en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional La Asunción, Juigalpa. La bacteria Gramnegativa que se aisló con más frecuencia en ambos laboratorios fue la *E. coli*, que representó un 85.45% (94/110) del total de bacterias aisladas en este estudio.

**Tabla 5. Aislamiento bacteriano**

Microorganismos	Número de aislados	
	León	Juigalpa
<i>E. coli</i>	46	48
<i>P. mirabilis</i>	2	2
<i>C. freundii</i>	1	
<i>S. marcescens</i>	1	
<i>E. cloacae</i>		3
<i>Klebsiella spp.</i>	5	2
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>55</b>

### Perfil de resistencia y detección de $\beta$ -lactamasas:

Se encontró que el 27.3% (30/110) de las bacterias estudiadas fueron productoras de  $\beta$ -lactamasas, de estos aislados el 90% (27/30) eran *E. coli*.

El perfil de resistencia de las *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas muestra que estas fueron resistente en un 100% a ceftriaxona. Además, se observó niveles altos de resistencia a otros antibióticos por ejemplo: aztreonam (80.7%), cefotaxima (92.3%), cefpodoxima (96.1%), ceftazidima (84.6%) y amoxicilina con ácido clavulánico (92.3%). Es importante indicar que la resistencia a cefoxitina 30%(9/30) fue un indicativo de producción de betalactamasa tipo AMP-C de acuerdo a la norma indicada por CLSI.

**Tabla 6. Perfil general de resistencia**

Microorganismos	No. Aislados	Detección fenotípica						
		Porcentaje de resistencia						
		ATM	CTX	CPD	CAZ	CRO	AMC	FOX
<i>E. coli</i>	26	80.7	92.3	96.1	84.6	100	92.3	23
<i>C. freundii</i>	1 <sup>+</sup>	100	100	100	100	100	100	100
<i>P. mirabilis</i>	1 <sup>+</sup>	100	100	100	100	100	100	
<i>S. marcescens</i>	1 <sup>+</sup>	100	100	100	100	100	100	100
<i>Klebsiella spp.</i>	1 <sup>+</sup>	100	100	100	100	100	100	100

ATM, Aztreonam; CTX, Cefotaxima; CPD, Cefpodoxima; CAZ, Ceftazidima; CRO, Ceftriaxona; AMC, Amoxicilina con ácido clavulánico; FOX, Cefoxitina.

\* Dato no incluido en tabla: El resto de las bacterias estudiadas mostraron sensibilidad a todos los antibióticos.

<sup>+</sup> Notese que estos aislados son únicos, por esto los antibióticos a los que son resistentes aparece representado en un 100%.

Se realizó un tamizaje para la detección de carbapenemasas mediante el uso de los antibióticos Meropenem, Imipenem y Piperacilina/tazobactam. Sin embargo, no se identifico ningún aislado productor de estas enzimas.

En las bacterias productoras de BLEE se detectaron que de los 20 aislados de *E. coli*, 10 de estos poseen el gen que codifica para la enzima CTX-M, 9 aislados poseen genes que codifican para *bla*CTX-M y *bla*TEM y solo un aislado presentó únicamente el gen TEM. En el aislado de *Citrobacter freundii* se detectaron los genes *bla*TEM y *bla*CTX-M. Ningún aislado sometido a estudio producía el gen que codifica para la enzima SHV.

**Tabla 7. Detección de β-lactamasas**

Microorganismo	Fenotípico		Genotípico			
	BLEE	AMP-C	CTX-M	TEM	CXT-M y TEM	SHV
<i>E. coli</i>	20	6	10	1	9	
<i>C. freundii</i> *	1	1			1	
<i>P. mirabilis</i>	1		1			
<i>S. marcescens</i>		1				
<i>Klebsiella spp</i>		1				
<i>Total</i>	22	9	11	1	10	

\*Esta bacteria Produce tanto enzimas AMP-C como CTX-M y TEM.

**Tabla 8.  $\beta$ -lactamasas identificadas según el lugar de procedencia de los aislados**

Microorganismos	León				Juigalpa			
	CTX-M	TEM	AMP-C	CTX-M y TEM	CTX-M	TEM	AMP-C	CTX-M y TEM
<i>E. Coli</i>	8	1	1	6	2		5	3
<i>P. mirabilis</i>	1							
<i>C. freundii</i> *			1	1				
<i>Klebsiella spp.</i>			1					
<i>S. marcescens</i>			1					
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>2</b>		<b>5</b>	<b>3</b>

\*Esta bacteria Produce tanto enzimas AMP-C como CTX-M y TEM.

### **Clasificación de grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9**

Se lograron identificar 21 aislados de bacterias Gramnegativas productoras de enzimas del tipo CTX-M, las cuales corresponden al grupo CTX-M-1, 16 *E. coli*. Del grupo CTX-M-2 se detectaron 3 *E. coli*. No se identificó ningún aislado que codificara para el gen *bla*CTX-M-9.

**Tabla 9. Clasificación de grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9**

Microorganismos	León		Juigalpa	
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-1	CTX-M-2
<i>E. Coli</i>	12	2	4	1
<i>P. mirabilis</i>	1			
<i>C. freundii</i>	1			
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>

## 9. Análisis de Resultados

La multiresistencia es un problema de salud pública que ha venido en aumento en los últimos años; ha traído como consecuencia altos índices de mortalidad y el uso de tratamientos ineficientes frente a bacterias que poseen genes que codifican para enzimas capaces de hidrolizar los antibióticos; aumentando los costos de resolución<sup>2</sup>, por lo que se hace necesario conocer la frecuencia con que estos patógenos se presentan en nuestro medio, tanto en infecciones nosocomiales como en la comunidad (especialmente IVU). En nuestro país no existe un informe que detalle la magnitud de la situación.

Los datos obtenidos en este estudio muestran que *E. coli* es el microorganismo más frecuente entre los aislados (85.45%). Esto se relaciona con estudios anteriores tal como el estudio de resistencia en uropatógenos de IVU sintomáticas en León, Nicaragua realizado por Matute y cols., sus resultados también muestran que *Escherichia coli* (56%) fue el patógeno más frecuentemente aislado. Además, observaron niveles altos de resistencia en este patógeno a amoxicilina (82%), trimetoprima-sulfametoxazole (64%), ciprofloxacina (30%), amoxicilina-clavulánico (21%) y gentamicina (12%)<sup>14</sup>. Otro estudio realizado por Bours y cols., también indica que *E. coli* (48.4%) es el principal patógeno aislado en pacientes con IVU; además muestran niveles altos de resistencia a ampicilina (61.4%), cefalotina (45.5%), trimetoprima-sulmetoxazole (38.6%), ciprofloxacina (31.8%) y ceftriaxona (20.5%). Amicacina y nitroforantoina fueron los únicos a los que los aislados mostraron sensibilidad. En el presente estudio se encontró que los aislados de *E. coli* fueron resistentes a ceftriaxona (31.9%), aztreonam (24.5%), cefotaxima (34%), cefpodoxima (30.9%), ceftazidima (21.3%) amoxicilina con ácido clavulánico (26.6%) y a cefoxitina (9.6%)<sup>5</sup>. (Tabla 2).

Todas las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas (27.3%) fueron resistentes a Ceftriaxona. De estas el 30%(9/30) eran productoras de AMP-C, este tipo de enzima interfiere en el diagnóstico correcto de las BLEE dado que enmascara su detección al responder de la misma manera al tamizaje<sup>43</sup>. Esta situación se solucionó utilizando las técnicas moleculares empleadas en este estudio que indicó la presencia ó ausencia de enzimas

BLEE. Jacoby refiere que la resistencia por la producción de enzimas AmpC mediada por plásmidos es menos común que la producción de BLEE según estudios realizados<sup>42</sup>.

Como ya se había mencionado, el significado clínico de las  $\beta$ -lactamasas radica en la capacidad que tienen de hidrolizar de manera efectiva penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, limitando así las opciones terapéuticas; lo que consecuentemente aumenta los costos de hospitalizaciones y cuidados del paciente<sup>5</sup>. Los resultados muestran que los aislados productores de  $\beta$ -lactamasas tuvieron altos niveles de resistencia a ceftriaxone (100%), aztreonam (80.7%), cefotaxima (92.3%), cefpodoxima (96.1%), ceftazidima (84.6%) y amoxicilina con ácido clavulánico (92.3%).

El estudio realizado por Bradford<sup>20</sup> refiere que SHV puede ser el tipo de BLEE más frecuente en aislados clínicos de cualquier tipo. Sin embargo en este estudio no se identificó la presencia del gen *blaSHV* en ningún aislado tratándose específicamente de muestras procedentes de la comunidad.

Paterson y col. descubrieron el primer aislamiento de TEM de Latinoamérica en *K. pneumoniae*<sup>34</sup>. También Villegas y col. demostraron la presencia de los genes *blaTEM* más comunes en Sur América<sup>56</sup>. En el presente estudio se detectaron genes que codifican para la enzima TEM (33.3%) tanto en León (23.3%) y Juigalpa (10%) especialmente en los aislados de *E. coli*; de igual manera Rodríguez-Baño detectó genes que codifican para la producción de  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M (69%), SHV (32%) y TEM (6%) en 122 aislados de *E. coli* procedentes de la comunidad<sup>57</sup>. Lo que confirma la epidemiología cambiante de las  $\beta$ -lactamasas a nivel mundial, actualmente la enzimas del tipo CTX-M son las de mayor prevalencia a nivel mundial<sup>58</sup>.

Pitout afirma que el grupo de enzimas CTX-M se han convertido en un problema de salud pública ya que se encuentran presentes en la mayoría de las bacterias asociadas a infecciones tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad. *E. coli* generalmente es el responsable de la producción de  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M y aparentemente suele ser un patógeno productor de BLEE estrictamente adquirido en la

comunidad<sup>37</sup>. Desde el 2000, las *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M han emergido a nivel mundial como una importante causa de infecciones de vías urinarias<sup>9, 37</sup>. Esto reafirma los resultados de este estudio donde se analizaron muestras procedentes de la comunidad siendo *E. coli* el mayor productor de la enzima CTX-M, todas procedentes de la comunidad de León 72.7% (16) y Juigalpa 22.7% (5).

Organismos productores de CTX-M específicas han sido aislado en diferentes países: La CTX-M-9 y CTX-M-14 son las más frecuentes en España; CTX-M-14 en Canadá y China; CTX-M-1 en Italia; CTX-M-3 en Polonia; CTX-M-2 en Japón, Israel y en la mayoría de los países de Sur América; mientras que la CTX-M-15 se ha encontrado en todos los continentes exceptuando La Antártica<sup>38,39</sup>. La prevalencia de enzimas CTX-M en Latinoamérica está entre las más altas a nivel mundial<sup>56</sup>. En Nicaragua no se ha realizado un estudio sobre uropatógenos y la producción de enzimas BLEE con análisis moleculares; sin embargo, Amaya y col. detectaron una alta prevalencia en bacterias Gramnegativas portadoras de genes *bla*TEM-1, *bla*SHV-11/12 y *bla*CTX-M-15 aislados de neonatos con septicemia que se encontraban en UCIN y del ambiente de esta sala, en el HEODRA, León. En este estudio se investigó la presencia de los genes *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2 y *bla*CTX-M-9. Se lograron identificar 21 cepas productoras de CTX-M, las cuales corresponden al grupo CTX-M-1 (16) y del grupo CTX-M-2 (3) todas *E. coli*. Del grupo CTX-M-9 no se detectó ninguna bacteria.

Entre las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M se observó una producción simultánea de otro tipo de betalactamasa específicamente TEM. Se ha indicado que CTX-M-15 está asociada con la co-producción de otras  $\beta$ -lactamasas tales como TEM-1, OXA-1 y de enzimas modificadora de aminoglucosidos<sup>55</sup>.

En este estudio se realizó un tamizaje para la detección de carbapeneasas con meropenem, imepenem y Piperacilina/tazobactam. Sin embargo no se identificó ningún aislado productor de estas enzimas.

## 10. Conclusiones

Este estudio demostró la presencia de los genes *bla*TEM y *bla*CTX-M por métodos moleculares, permitiendo de esta manera conocer la frecuencia en que se detectan en bacterias Gramnegativas aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios de los municipios de León y Juigalpa.

Mediante el método de Kirby-Bauer se logró identificar 30 (27.3%) aislados productores de  $\beta$ -lactamasas por este método fenotípico, 9 de ellos producían la enzima AmpC; de igual manera se demostró que ningún aislado era productor de carbapenemasas según este método fenotípico.

En León la frecuencia de los genes fue: *bla*CTX-M 40.9% (9/22), *bla*TEM 4.5% (1/22) y *bla*TEM/CTX-M 31.8% (7/22); mientras que en Juigalpa *bla*CTX-M 9.1% (2/22) y *bla*TEM/CTX-M 13.6% (3/22). De la misma manera, en León se logró identificar con más frecuencia el gen *bla*CTX-M, 14 de los aislados acarreaban el gen *bla*CTX-M-1 y 2 aislados el gen *bla*CTX-M2; mientras que en Juigalpa solo 4 aislados presentaron el gen *bla*CTX-M-1 y un aislado el gen *bla*CTX-M-2. En León también se encontró con mayor proporción el gen *bla*TEM en 8 aislados; mientras que en Juigalpa sólo se identificaron 3.

## **11. Recomendación**

Proporcionar los resultados del estudio al MINSA para proveer información de la magnitud del problema de manera que se pueda tomar como un modelo para establecer un sistema de vigilancia, tanto a nivel fenotípico como a nivel molecular de aislados bacterianos productores de BLEE en diferentes laboratorios nacionales; todo esto con el fin de mejorar las medidas de control que prevengan la diseminación de  $\beta$ -lactamasas en bacterias de origen nosocomial y de la comunidad.

## 12. Bibliografía

1. **Akram M, Shahid M y Khan AU.** Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007; 6:4.
2. **Foxman B.** The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* 2010;7, 653–660.
3. **Mashouf RY, Babalhavaeji H y Yousef J.** Urinary Tract Infections: Bacteriology and Antibiotic Resistance Patterns. *Indian pediatrics.* 2009; vol.47.
4. **Centro Nicaragüense de Farmacoepidemiología.** Elección de antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas. León. 2008.
5. **Bours PHA, Polak R, Hoepelman AIM, Delgado E, Jarquin A. y Matute AJ.** Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. *Int J Infect Dis.* 2010; 14.
6. **Abraham EP, y Chain E.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.*1940:146; 837.
7. **Harada S, Ishii Y y Yamaguchi K.** Extended spectrum betalactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med.* 2008; 28:401-12.
8. **Pfeifer Y, Cullik A y Witte W.** Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010:300; 371–379.
9. **Perez F, Endimian A, Hujer KM y Bonono R.** The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7:459–469.
10. **Winokur PL, Canton R, Casellas JM y Legakis N.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and

characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:S94—103.

11. **Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S y Biedenbach DJ.** Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44:273—280.
12. **Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA y Jones RN.** Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998—99). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 42:193—198.
13. **Amaya EJ.** Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria affecting children from León, Nicaragua (Tesis doctoral) Estocolmo. Karolinska Institutet. 2010.
14. **Matute A.J. et al.** Resitance of uropathogens in symptomatic urinary tract infections in León, Nicaragua. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 23: 506—509.
15. **Murray P.** Microbiología Médica 5<sup>ta</sup> Edición. Elsevier España, S.A. 2006.
16. **Madigan MT, Martinko JM y Parker J;** Biology of Microorganism. 10<sup>ma</sup> Edición. Prentice-Hall editorial. 2005.
17. **Brooks FG, Butler JS, Jawetz E, Melnick JL;Ornston LN, Alderberg EA.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Alderberg. 15<sup>a</sup> Ed Manual moderno. México.
18. **Flores J.** Farmacología Humana.3ra Ed.Masson.1997.España.
19. **Blanc V.** Caracterización de cepas y de plásmidos de Enterobacteriaceae portadores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (Tesis Doctoral). Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona. 2007.
20. **Mandell D y Bennetts.** Principles & Practice of Infectious Diseases 5<sup>ta</sup> Ed.Churchill Livingstone. 2000.

- 21. Frost LS, Leplae R, Summers AO y Toussaint.** Mobile genetic elements: the elements of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3:722-732.
- 22. Alekshum MN y Levy SB.** Molecular mechanisms of antimicrobial resistance. *The Cell.* 2007; 128:1037-1050.
- 23. Coyle MB.** Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbiology. OPS. 2005.
- 24. Paterson DL y Bonomo RA.** Extended-Spectrum beta-lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; Oct: 657–686.
- 25. Peleg AY y Hooper DC.** Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med* 2010; 362:1804-13.
- 26. Bradford PA.** Extended-Spectrum beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; Oct.:933–951.
- 27. Rice LB y Bonono RA.** Beta-lactamases: which ones are clinically important? *Drug Resist updat.* 2000; 3:178-179.
- 28. Casellas JM y Goldberg M.** Incidence of strains producing extended spectrum beta-lactamases in Argentina. *Infection.* 1989; 17:434-6.
- 29. Gutmann LB. et al.** SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33:951-6.
- 30. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, y Casellas JM.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 154-8.

- 31. Mosqueda-Gomez et al.** Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* a case-control study. 2008. *Int J Infect Dis.* 12:653-9.
- 32. Patel JB, Rasheed JK y Kitchel B.** Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clin Microbiol Newsl.* 2009; 31:8.
- 33. Queenan AM Bush K.** Carbapenemases: the Versatile Beta-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 440–458.
- 34. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB y Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:3554-60.
- 35. Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum betalactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48 (1): 1-14.
- 36. Rossolini GM, D'Andrea MM y Mugnaioli C.** The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:33-41.
- 37. Pitout JDD, Laupland KB.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 159–66
- 38. Peirano G, Pitout JDD.** Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M beta-lactamases: .the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35:316–321.
- 39. Canton R, Coque TM.** The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 5:466-75.

- 40. Patel JB, Rasheed JK y Kitchel B.** Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clin Microbiol Newsl.* 2009 31:8.
- 41. Queenan AM Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 440–458.
- 42. Jacoby GA.** AmpC Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 161–182.
- 43. Thomson KS.** ESBL, AmpC, and Carbapenemase Issues. *Clin Microbiol* 2010; 48:1019-1025.
- 44. Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB y Fauci AS.** Harrison: Principles of Internal Medicine. McGraw Hill. 2008.
- 45. Ennglerberg NC, Dirita V y Dernoty TS.** Mechanisms of microbial disease. 4 ta Edición. Lippincott Williams and Wilkins. 2007.
- 46. Lee JBL y Neild GH.** Urinary tract infection. *Medicine* 2007;35; 423-428.
- 47. Pitout JDD.** Infections with Extended-Spectrum beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Changing Epidemiology and Drug Treatment Choices. *Drugs.* 2010; 70:313-333.
- 48. Clinical y Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved Standard—Ninth Edition. M2-A9, vol. 26. CLSI. 2007.
- 49. Passarge E.** Color Atlas of Genetics 2<sup>nd</sup> Ed. Editorial Thieme. 2001.
- 50. CNDR/MINSA.** Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica Edición 2004. MINSA. Managua. 2004.
- 51. Seral C, Pardos M, Francisco y Castillo J.** Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm*

*Infec Microbiol Clin.* 2010; 28:12-18.

**52. Famiglietti et al.** Consenso sobre pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en enterobacterias. *Rev argent microbiol.* 2005; 37:57-66.

**53. Vilchez S et al.** Prevalence of diarrhoeagenic *E. coli* in children from León, Nicaragua. *J Med Microbiol.* 2009; 58:630-637.

**54. Fang H, Ataker F, Hedin G y Dornbusch K.** Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:707-12.

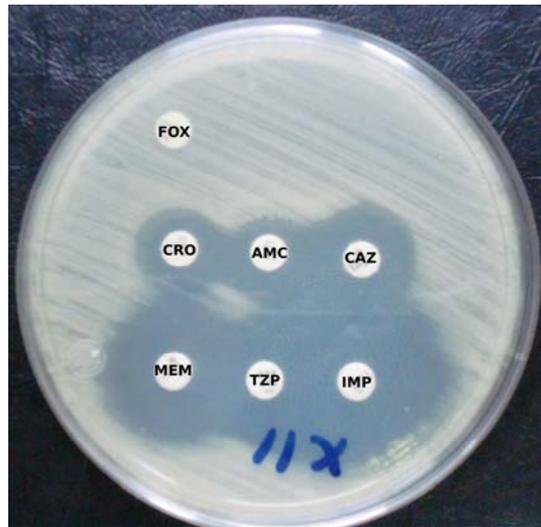
**55. Pitout, JD, Hossain A y Hanson ND.** Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5715-2.

**56. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG y Casellas JM.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:154-8.

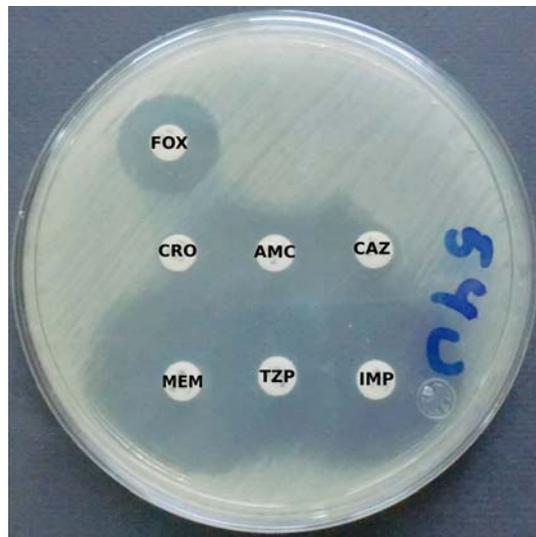
**57. Rodríguez-Baño J, Alcalá J Cisneros JM, et al.** *Escherichia coli* producing SHV-type extended spectrum beta-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J antimicrob Chemother.* 2009; 63:781-784.

**58. Oteo J, Perez M y Campos J.** Extended-spectrum beta-lactamses producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin In infect Dis.* 2010; 23:320-326.

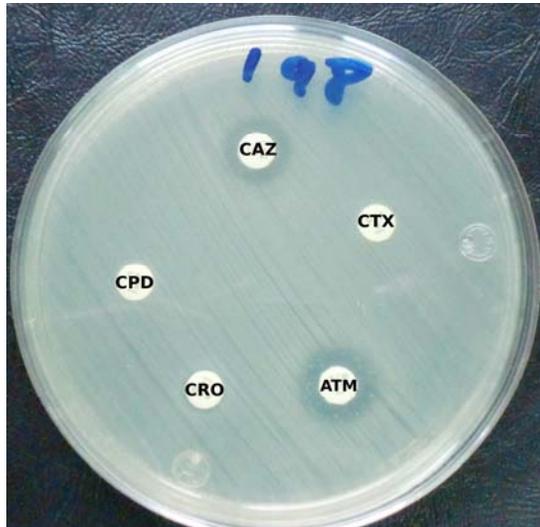
### 13. Anexos



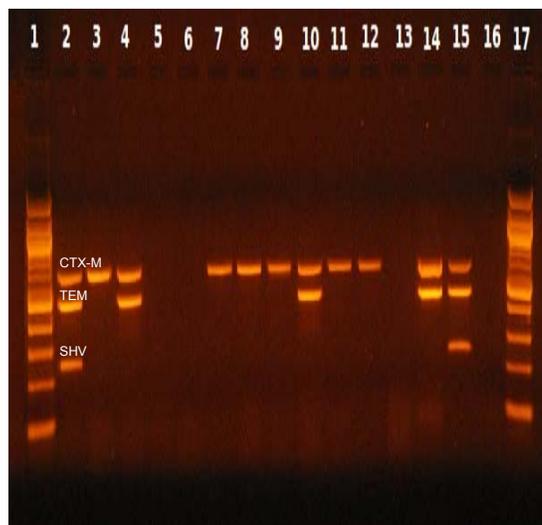
**Fig 4. AmpC positivo.** Por resistencia a Cefoxitina. CAZ, Ceftazidima; CRO, Ceftriaxona; AMC, Amoxicilina con ácido clavulánico; FOX, Cefoxitina, MEM. Meropenem, TZP Piperacilina-tazobactam, IMP. Imipenem.



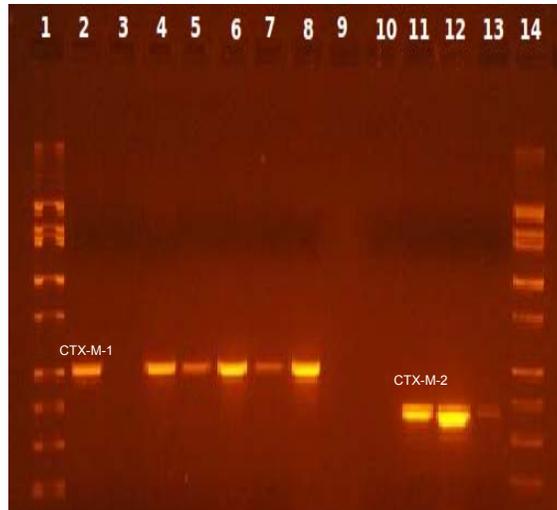
**Fig 5. BLEE positivo por método del triple disco.** CAZ, Ceftazidima; CRO, Ceftriaxona; AMC, Amoxicilina con ácido clavulánico; FOX, Cefoxitina, MEM. Meropenem, TZP Piperacilina- tazobactam, IMP. Imipenem.



**Fig 6. BLEE positivo tamizaje por puntos de corte; según CLSI.** ATM, Aztreonam; CTX, Cefotaxima; CPD, Cefpodoxima; CAZ, Ceftazidima; CRO, Ceftriaxona



**Fig 7. Detección genes TEM, SHV y CTX-M.** Pozos 1 y 17, marcador molecular; pozos 2 y 15, control positivo; pozos 3, 7, 8, 9, 11 y 12, muestras positivas para *bla*CTX-M; pozos 4, 10 y 14, muestras positivas para *bla*TEM y *bla*CTX-M, pozos 5, 6, 13 y 16, muestras negativas.



**Fig 8. Detección genes CTX-M-1 y CTX-2.** Pozo 1,14: marcador molecular, pozo 2: control positivo, pozo 4, 5, 6, 7,8: positivo para CTX-M-1, pozo 11, 12,13: positivo para genes CTX-M-2, Pozo 3, 9,10: muestras negativas.

**Tabla 10. Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas según clase molecular y sustrato**

$\beta$ -lactamasa	Ejemplo	Sustrato	Inhibición por ac. Clavulanico	Clase Molecular
<b>Amplio espectro</b>	TEM-1, TEM-2, SHV1	Penicilina (penicilina G), aminopenicilinas (amoxicilina y ampicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina), cefalosporinas de espectro reducido (cefazolina, cefalotina, cefamandol, cefuroxima, y otros)	XXX	A
	Familia OXA	Sustrato del grupo de amplio espectro, más cloxacilina, meticilina y oxacilina	X	D
<b>Espectro extendido</b>	Familia TEM y SHV	Sustratos del grupo de amplio espectro oximino más cefalosporinas (cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima y ceftriaxona) y monobactam (aztreonam).	XXXX	A
	Otras ( Familia BES1, GES/IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1, y VEB-2)	Igual que en la familia TEM y SHV	XXXX	A
	Familia CTX-M	Sustratos del grupo de espectro extendido, más, para algunas enzimas, cefepime	XXXX	A
	Familia OXA	Igual que para la familia CTX-M	X	D
<b>AmpC</b>	Familia ACC-1, ACT1, CFE-1, CMY, DHA-1, DHA-2, Familia FOX, Familia LAT, MIR-1, MOX-1, y MOX-2	Sustratos del grupo de espectro expandido más cefamicinas (cefotetán, cefoxitina, y otros)	0	C
<b>Carbapenemasas</b>	Familia IMP, Familia VIM, GIM-1, y SPM-1	Sustratos del grupo de espectro expandido más cefamicinas y carbapenémicos (ertapenem, imipenem y meropenem)	0	B
	KPC-1, KPC-2, y KPC-3	Igual que para la familia IMP, familia VIM, GIM-1, y 1-SPM	XXX	A
	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, y OXA-48	Igual que para la familia IMP, familia VIM, GIM-1, y 1-SPM	X	D

**Tabla 11. Recomendaciones del CLSI para detectar BLEE en *E. coli* spp. y *Klebsiella* spp.**

<b>Difusión con discos</b>	
<b>Antibiótico (carga)</b>	<b>Criterio</b>
Cefpodoxima (10 µg)	< 17 mm
Cefotaxima (30 µg)	< 27 mm
Ceftriaxona (30 µg)	< 25 mm
Ceftazidima (30 µg)	< 22 mm
Aztreonam (30 µg)	< 27 mm