

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
Licenciado en Bioanálisis Clínico.

Perfil de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli*
diarreagénicas y no diarreagénicas aisladas en niños a nivel
comunitario en León, Nicaragua.

Autores:

Br. Ramiro Ignacio Guido Martínez
Br. José Ramón Rocha Megia.

Tutores:

Dr. Erick Amaya. PhD

MSc. Margarita Paniagua.

León, marzo del 2013.

“A la libertad por la universidad”



DEDICATORIA

A nuestros padres y hermanos, por todos sus consejos y apoyo incondicional en todo momento de nuestra vida.

**José Rocha.
Ramiro Guido.**

A mi esposa Hánica López, por darme apoyo en todo momento.

Ramiro Guido.



“Perfil de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas aisladas en niños de León, Nicaragua”.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarnos e iluminarnos siempre en nuestro camino.

Agradecemos especialmente a nuestro tutor Lic. Erick Amaya PhD, Co-tutora Lic. Margarita Paniagua MSc, por guiarnos en la realización de este estudio y por todas sus enseñanzas de índole académica y humana.

Al personal del laboratorio de Microbiología especialmente a Edwin Herrera y Antonia Obando, por su colaboración con la preparación de materiales para el procesamiento de las muestras.

A los niños que formaron parte de esta investigación y al personal que colaboró en la toma de muestras.

A mis queridos amigos y colegas por su gran apoyo.

A todas aquellas personas que con sus conocimientos, experiencia, y amistad, colaboraron en la realización de este estudio.

A TODOS... MUCHAS GRACIAS.



RESUMEN.

Las enfermedades diarreicas constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial, afectando principalmente a niños de las regiones subdesarrolladas. En los últimos años en nuestro medio, *Escherichia coli* es la principal bacteria aislada en los casos de diarrea a nivel comunitario. El objetivo de este estudio fue determinar el perfil de resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas aislados en niños a nivel comunitario en León, Nicaragua. Todos los aislados fueron previamente caracterizados por PCR. Fueron analizadas 48 *E. coli* no diarreagénicas, 22 ETEC, 32 EPEC, 11 EHEC, 12 EAEC. De forma general se encontró que la mayoría de los aislados de *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas fueron resistentes a tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazole en un 64.8 % y 49.6 % respectivamente. *E. coli* diarreagénicas mostraron niveles de resistencia elevados a ácido nalidíxico, cloranfenicol, aztreonam e imipenem. Mientras que las no diarreagénicas a trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacina. Es interesante resaltar que ambos grupos mostraron niveles similares de resistencia a tetraciclina. Los niveles de resistencia fueron diferentes para cada patotipo, por ejemplo: EHEC a ciprofloxacina (81.8%, $P < 0.05$) y EAEC a trimetoprim/sulfametoxazol (25%, $P < 0.05$). Al comparar los niveles de resistencia en aislados de *E. coli* provenientes de pacientes sintomáticos y asintomáticos se encontró diferencia significativa en el trimetoprim-sulfametoxazol, mostrándose un mayor nivel de resistencia en las EHEC provenientes de pacientes sintomáticos (81.8%). En general el nivel de multiresistencia fue del 30.4%, de los cuales el 86.8% eran sintomáticos. Todos los aislados de *E. coli* no presentaron rasgos fenotípicos de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Estos resultados sugieren que los aislados de *E. coli* de niños sintomáticos y asintomáticos, no han alcanzado los niveles más altos de resistencia a los antibióticos como en otros países.

Palabras claves: Resistencia antimicrobiana, *Escherichia coli*, diarrea.



INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE ABREVIATURAS.	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
5. OBJETIVOS.....	6
5.1 GENERAL	6
5.2 ESPECÍFICOS	6
6. MARCO TEÓRICO.....	7
6.1 Agente etiológico.....	7
6.1.1 <i>E. coli</i> enteropatógena.....	9
6.1.2 <i>E. coli</i> enterotoxigénica.....	9
6.1.3 <i>E. coli</i> enterohemorrágica.....	10
6.1.4 <i>E. coli</i> enteroinvasiva.....	10
6.1.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa.....	11
6.1.6 <i>E. coli</i> de adherencia difusa.....	11
6.2 Especies no patógenas de <i>E. coli</i> que colonizan el intestino.....	12
6.3 Mecanismos genéticos de adquirir resistencia antimicrobiana en aislados de <i>E. coli</i> diarreagénicas y no diarreagénicas.....	13
6.3.1 Transformación.....	13
6.3.2 Conjugación.....	14
6.3.3 Transducción.....	16
6.4 Mecanismo de resistencia antimicrobiana en bacterias Gram-negativas..	17
6.4.1 Flujo de antibiótico fuera de la bacteria.....	18
6.4.2 Permeabilidad de la membrana exterior.....	18
6.4.3 Modificación del blanco.....	18



“Perfil de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas aisladas en niños de León, Nicaragua”.



6.4.4 Modificación enzimática del antibiótico.....	19
6.5 Antimicrobianos utilizados en la diarrea.	19
6.6 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.....	20
6.7 Factores que afectan el diámetro del halo de inhibición.....	21
6.7.1 Profundidad.	21
6.7.2 pH.	21
6.7.3 Húmedad.	21
6.7.4 Concentración de Timidina y Timina.....	22
6.7.5 Concentración de cationes divalentes.	22
7. MATERIAL Y MÉTODO.....	24
8. RESULTADOS.....	30
9. DISCUSIÓN.....	34
11. RECOMENDACIONES.....	38
12. BIBLIOGRAFÍA.....	39
13. ANEXOS.....	44



LISTA DE ABREVIATURAS.

EPEC: <i>E. coli</i> enteropatógena.	OriT: Origen de transferencia.
ETEC: <i>E. coli</i> enterotoxigénica.	CIM: Concentración mínima inhibitoria.
EHEC: <i>E. coli</i> enterohemorrágica.	BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.
EAEC: <i>E. coli</i> enteroagregativa.	W/V: Peso/Volumen
EIEC: <i>E. coli</i> enteroinvasiva.	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
DAEC: <i>E. coli</i> enteroadherente.	FEP: Cefepime
O: Antígeno somático.	CRO: ceftriaxone
H: Antígeno flagelar	AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico
K: Antígeno capsular.	CTX: cefotaxime.
U/B: Unión borrado	CAZ: ceftazidime
LBE: Locus de Borrado Enterocítico.	NAL: Ácido nalidíxico.
LT: Toxina termolábil.	CHL: Cloranfenicol.
ST: Toxina termoestable	TCY: Tetraciclina.
ADP: Adenosín difosfato.	SXT: Trimetoprim/sulfametoxazol.
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.	IPM: Imipenem.
Stx: Toxina Shiga	GEN: Gentamicina.
MDa: Mega Dalton	CIP: Ciprofloxacina.
SUH: Síndrome Urémico Hemolítico.	ATM: Aztreonam.
UPEC: <i>E. coli</i> Uropatógena.	
LPS: Lipopolisacárido	



1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial, afectando principalmente niños menores de 5 años de las regiones subdesarrolladas. Son causa importante de la morbi-mortalidad infantil, especialmente por su relación con la desnutrición ⁽¹⁾.

En países latinoamericanos las diarreas agudas constituyen enfermedades de elevada prevalencia y pueden ser causadas por una gran variedad de agentes patógenos, entre ellos se encuentra *Escherichia coli* ^(1,2).

Las cepas de *E. coli* asociadas a gastroenteritis se subdividen en los seis principales grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxígena (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC) ⁽²⁾.

En Nicaragua, como en la mayoría de los países en vías de desarrollo, el uso de fármacos antimicrobianos no es regulado por las instituciones de salud, pudiendo ser comprados en farmacias, tiendas y supermercados sin orden médica ⁽³⁾. Por otro lado, los pacientes generalmente no toman los esquemas terapéuticos completos cuando son prescritos por el médico, la escasez de medios de diagnóstico, medicamentos y vacunas, así como deficiencias en materia de investigación y desarrollo de nuevos productos, son factores que contribuyen a la magnificación del problema, por esto es necesario estudiar la resistencia antimicrobiana en uno de los grupos etiológicos de principal prevalencia en nuestro medio como es la *E. coli* causante diarrea ⁽³⁾.



2. ANTECEDENTES.

La *E. coli* es el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente los taxónomos le adjudicaron el nombre de *E. coli*, en honor a su descubridor. ⁽⁴⁾.

A nivel internacional se han realizado diferentes estudios sobre resistencia antimicrobiana de *E. coli*. En el 2009, Osvaldo López Cuevas cols., en su estudio sobre detección y resistencia antimicrobiana de *E. coli*, analizaron 46 cepas, encontrando que 82.6% fueron resistente a estreptomicina, 19.5% fueron resistente a tetraciclina, y solo el 2.2% fue resistente a gentamicina ⁽⁵⁾.

Erika Hannaoui, realizó un estudio de identificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli* diarreagénicas, aisladas de niños con diarrea aguda en Cumaná, Venezuela en el 2009. Se evaluó la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos: ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), aztreonam (ATM), tetraciclina (TCY), trimetoprim/sulfametoxazol(SXT), imipenem (IPM), cefixima (CFM), ampicilina/sulbactam (SAM). Las *E. coli* diarreagénicas mostraron mayor resistencia a los antibióticos SAM, TCY y SXT ⁽⁶⁾.

En octubre del 2007 Gloria Luz Paniagua Contreras en el estudio “Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* diarreagénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex”, se observó que la mayoría de las cepas fueron resistentes a cefalotina, carbenicilina, ampicilina y trimetoprim/sulfametoxazol ⁽⁷⁾.



En Nicaragua se ha estudiado sobre el perfil de resistencia antimicrobiana en *E. coli*: Erick Amaya y cols., en un estudio sobre perfil de resistencia antimicrobiana de *E.coli* diarreagénicas y no diarreagénicas de niños sintomáticos y asintomáticos, encontraron alta resistencia para ampicilina (60%), trimetoprim/sulfametoxazol (24%) y cloranfenicol (11%) ⁽⁸⁾.



3. JUSTIFICACIÓN.

En los últimos años ha crecido la preocupación de que la era antimicrobiana esté llegando a su fin. En primer lugar, porque la producción de nuevos antibióticos ha disminuido drásticamente y en segundo porque las bacterias muestran un mecanismo adecuado de resistencia para evitar la actividad de dichos agentes (aunque algunas bacterias aún permanecen sensibles a tratamientos bien establecidos hace tiempo) ⁽⁹⁾.

Los diferentes tipos de *E. coli* generan importantes problemas de resistencia antimicrobiana y, por tanto, de control del tratamiento antibiótico. Las bacterias están entre los principales patógenos asociados a la diarrea, en el caso de la *E. coli* algunos estudios han demostrado el surgimiento de cepas resistentes a la acción antimicrobiana ⁽⁹⁾.

Aunque de manera general, no se recomienda el uso de antibióticos para el tratamiento de la diarrea, algunos autores la recomiendan por ejemplo cuando el patógeno ha sido identificado, para evitar la propagación o para prevenir la diarrea en viajeros, de manera que con el surgimiento de cepas de *E. coli* resistentes a la acción antibacteriana es de esperar que estos agentes fallen cuando sean necesarios ⁽¹⁰⁾.

En nuestro país se han realizado estudios enfocados en la resistencia antimicrobiana, pero la información no es tomada en cuenta por parte del clínico al momento de elegir el fármaco a administrar ⁽³⁷⁾. Con el presente trabajo se pretende aportar datos que ayuden a ampliar la epidemiología de la resistencia antimicrobiana en *E. coli*.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuál es el perfil de resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas obtenidas de niños sintomáticos y asintomáticos en una vigilancia a nivel comunitario en León, Nicaragua?



5. OBJETIVOS.

5.1 GENERAL

- Identificar el perfil de resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas obtenidas de niños sintomáticos y asintomáticos en una vigilancia a nivel comunitario en León, Nicaragua.

5.2 ESPECÍFICOS

- Determinar la resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas aisladas de niños a nivel comunitario.
- Comparar la resistencia antimicrobiana entre los diferentes aislados de *E. coli* de niños sintomáticos y asintomáticos de diarrea.
- Detectar producción de betalactamasas de espectro extendido en aislados de *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas.



6. MARCO TEÓRICO.

Los efectos de las infecciones del tracto gastrointestinal varían entre el episodio leve y autolimitado de diarrea hasta la diarrea grave, a veces mortal. En ocasiones se observan también vómitos, fiebre y malestar general ⁽¹¹⁾.

La diarrea es el resultado de una mayor pérdida de líquidos y electrolitos hacia la luz intestinal, lo que da lugar a unas heces informes o líquidas que puede considerarse como el método adoptado por el huésped para eliminar expeditivamente el agente patógeno (un sistema que al mismo tiempo contribuye a su diseminación). Sin embargo muchas situaciones no infecciosas también causan diarrea, por lo que la etiología infecciosa no debe darse por supuesta ⁽¹¹⁾.

6.1 Agente etiológico.

Los enteropatógenos frecuentemente asociados con la diarrea infantil son: Virus (*Rotavirus*, *Calicivirus humano*, *Norovirus*, *Sapovirus*, *Astrovirus* y *Adenovirus entérico*); bacterias (*E. coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter spp.*, y *Vibrio cholerae*); Parásitos (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*) ⁽¹²⁾.

La principal bacteria aislada en los casos de diarrea es *E. coli*. De acuerdo con el régimen modificado Kauffman, *E. coli* es serotipificada sobre la base de sus antígenos: O (somático), H (flagelar), y K (capsular). En la actualidad son reconocidos un total de 170 diferentes antígenos O ⁽¹³⁾.



El descubrimiento de que varias estructuras moleculares diferentes, incluyendo fimbrias, condujo a los expertos a la reestructuración de la designación de antígeno K que sólo incluyen polisacáridos ácidos. Antígenos proteínicos fimbriales, se han eliminado de la serie K y se han dado las designaciones F⁽¹³⁾. (Figura 1).

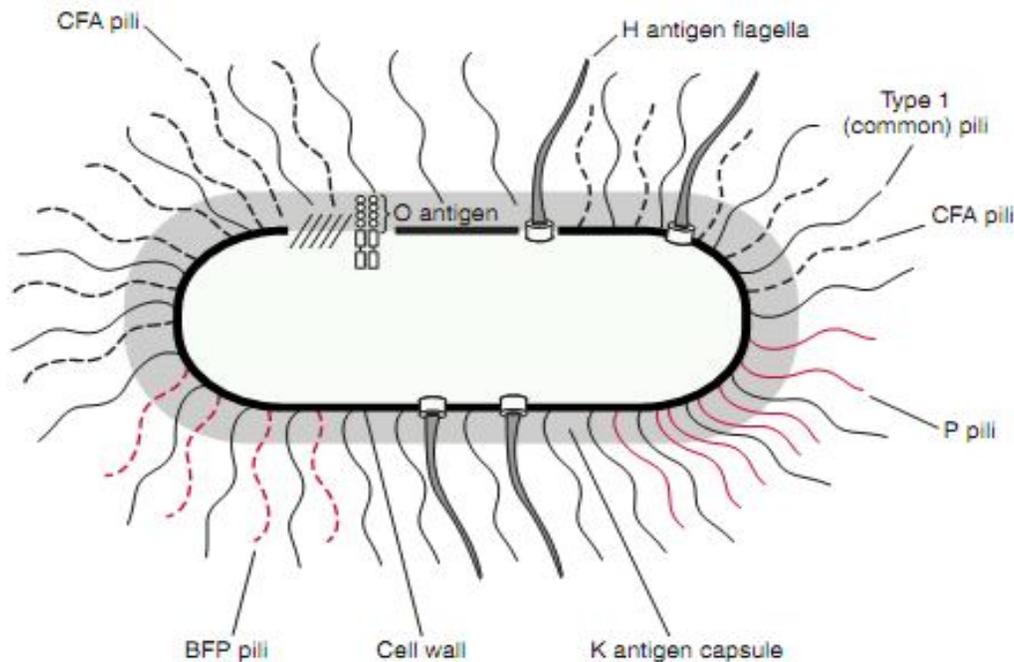


Figura 1: Serotipificación de *E. coli* según régimen modificado de Kauffman⁽¹³⁾.

Este agente se clasifica de acuerdo a factores de virulencia como: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxígena (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteroadherente difusa (DAEC)⁽¹³⁾.



6.1.1 *E. coli* enteropatógena.

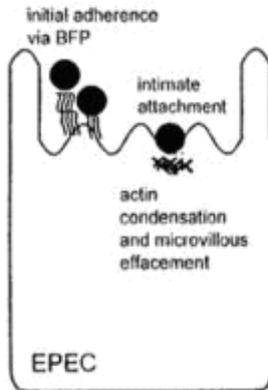


Figura 2:
Interacción de EPEC con la célula eucariote ⁽⁴⁾.

La infección por EPEC se caracteriza por la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino delgado con la destrucción posterior de las microvellosidades (histopatología por unión/borrado [U/B]). Los genes del «locus de borrado enterocítico (LBE)» se hallan en una isla de potencial patogénico. Esta isla incluye más de 40 genes y se ocupa de la unión y la destrucción de la superficie mucosa del anfitrión. (Figura 2) ⁽¹⁴⁾.

6.1.2 *E. coli* enterotoxigénica

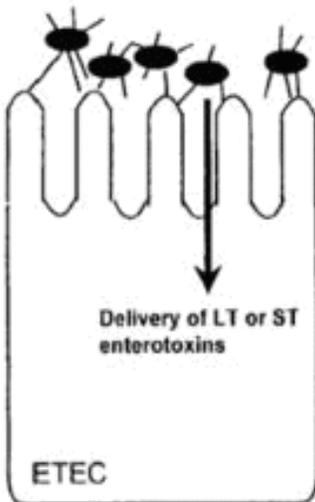


Figura 3:
Mecanismo de acción de las toxinas LT y ST ⁽⁴⁾.

ETEC sintetiza dos clases de enterotoxinas: toxinas termolábiles (LT-I, LT-II) y toxinas termoestables (STa y STb). Mientras que la LT-II no se asocia a enfermedad en el ser humano, LT- I es funcional y estructuralmente semejante a la toxina del cólera y se asocia a enfermedad en el ser humano (Figura 3). Esta toxina está formada por una subunidad A y por cinco subunidades B idénticas ⁽¹⁵⁾.

Después de la endocitosis, la subunidad A de LT- I se transloca por la membrana de la vacuola. La subunidad A tiene actividad difosfato de adenosina (ADP)-ribosiltransferasa e interacciona con una proteína de membrana (Gs) que regula la adenilciclase ⁽¹⁵⁾.



El resultado neto es el aumento de las concentraciones de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), con un incremento de la secreción de cloro y disminución de la absorción de cloro y de sodio, que se manifiestan con diarrea acuosa ⁽¹⁵⁾.

6.1.3 *E. coli* enterohemorrágica.

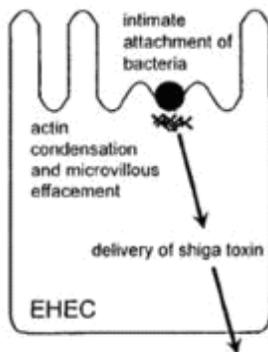


Figura N° 4 Mecanismo de acción de la toxina Shiga. ⁽⁴⁾.

Las cepas de EHEC expresan la toxina Shiga (Stx-1, Stx-2, o ambas), inducen lesiones de U/B en las células epiteliales y poseen un plásmido de 60 MDa que transporta los genes de otros factores de virulencia (Figura 4). Stx-1 es esencialmente idéntica a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*; Stx-2 presenta una homología del 60%. Ambas toxinas se adquieren a partir de bacteriófagos lisogénicos. Las toxinas poseen una subunidad A y cinco subunidades B ⁽¹⁶⁾.

6.1.4 *E. coli* enteroinvasiva.

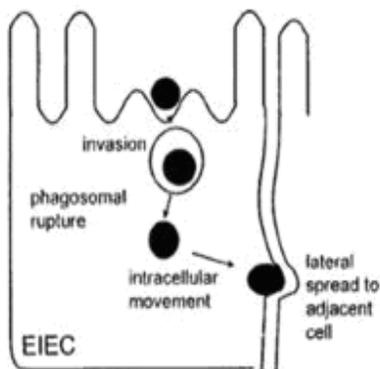


Figura 5: Mecanismo de invasión de las EIEC ⁽⁴⁾.

Las EIEC son capaces de invadir y destruir el epitelio colónico para producir una enfermedad que se caracteriza inicialmente por diarrea acuosa (Figura 5). Una minoría de pacientes evoluciona a la forma disentérica de la enfermedad, la cual debuta con fiebre, espasmos abdominales y presencia de sangre y leucocitos en las heces ⁽¹⁷⁾.



6.1.5 *E. coli* enteroagregativa.

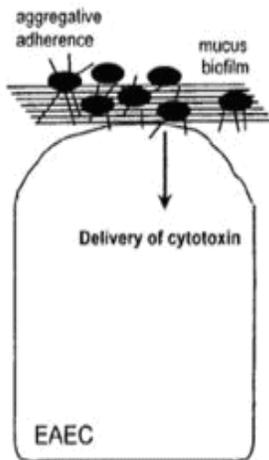


Figura N° 6:
Mecanismo de agregación de EAEC en el enterocito. ⁽⁴⁾.

Las cepas de *E. coli* enteroagregativa se han visto implicadas en una diarrea acuosa, persistente y con deshidratación en niños de los países en vías de desarrollo y en personas que han viajado a estos países. La persistencia de estas bacterias se asocia a la presencia de diarrea crónica y a un retraso del desarrollo de los niños afectados. Estas bacterias se caracterizan por su capacidad de aglutinarse entre sí en una organización de «ladrillos apilados». Este proceso está mediado por unas fimbrias formadoras de haces (fimbrias de adherencia agregativa I y II), las cuales son codificadas por un plásmido ⁽⁴⁾.

6.1.6 *E. coli* de adherencia difusa.

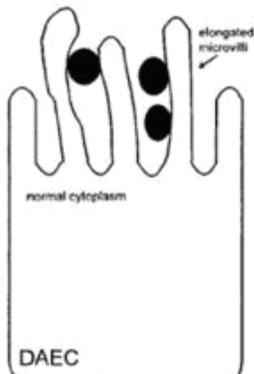


Figura N° 7:
Mecanismo de adhesión DAEC ⁽⁴⁾.

El término “*E. coli* de adherencia difusa” fue inicialmente usado para referirse cepas de *E. coli* HEp-2-adherente que no formaban microcolonias parecidas a *E. coli* enteropatógena. Con el descubrimiento de EAEC, la mayoría de autores ahora reconocen DAEC como una categoría independiente *E. coli* potencialmente diarreagénica ⁽¹⁸⁾.

Las características patogénicas por la cual DAEC produce diarrea son poca conocidas. Bilge describió la clonación y caracterización de una fimbria de superficie en esta cepa que sirve como mediador de la adherencia difusa ⁽¹⁸⁾.



6.2 Especies no patógenas de *E. coli* que colonizan el intestino.

Las especies de *E. coli* comprenden a las no patógenas (comensales), así como a las cepas patógenas. Las cepas comensales de *E. coli* representan por lo general habitantes normales y ecológicamente importantes de los intestinos humanos y animales que puede convertirse en variantes patogénicas y viceversa. Es importante estudiar los aspectos evolutivos del desarrollo de los rasgos de la colonización y el comensalismo en cepas particulares ⁽¹⁹⁾.

Ambas cepas patógenas y las no patógenas de *E. coli* son capaces de colonizar el intestino y se adaptan bien a las condiciones que se encuentran en el intestino grueso. Las cepas de *E. coli* se diferencian en la presencia de información genética que pueden contribuir a los rasgos específicos de virulencia o para el éxito de supervivencia y la aptitud de las bacterias en el huésped ⁽²⁵⁾. La mayoría de los determinantes genéticos para codificar factores, se cree que son adquiridos por la transferencia horizontal de genes y son a menudo agrupados en el cromosoma de Geis ⁽²⁰⁾.

E. coli del serogrupo O6 es muy heterogénea, incluidas las organizaciones no patógenas y patógenas variantes. El serotipo O6 es comúnmente detectado entre los comensales intestinales, así como *E. coli* diarreagénica, pero es ampliamente distribuido entre *E. coli* uropatógenos (UPEC). En el caso de las cepas de uropatógenos O6, el intestino puede servir como un reservorio de infecciones recurrentes del tracto urinario ^(8, 21).

La cepa *E. coli* Nissle 1917 (O6: K5: H1) es un ejemplo típico de una no patógena, que constituye la base de la preparación probiótica Mutaflor, que se utiliza para el tratamiento de diversos trastornos intestinales y es conocido por ser un exitoso colonizador del intestino humano ⁽²²⁾.



Esta cepa carece de las fimbrias P y S (adhesinas determinantes), pero expresa fimbrias tipo 1 y F1C. Exhibe un lipopolisacárido (LPS) y no produce toxinas proteicas conocidas. Por otra parte, la cepa Nissle 1917 expresa dos microcinas, y posee un número sorprendentemente alto de los sistemas de captación de hierro ⁽²²⁾.

6.3 Mecanismos genéticos de adquirir resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas.

El intercambio de material genético entre las células bacterianas puede tener lugar a través de uno de los tres mecanismos siguientes:

- **Conjugación**, que consiste en un apareamiento o intercambio casi sexual de información genética entre una bacteria (donante) y otra bacteria (receptora).
- **Transformación**, la cual provoca la adquisición de nuevos marcadores genéticos mediante la incorporación de ADN exógeno.
- **Transducción**, la cual se caracteriza por la transferencia de información genética de una bacteria a otra por medio de un bacteriófago. En el interior de la célula, el transposón puede «saltar» entre distintas moléculas de ADN (Ej., plásmido a plásmido o plásmido a cromosoma) ⁽²³⁾.

6.3.1 Transformación.

Es el proceso mediante el cual las bacterias captan fragmentos de ADN desnudo y los incorporan a sus genomas. La transformación fue el primer mecanismo de transferencia genética que se descubrió en las bacterias ⁽²⁴⁾. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son capaces de captar y conservar de forma estable ADN exógeno ⁽²⁴⁾.

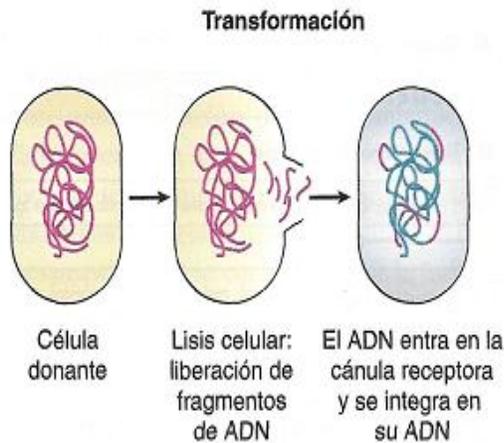


Figura N° 8: Mecanismo de transformación en *E. coli* ⁽²⁾.

Ciertas especies presentan una capacidad natural de captación de ADN exógena (por lo que se definen como «competentes»), como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus spp.* y *Neisseria spp.* (Figura 8). La competencia aparece al final de la fase logarítmica de crecimiento, un cierto tiempo antes de que la población bacteriana entre en la fase estacionaria. La mayor parte de las bacterias no muestra una capacidad natural de captación del ADN ⁽²⁴⁾.

6.3.2 Conjugación.

La conjugación se produce en la mayoría de las eubacterias. Se da entre bacterias pertenecientes a una misma especie o de especies relacionadas, aunque también tiene lugar entre procariontas y células vegetales, animales y micóticas ⁽²⁵⁾.

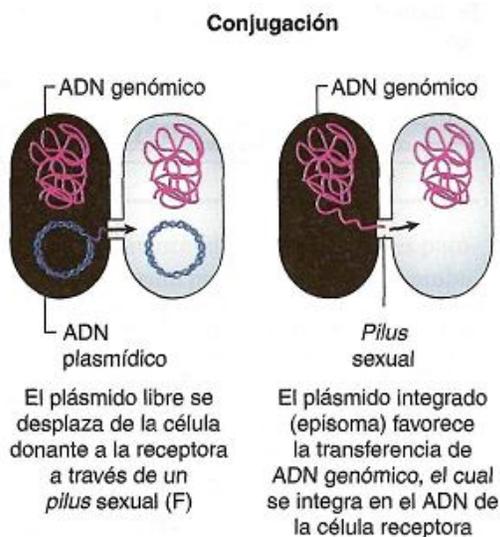


Figura N° 9: Mecanismo de conjugación en *E. coli*. ⁽²⁾

La conjugación se ha descrito en *E. coli*, *Bacteroides spp.*, *Enterococos spp.*, *Streptococos spp.*, *Streptomicetos spp.* y *clostridium spp* ⁽²⁵⁾.

Un gran número de plásmidos conjugativos de mayor tamaño codifica colicinas o resistencia a antibióticos ⁽²⁵⁾.



La conjugación es el proceso por el que el ADN pasa directamente por contacto intercelular durante el «acoplamiento» de las bacterias. La conjugación produce una transferencia unidireccional de ADN desde una célula donante hasta una célula receptora a través del llamado pilus sexual ⁽²⁵⁾.

El tipo de sexo de la célula depende de la presencia o ausencia de un plásmido conjugativo, como el plásmido F de *E. coli*. El plásmido F se define como conjugativo porque contiene todos los genes necesarios para su propia transferencia, como la capacidad de fabricar pilus sexuales e iniciar la síntesis de ADN en el llamado «origen de transferencia» (OriT) (Figura 9) ⁽²⁵⁾.

El plásmido F se transfiere a sí mismo, convirtiendo a las células receptoras en células macho F+. Cuando un fragmento de ADN cromosómico se ha incorporado a la secuencia del plásmido, se designa como «plásmido F prima» (F'). Cuando este plásmido se transfiere al interior de la célula receptora, transporta el fragmento y lo convierte en un F' ⁽²⁵⁾.

El ADN transferido por conjugación no es una molécula bicatenaria helicoidal, sino una molécula monocatenaria. La movilización comienza cuando una proteína codificada por un plásmido introduce una rotura monocatenaria en un punto específico del OriT ⁽²⁵⁾.

La «muesca» así formada inicia una replicación por círculo rodante y la cadena lineal desplazada se dirige hacia la célula receptora. A continuación, el ADN monocatenario adopta nuevamente una conformación circular y sintetiza su cadena complementaria ⁽²⁵⁾.



6.3.3 Transducción.

La transferencia genética por transducción está mediada por virus bacterianos (bacteriófagos) que captan fragmentos de ADN y los almacenan en el interior de partículas de bacteriófago. El ADN suministrado a las células infectadas es luego incorporado al genoma bacteriano (Figura 10) ⁽²⁾.

La transducción puede clasificarse como especializada si los fagos en cuestión transfieren genes específicos (habitualmente los adyacentes a sus lugares de integración en el genoma) o generalizada si la selección de las secuencias es aleatoria debido al almacenamiento accidental del ADN de la célula anfitriona en el interior de la cápside del fago ⁽²⁾.

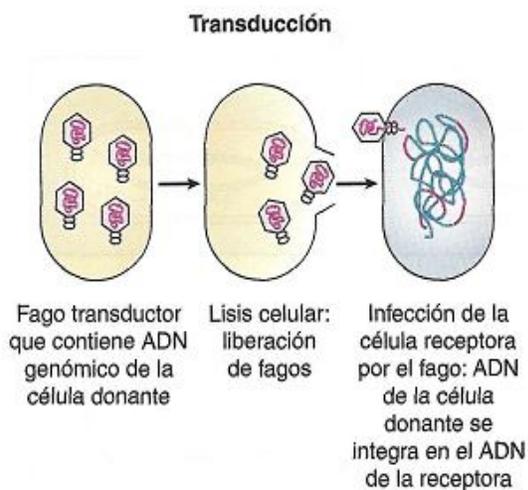


Figura N° 10: Transferencia genética por transducción. ⁽²⁾.

Las partículas de la transducción generalizada deben contener sobre todo ADN bacteriano y una cantidad pequeña o nula de ADN del fago. Por ejemplo, el fago PI de *E. coli* codifica una nucleasa que degrada el ADN cromosómico de las células anfitrionas de *E. coli* ⁽²⁾.

Un pequeño porcentaje de las partículas resultantes de fago almacenan los fragmentos de ADN en el interior de sus cápsides ⁽²⁾.

En lugar del ADN del fago, se inyecta ADN encapsulado en el interior de una nueva célula anfitriona, en la que puede recombinarse con el ADN homólogo de aquella ⁽²⁾.



6.3.4 Mutación.

Las mutaciones pueden alterar la proteína a la que el antibiótico debe unirse dando como resultado una proteína con poca o ninguna afinidad por el de drogas. Las mutaciones pueden ser paso a paso, como se ve con la penicilina, donde los altos niveles de resistencia se consiguen mediante una serie de pequeños pasos de mutaciones (Figura 11) ⁽²³⁾.

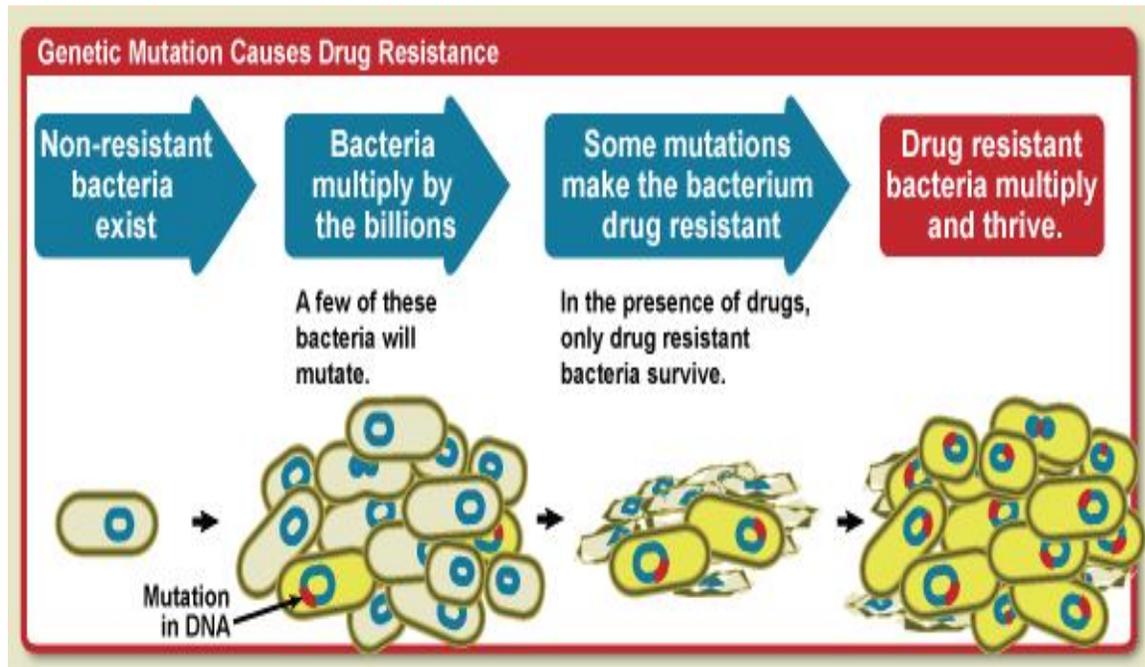


Figura Nº 11: Causas de mutación genética a muchos fármacos ⁽²³⁾.

Resistencia a varios fármacos en las bacterias es aparentemente el resultado del paso a paso de la acumulación de resistencia a los fármacos individuales. Las mutaciones también pueden ser una sola fase donde una sola mutación es suficiente para llevar a cabo la resistencia en las bacterias ⁽²³⁾.

6.4 Mecanismo de resistencia antimicrobiana en bacterias Gram-negativas.

Son cuatro los mecanismos de resistencias que presentan las bacterias Gram-negativas, que son mediadas por un plásmido móvil ⁽²⁶⁾.



6.4.1 Flujo de antibiótico fuera de la bacteria.

La bomba de eflujo juega un papel importante en la resistencia antimicrobiana y también sirve para otras funciones de la bacteria como la absorción de nutrientes esenciales y iones, excreción de metabolitos y sustancias perjudiciales, así como la comunicación entre las células y el ambiente. Este mecanismo de resistencia tiene un mayor interés porque una sola bomba de flujo produce una resistencia simultánea para una serie de antibióticos^(27, 28).

6.4.2 Permeabilidad de la membrana exterior.

La membrana exterior de las bacterias Gram-negativas es una barrera para los compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos. Al combinar una bicapa de lípido altamente hidrofóbica con una proteína formadora de poros con propiedades específicas de exclusión de tamaño, la membrana exterior actúa como una barrera selectiva⁽²⁹⁾.

La permeabilidad de esta barrera, por lo tanto, tiene un mayor efecto en la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos. Antibióticos hidrofílicos pequeños, como los β -lactámicos, usan las proteínas formadoras de poros para ganar acceso al interior de la célula, mientras que los macrólidos y otros antibióticos hidrofóbicos se difunden a través de la bicapa lipídica. La existencia de cepas resistentes a antibióticos en muchas especies bacterianas se debe a la modificación de la composición de la membrana externa⁽²⁹⁾.

6.4.3 Modificación del blanco.

Este mecanismo se basa en alteraciones de los sitios bacterianos, son los puntos de unión para los antibióticos, lo que previene la unión del antibiótico a su sitio de acción^(30, 31).



Por ejemplo la resistencia a fluoroquinolona se atribuye a las mutaciones en los blancos del fármaco (DNA girasa y topoisomerasa) ^(30, 31).

6.4.4 Modificación enzimática del antibiótico.

Las enzimas que modifican los antibióticos se dividen en dos clases generales:

- 1.) β -lactamasas que degradan los antibióticos.
- 2.) Otros (incluyendo las proteínas modificadoras de macrólidos y aminoglucósidos) que ocasionan transformaciones químicas para volver ineficiente al antibiótico ⁽³²⁾.

6.5 Antimicrobianos utilizados en la diarrea.

Los antibacterianos recomendados para viajar a un país de alto riesgo en adultos son: fluoroquinolona, como ciprofloxacina 500 mg dos veces al día, levofloxacina 500 mg/día, norfloxacina 400 mg dos veces al día, u ofloxacina dos veces al día, repetir los días dos y tres si persiste la diarrea, también se puede utilizar agente alternativo como azitromicina 500 mg el primer día, 250 mg los días dos y tres si persiste la diarrea ⁽³³⁾.

En niños se debe utilizar azitromicina 10 mg/kg el primer día, y 5 mg/kg los días dos y tres si persiste la diarrea o agente alternativo como furazolidona 7.5 mg/kg al día repartidos en cuatro dosis durante cinco días. El tratamiento antibiótico de los niños que experimentan diarrea sanguinolenta plantea preocupaciones especiales ⁽³³⁾.

Los estudios de laboratorio de las cepas de *E. coli* enterohemorrágica han demostrado que diversos antibióticos inducen replicación de la toxina de Shiga, productora de bacteriófagos lambdoides, que incrementan la producción de toxina por estas cepas ⁽³³⁾.



Diversos estudios clínicos se han inclinado a favor de estos resultados de laboratorio, y no se recomienda administrar antibióticos para tratar las infecciones producidas por *E. coli* enterohemorrágica en niños ⁽³³⁾.

6.6 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 ⁽³⁴⁾.

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 ⁽³⁴⁾.

En el borde de este halo la concentración del antibiótico, conocida también como concentración crítica se aproxima a la CIM (Concentración mínima inhibitoria) obtenida en las pruebas de dilución ⁽³⁴⁾. 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 ⁽³⁴⁾.



6.7 Factores que afectan el diámetro del halo de inhibición.

6.7.1 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 ⁽³⁴⁾.

6.7.2 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 ⁽³⁴⁾.

6.7.3 Húmedad.

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 ⁽³⁴⁾.



6.7.4 Concentración 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 ≥ 20 mm ⁽³⁵⁾.

6.7.5 Concentración 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 ⁽³⁵⁾.

6.8 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda como pruebas de tamizaje buscar la disminución de la inhibición en ATM, CTX, CAZ y CRO que permitan sospechar la presencia de BLEE en *E. coli* y *Klebsiella spp* y como método confirmatorio se emplea cefotaxima y ceftazidima con y sin ácido clavulánico, este último es un inhibidor de las BLEE ⁽³⁵⁾.

El método de Jarlier, basado en la sinergia entre los antibióticos betalactámicos (CAZ, CTX, CRO, ATM) colocados alrededor de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) (AMC), adicionalmente se ha determinado que el uso de cefalosporinas de cuarta generación como cefepime, facilita la detección de cepas BLEE con poca eficiencia hidrolítica ⁽³⁶⁾.



El método de Hodge, usado para la determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia, ha sido adaptado para identificar la presencia de β -lactamasas; dependiendo de los sustratos que se utilicen, son útiles para cualquier tipo de β -lactamasas ⁽³⁶⁾.

El método tridimensional descrito por Thomson y cols., es un bioensayo, basado en la determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia presente en microorganismos capaces de hidrolizar un determinado antibiótico ⁽³⁶⁾.



7. MATERIAL Y MÉTODO.

Tipo de estudio: Descriptivo

Población de estudio: Todas los aislados de *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas aisladas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León que provienen de un estudio de cohorte realizado en niños a nivel comunitario en León, Nicaragua en el periodo de Febrero 2010 – Enero 2011.

Muestreo: No probabilístico por conveniencia.

Descripción de la muestra: Bacterias guardadas a -30° C en caldo nutritivo al 15% de glicerina W/V, procedentes de niños del área urbana de la ciudad de León y que fueron recolectadas durante un estudio de vigilancia de diarrea.

- 77 *E. coli* diarreagénicas que corresponden a: 32 EPEC, 22 ETEC, 12 EAEC, 11 EHEC.
- 48 *E. coli* no diarreagénicas.
- Para un total de: 125 aislados.

Criterios de inclusión:

- *E. coli* previamente caracterizadas como diarreagénicas mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), como EPEC, ETEC, EAEC y EHEC.
- *E. coli* no identificadas por PCR como diarreagénicas y que proceden de pacientes tratados con antibióticos.



Procesamiento de la muestra.

Los aislados del primer rayado fueron inoculados en platos de agar MacConkey. Previamente preparados de acuerdo al lote CM0115 de la casa comercial Oxoid (ver anexo). Se tomarón de 3-8 colonias representativas para el tipo de *E. coli* que se estudió y se probó su perfil de resistencia antimicrobiano.

Realización de las pruebas de sensibilidad por el método de difusión en agar.

Se preparó agar Mueller-Hinton de acuerdo con las instrucciones del lote CM0337 de la casa comercial Oxoid® (ver anexo). Una vez aisladas las colonias de *E. coli* se procede de la siguiente manera para realizar la prueba de susceptibilidad:

- a) Seleccionar las colonias
- b) Preparar y estandarizar la suspensión del inóculo al 0.5 McFarland.
- c) Inocular en placa de agar Müller Hinton rayando en 4 direcciones con hisopo.
- d) Colocar los discos de antimicrobiano.
- e) Incubar las placas a 35 °C de 16-18 horas en aerobiosis.
- f) Medir las zonas de inhibición con regla milimetrada.
- g) Interpretar los resultados de acuerdo a las normas del Centro Nacional de Referencia y al Clinical and Laboratory Standards Institute ⁽³⁴⁾.

Cepas para control de calidad.

- *E. coli* ATCC 25922 (Ver anexo)



Sensidiscos:

-Acido nalidíxico.....	30 µg, Oxoid.
-Aztreonam	30 µg, Oxoid.
-Amoxicilina/acido clavulánico.....	30 µg, Oxoid.
-Cefotaxime	30 µg, Oxoid.
-Ceftazidime.....	30 µg, Oxoid.
-Ceftriaxona	30 µg, Oxoid.
-Cefepime.....	30 µg, Oxoid
-Ciprofloxacina	5 µg, Oxoid
-Cloranfenicol.....	30 µg, Oxoid
-Gentamicina.....	10 µg, Oxoid
-Imipenem.....	10 µg, Oxoid
-Tetraciclina.....	30 µg, Oxoid
-Trimetoprim/Sulfametoxazol.....	25 µg, Oxoid

Detección fenotípica de BLEE:

La detección de BLEE fue realizada según el método de Jarlier ⁽³⁶⁾. Los discos se colocaron a una distancia de 15-20 mm para lograr observar el efecto huevo en los casos positivos ⁽³⁶⁾. (Figura 12)

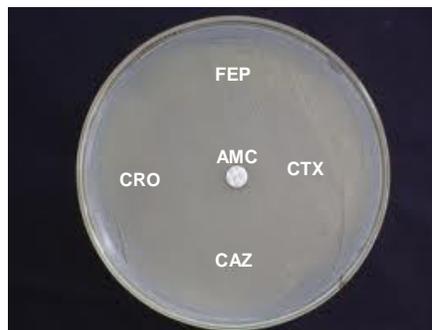


Figura 12 : Distribución de los antibióticos utilizados para la detección de BLEE. AMC: amoxicilina/ ácido clavulánico. CRO: ceftriaxone. FEP: cefepime. CAZ: ceftazidime. CTX: cefotaxime ⁽³⁶⁾.



Plan de análisis.

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa WHONET 5.6 para interpretar la sensibilidad antimicrobiana. Los resultados se presentan en tablas y gráficos construidos en SPSS 15.0 y Excel 2010.

Consideraciones éticas.

El estudio de cohorte realizado en niños a nivel comunitario fue sometido al Comité de Estudios e Investigaciones Biomédicas por parte de los autores principales. La participación en el estudio fue completamente voluntaria. A los participantes del estudio se le explicaron los objetivos del mismo, así como los posibles beneficios y consecuencias. Se mantuvo la irrestricta confidencialidad respecto a la información y se utilizó únicamente para cumplir los propósitos planteados.

El desarrollo de este programa se llevó a cabo mediante la cooperación de FOGARTI-UNC Chapell Hill (North Caroline University) y el Departamento Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León. Todos los derechos reservados para los autores principales del estudio de cohorte:

Dr. José Félix Espinoza. Ph.D

Dra. Silvia Becker.

MSc. Margarita Paniagua.

Dr. Samuel Vilchez. Ph.D

Dr. Erick Amaya. Ph.D



Tabla 1: Operacionalización de variable.

Variable	Concepto	Indicador	Valor
<i>E. coli</i> diarreagénica.	Aislados de <i>E. coli</i> que han sido previamente caracterizadas por PCR como EHEC, EAEC, ETEC y EPEC.	PCR	<ul style="list-style-type: none"> • SI • NO
<i>E. coli</i> no diarreagénica tratadas con antibióticos.	Aislados de <i>E. coli</i> que no expresaron los marcadores de patogenicidad para EHEC, EAEC, ETEC, DAEC, EPEC y EIEC.	PCR	<ul style="list-style-type: none"> • SI • NO
Sintomático.	Pacientes que presentaron diarrea.	Base de datos del estudio de cohorte.	<ul style="list-style-type: none"> • Si • No
Asintomático.	Pacientes que no presentaron diarrea.	Base de datos del estudio de cohorte.	<ul style="list-style-type: none"> • Si • No
Origen de las cepas de <i>E. coli</i> .	Procedencia de las aislado de <i>E. coli</i> de acuerdo al tipo paciente (si presentaba diarrea o no)	Base de datos del estudio de cohorte.	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomático • Asintomático
Resistencia antimicrobiana	Condición que presenta un microorganismo de tolerar fármacos antimicrobianos a ciertas concentraciones	Método de Kirby-Bauer	<ul style="list-style-type: none"> • Resistente • Sensible
Multirresistencia.	Resistencia antimicrobiana a 3 o más antibióticos de diferente familia.	Método de Kirby-Bauer	<ul style="list-style-type: none"> • SI • NO



Perfil de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* diarreagénicas y no diarreagénicas aisladas en niños a nivel comunitario en León, Nicaragua”.



Betalactamasas de espectro extendido. (BLEE)	Enzima que cataliza la hidrólisis del anillo betalactámico de algunas penicilinas y cefalosporinas	Método de Jarlier ⁽³⁶⁾ .	<ul style="list-style-type: none">• Positivo• Negativo
--	--	-------------------------------------	---



8. RESULTADOS

De forma general se encontró que la mayoría de los aislados de *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas fueron resistentes a tetraciclina y trimetoprim/ sulfametoxazole en un 64.8 % y 49.6 % respectivamente. Con respecto a los otros antibióticos estudiados, los niveles de resistencia antimicrobiana fueron menores del 27% (Figura 13).

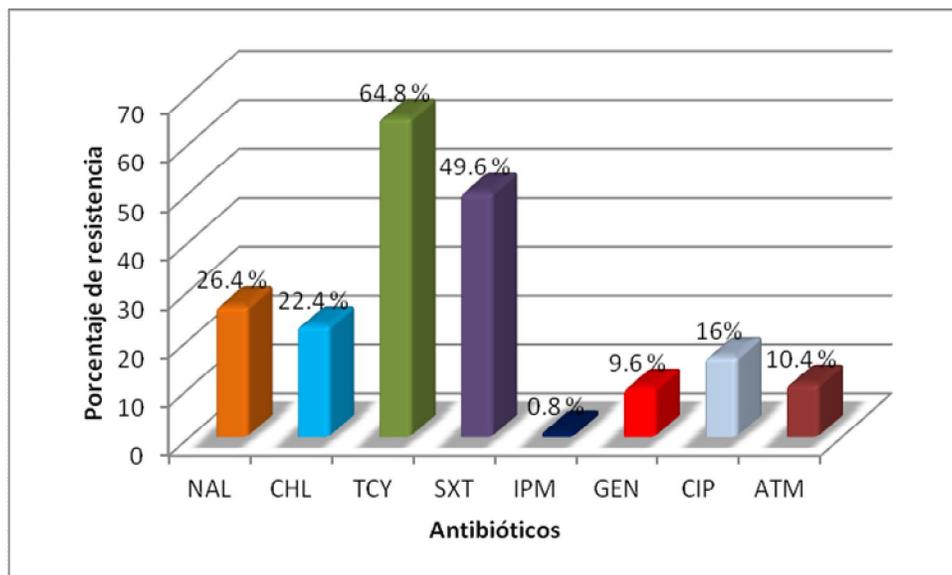


Figura 13: Perfil de resistencia antimicrobiana en *E. coli* diarreagénica y no diarreagénica. NAL: Ácido Nalidíxico; CHL: Cloranfenicol; TCY: Tetraciclina; SXT: Trimetoprim/sulfametoxazol; IPM: Imipenem; GEN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina; ATM: Aztreonam.

Al comparar los niveles de resistencia entre los grupos de *E. coli* no diarreagénicas y diarreagénicas se observó que éstas últimas mostraron altos niveles de resistencia a los antibióticos: ácido nalidíxico, cloranfenicol, aztreonam e imipenem. Mientras que las no diarreagénicas mostraron mayores niveles de resistencia a: trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacina. Es interesante resaltar que ambos grupos mostraron niveles similares de resistencia a tetraciclina (Figura 14).

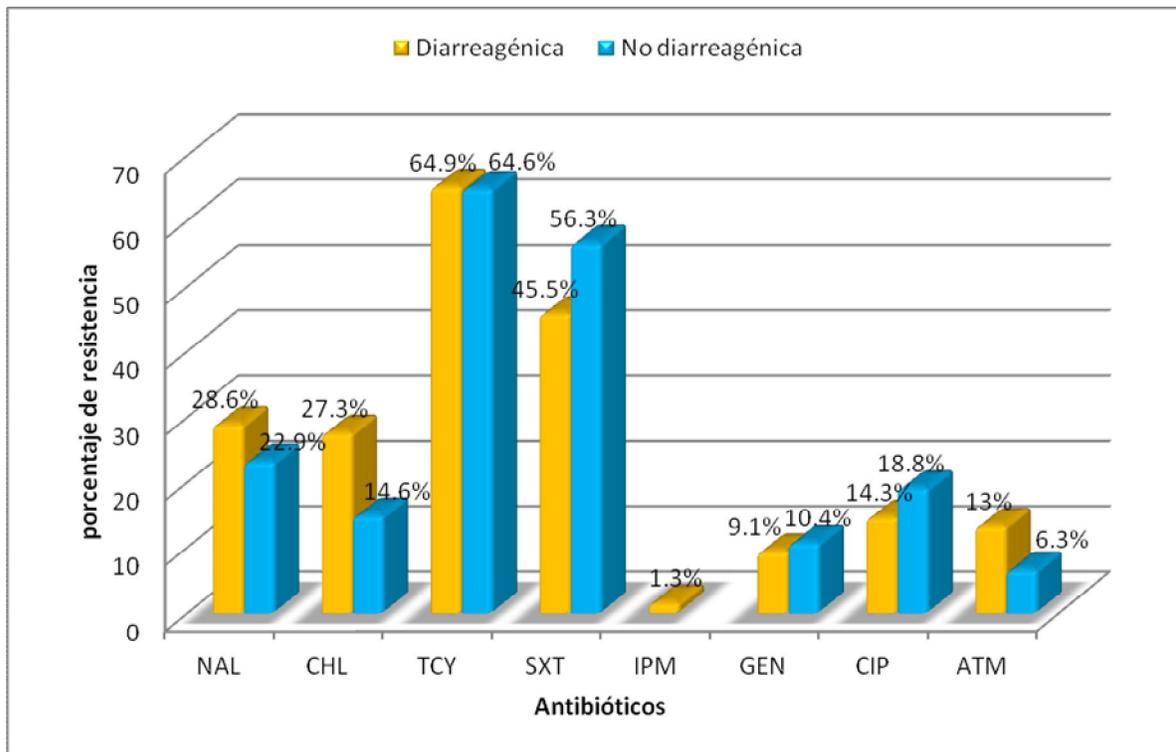


Figura 14: Perfil de resistencia antimicrobiana en *E. coli* diarreagénica vs no diarreagénica. .
NAL: Ácido Nalidíxico; CHL: Cloranfenicol; TCY: Tetraciclina; SXT: Trimetoprim/sulfametoxazol;
IPM: Imipenem; GEN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina; ATM: Aztreonam.

Los niveles de resistencia fueron diferentes para cada patotipo de *E. coli*; por ejemplo: Se observó que las EHEC mostraron mayores niveles de resistencia a ciprofloxacina (81.8%, $P < 0.05$) en comparación a los demás patotipos. Lo mismo se observa en el patotipo de EAEC, las cuales mostraron mayores niveles de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (25%, $P < 0.05$) (Tabla 2).



Tabla 2: Perfil de resistencia antimicrobiana en los diferentes patotipos de *E. coli* diarreagénica.

Perfil de resistencia. [n (%)]								
Organismos (n)	ATM	CHL	CIP	GEN	IPM	NAL	TCY	SXT
EAEC (12)	4(33.3)	1(8.3)	7(58.3)	2(16.7)	-	1(8.3)	1(8.3)	3(25)
EHEC (11)	5(45.5)	3(27.3)	9(81.8)	9(81.8)	-	1(9.1)	5(45.5)	1(9.1)
EPEC (32)	9(28.1)	9(28.1)	22(68.8)	14(43.8)	1(3.1)	4(12.5)	4(12.5)	1(3.1)
ETEC (22)	4(18.2)	8(36.4)	12(54.5)	10(45.5)	-	1(4.5)	1(4.5)	5(22.7)
<i>P</i> value	0.10	0.38	0.01	0.80	0.70	0.42	0.42	0.02

ATM: aztreonam, CHL: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, IPM: imipenem, NAL, ácido nalidíxico, TCY: tetraciclina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol ■:Significancia estadística.

Al comparar los niveles de resistencia en aislados de *E. coli* provenientes de pacientes sintomáticos y asintomáticos, se encontró diferencia significativa en el trimetoprim/sulfametoxazol, mostrándose un mayor nivel de resistencia en las EHEC provenientes de pacientes sintomáticos (81.8%), en comparación a los otros tipos de *E. coli*. (Tabla 3)

Tabla 3. Perfil de resistencia antimicrobiana de acuerdo al origen de los aislados de *E. coli*.

Antibióticos	Perfil de resistencia vs origen de los aislados de <i>E. coli</i> . n(%)									
	Sintomático					Asintomático				
	EAEC (9)	EHEC (11)	EPEC (21)	ETEC (17)	ND (42)	EAEC (3)	EPEC (11)	ETEC (5)	ND (6)	
NAL	4(44.4)	5(45.5)	5(23.8)	4(23.5)	11(26.2)	-	4(36.4)	-	-	0.28
CHL	1(11.1)	3(27.3)	6(28.6)	6(35.3)	7(16.7)	-	3(27.3)	2(40)	-	0.56
TCY	4(44.4)	9(81.8)	16(76.2)	10(58.8)	29(69)	3(100)	6(54.5)	2(40)	2(33.3)	0.28
SXT	2(22.2)	9(81.8)	11(52.4)	9(52.9)	26(61.9)	-	3(27.3)	1(20)	1(16.7)	0.02
IPM	-	-	1(4.8)	-	-	-	-	-	-	0.84
GEN	1(11.1)	1(9.1)	3(14.3)	1(5.9)	5(11.9)	-	1(9.1)	-	-	0.98
CIP	1(11.1)	5(45.5)	3(14.3)	1(5.9)	9(21.4)	-	1(9.1)	-	-	0.09
ATM	3(33.3)	1(9.1)	1(4.8)	3(17.6)	3(7.1)	-	-	2(40)	-	0.11

ATM: aztreonam, CHL: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, IPM: imipenem, NAL, ácido nalidíxico, TCY: tetraciclina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol ■:Significancia estadística



En general el nivel de multiresistencia, fue del 30.4%, del cual el 86.8% se observó en pacientes sintomáticos y 13.2% en asintomáticos. Los patotipos que presentaron mayores niveles de multiresistencia fueron EHEC (45.5%) y ETEC (40.9%), las primeras todas provenientes de niños sintomáticos y las últimas el 77.8% proviene de pacientes sintomáticos. Las no diarreagénicas presentaron un 27.1% de multiresistencia, todas provenientes de pacientes sintomáticos (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil de multiresistencia antimicrobiana en *E. coli*.

Organismos (n)	Perfil de multiresistencia . [n(%)]		
	MDR	S	A
AT (125)	38(30.4%)	33(86.8%)	5(13.2%)
EAEC (12)	2(16.7%)	2(100%)	-
EHEC (11)	5(45.5%)	5(100%)	-
EPEC (32)	9(28.1%)	6(66.7%)	3(33.3%)
ETEC (22)	9(40.9%)	7(77.8%)	2(22.2%)
ND (48)	13(27.1%)	13(100%)	-

AT: Aislados totales; MDR: aislados multiresistentes; S: aislados provenientes de niños sintomáticos; A: aislados provenientes de niños asintomáticos; ND: no diarreagénicas

De los 125 aislados de *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas no se encontraron aislados productores de BLEE.



9. DISCUSIÓN.

La resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas humanas es un problema global de salud pública ⁽³⁷⁾. Los problemas de resistencia antimicrobiana requieren una adecuada intervención con una especial atención a los patógenos Gram-negativos multiresistentes ⁽³⁸⁾.

El índice de resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de la diarrea está aumentando en Latinoamérica. La resistencia a los antibióticos se observa tanto en aislados de *E. coli* diarreagénicas como no diarreagénicas ⁽³⁹⁾.

Los altos niveles de resistencia de las *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas a los agentes antimicrobianos como tetraciclina (64.8%) y trimetoprim/sulfametoxazol (49.6%) observada en este estudio probablemente se asocie al uso y abuso de antimicrobianos tanto en los hospitales y en la comunidad ⁽³⁷⁾. Según el estudio de “Enfermedades infecciosas y el uso de antibióticos en el área de emergencia del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales (HEODRA)”, realizado por C. den Engelsen y cols., muestra que el uso de agentes antimicrobianos no es óptimo, porque se prescriben con demasiada frecuencia y no cumplen con las guías locales de tratamiento. Por ejemplo: 15 de los 70 pacientes que presentaban diarrea, recibieron tratamiento con antibióticos; sin embargo, los autores del estudio indican que únicamente un pequeño porcentaje de los pacientes tenía leucocitos en las heces teñidas con tinción de Wright ⁽³⁷⁾.

Similares a las bacterias patógenas, las comensales son expuestas a la presión selectiva de los agentes antimicrobianos, por lo cual éstas han sido a menudo utilizadas como un indicador de la dispersión de genes de resistencia a bacterias patogénicas ⁽⁴⁰⁾.



Es importante indicar que los aislados de *E. coli* no diarreagénicas presentaron altos niveles de resistencia a tetraciclina (64.6%) y a trimetoprim/sulfametoxazol (56.3%), resultados que difieren del estudio realizado por Bartoloni y cols., en niños de Perú y Bolivia, donde se encontraron altos niveles de resistencia a tetraciclina (93%) y trimetoprim/sulfametoxazol (94%) ⁽⁴⁰⁾.

El presente estudio muestra que el grupo de EAEC mostró niveles de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (25%, $p < 0.05$) mayores en comparación a los demás grupos de *E. coli* diarreagénica (Tabla 2). Estos resultados se asemejan con el estudio realizado por Estrada y cols., sobre resistencia antimicrobiana de *E. coli* diarreagénica, en dicho estudio el patotipo con mayores niveles resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (88%) fue EAEC, cuando se comparó con los otros grupos de *E. coli* ⁽⁴⁴⁾.

En otros estudios también se puede encontrar que las EAEC presentan mayores niveles de resistencia al compararlo con los demás grupos de *E. coli*. Por ejemplo: en un estudio sobre resistencia antibacteriana en *E. coli* diarreagénica en Perú, realizado por Ochoa y cols., muestra que los niveles de resistencia en el grupo EAEC a trimetoprim/sulfametoxazol, fueron mucho mayor al compararlos con los grupos de ETEC y EPEC ⁽⁴⁵⁾.

Los autores suponen que los altos niveles de resistencia de EAEC comparados con los otros grupos, puede deberse al uso frecuente de antibióticos en las diarreas causadas por EAEC, ya que estos patotipos diarreagénicos usualmente causan diarrea persistente y están presentes en portadores asintomáticos ⁽⁴⁵⁾.



Los resultados de Vila y cols., en su estudio sobre patrones de sensibilidad en EAEC asociada a la diarrea del viajero, reportan que los aislados de EAEC presentaron bajos niveles de resistencia a ciprofloxacina (2%) y ácido nalidíxico (6%)⁽⁴¹⁾, mientras que los aislados de EAEC procesados en este estudio mostraron niveles de resistencia a ciprofloxacina hasta de 58.3% y niveles similares de resistencia al ácido nalidíxico (8.3%) .

En general, los aislados de *E. coli* provenientes de pacientes sintomáticos reflejaron mayores niveles de resistencia que los aislados de pacientes asintomáticos. Por ejemplo: las *E. coli* no diarreagénicas provenientes de pacientes sintomáticos presenta un 61.9% ($p<0.05$) de resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol, mientras que *E. coli* no diarreagénicas provenientes de pacientes asintomáticos presentan un 16.7% ($p<0.05$) de resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol. Estos resultados son similares al estudio de Amaya y cols., al encontrar 63.3 y 45.6% de resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol en las *E. coli* no diarreagénicas provenientes de pacientes sintomáticos y asintomáticos respectivamente ⁽⁸⁾.

En un estudio realizado por Bangar y cols., en la India, se reporta que el 75% del patotipo EAEC era multiresistente. Sin embargo, el patotipo EAEC del presente estudio sólo presenta un 16.7% de multiresistencia ⁽⁴³⁾.

La resistencia mediada por BLEE ha incrementado su presencia en el medio extrahospitalario, y con frecuencia se aíslan cepas resistentes colonizando o infectando a individuos procedentes de la comunidad o atendidos en instituciones sanitarias y centros de cuidados crónicos⁽⁴²⁾. Amaya y cols., en su estudio sobre patrones de resistencia en *E. coli*, encontraron 13 aislados de *E. coli* productoras de BLEE. Pero en el presente estudio no se observó ningún aislado productor de BLEE, probablemente porque se procesaron menos muestras que en el estudio de Amaya y cols. ⁽⁸⁾



10. CONCLUSIÓN.

En el presente estudio se encontró que los grupos de *E. coli* diarreagénicas y no diarreagénicas aisladas en niños a nivel comunitario en León, Nicaragua poseen altos niveles de resistencia a los antibióticos tetraciclina (64.8%) y trimetoprim/sulfametoxazol (49.6%). Sin embargo, los hallazgos demuestran que los niveles de resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* de este estudio son bajos en comparación con estudios realizados en otros países en vías de desarrollo.



11. RECOMENDACIONES.

- Vigilar la resistencia antimicrobiana en *E. coli* para actualizar los datos epidemiológicos.
- Aumentar el número de aislados para comparar los niveles de resistencia y la detección de BLEE en pacientes de la comunidad e intrahospitalarios.



12. BIBLIOGRAFÍA

1. You D, Wardlaw T, Salama P, Janes G. Levels and trends in under-5 mortality. *The Lancet*. 2010; 375 (9709): 100-103.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfauser MA. *Microbiología médica*. 5ª Ed. España: Elsevier; 2007. p. 328.
3. Lara ME, Perfil de resistencia a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. [Tesis de Pediatría]. UNAN-León; 2003.
4. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(11): 142-201.
5. Lopez O, León J, Jiménez M, Chaidez C. Detección y Resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella*. *Fitotecnia Mexicana*. 2009; 32(2): 119-126.
6. Hannaoui, E. Identificación por PCR y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas, aisladas de niños con diarrea aguda en Cumaná. *Biol Aplic*. 2009: 109.
7. Paniagua G. Fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas detectadas en infantes mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex. *Revista médica del hospital general de México*. 2007; 70(4): 158 – 167.
8. Amaya E, Reyes D, Vilchez S, Paniagua M, Möllby R, Nord CE, et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. *J Med Microbiol*. 2010; 60 (2): 216-222.
9. Bizzarro MJ, Gallagher PG. Antibiotic-resistant organisms in the neonatal intensive care unit. *Semin Perinatol*. 2007; 31(1): 26-32.
10. World Health Organization. *The Treatment of Diarrhoea: A Manual for Physicians and Other Senior Health Workers* (4th revision): Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2005.



11. Mims CA, Playfair HL, Roitt IM. Microbiología Médica. Gran Bretaña, 2^a ed, Mosby/Doyma; 1995.p. 254-257
12. O’Ryan M, Prado V, Pickering LK. A Millennium Update on Pediatric Diarrheal Illness in the Developing World. Elsevier. 2005; 16(2): 125-136.
13. Ryan K, Ray G. Sherris microbiología médica. 4^a ed. United States of America: McGraw-Hill; 2004. p. 343.
14. Moon HW. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect Immun. 1983; 41(11): 1340–1351.
15. Hitotsubashi S, Fujii Y, Yamanaka H, Okamoto K. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. Infect Immun. 1992; 60 (11): 4468–4474.
16. Kehl S, Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections, J Clin Microbiol. 2002; 40(8): 2711-2715.
17. Small P, Falkow S. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. Infect Immun. 1988; 56(15), 225–229.
18. Yamamoto T. Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. Infect Immun. 1994; 62(7): 2917–2929.
19. Plunkett G, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. J of Bacteriol. 1999; 181(6):1767–1778.
20. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Well JG. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype, N Engl J Med. 1983; 308 (12): 681–685.
21. Sandkvist M, Michel LO, Hough LP, Morales VM, Bagdasarian M, Koomey M, et al. General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*, J Bacteriol. 1997; 179 (22): 6994–7003.



22. Lodinova-Zadnikova, R., H. Tlaskalova-Hogenova, and U. Sonnenborn. 1992. Local and serum antibody response in full-term and premature infants after artificial colonization of the intestine with the *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor). *Pediatr. Allergy Immunol.* 3:43–48.
23. Rao S. Bacterial genetics. *Depart of Microbiol.* 2006; 15(11): 2-13.
24. Snyder L, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria.* 2^a ed. Washington D. C: ASM Press; 2003.p. 340-360.
25. Bustos ME, Troncoso HM, Toledo B S, Figueroa GG. Transferencia plasmidial de Multiresistencia en Cepas Enteropatógenas de *Escherichia coli*. *Pediatrics.* 1986; 56(6): 445-449.
26. Li X, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 69(12): 159-204.
27. Pages JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pumps of Gram-negative bacteria. Elsevier. 2009; 1794(5): 826-833.
28. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negatives bacteria. *Clin Microbiol.* 2004; 10(1): 12-26.
29. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Elsevier. 2009; 1794 (5): 808-816.
30. Rahal JJ. Antimicrobial resistance among and therapeutic options against Gram-negatives pathogens. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(1): 4-10.
31. Torres JA, Villegas NV, Quinn JP. Current Concepts in antibiotic-resistance Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5(3): 833-843.
32. Alekshun, M, Stuart BL. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Elsevier. 2007; 128 (6): 1037-105.
33. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Longo DL, Jameson JL, et al., *Principios de Medicina interna de Harrison.* 16^a ed. México: McGraw-Hill; 2009.p. 4334-4335.



34. López S, Manual de Procedimiento de Bacteriología Médica. litografía nicaragüense. 2004; 1: 273-301.
35. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de beta-lactamasas plasmídicas de espectro extendido, Enfermedad infecc. 2003; 13(3): 125.
36. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents. Rev Infect Dis. 1998; 10(4): 867-878.
37. Den Engelsen C, van der Werf C, Matute A.J, Delgado E, et al. Infectious diseases and the use of antibiotics in outpatients at the emergency department of the University Hospital of León, Nicaragua. Int J Infect Dis. 2008
38. Gould IM. Antibiotic resistance: the perfect storm. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(3): 2-5.
39. Mayatepek E, Seebass E, Hingst V, Kroeger A, Sonntag H. Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with and without diarrhoea in Esteli, Nicaragua. J Diarrhoeal Dis Res. 1993; 11: 169-171.
40. Bartoloni A, Pallecchi L, Benedetti M, Fernandez C, Vallejos Y, Guzman E, et al. Multidrug-resistant Commensal *Escherichia coli* in Children, Peru and Bolivia. Emerg Infect Dis. 2006; 12(6): 907-913.
41. Vila J, Vargas M, Ruiz J, Espasa M, Pujol M, Corachán M, et al. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. J. Med. Microbiol. 2001; 50: 996-1000.
42. García A.M, García E, Hernández A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero JA Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter. 2011; 24(2):57-66.



43. Raju B, Ballal M. Multidrug resistant enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhoea in rural southern Indian population. *Scand J. of Infect. Dis.* 2009; 41: 105-108.
44. Estrada T, Cerna J. F. Paheco L., Velázquez R. F, Ochoa T. J. et al. Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2005. 11, 1306–1308.
45. Ochoa T. J, Ruiz J, Molina M, Del Valle L. J. et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheogenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2009. 81, 296–301.



13. ANEXOS

Agar MacConkey

OXOID CM0115 No 3.

Añadir 51.5 gr en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar Mueller Hinton

OXOID CM0337, Lote No 992953.

Añadir 38 gr en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Preceptrol®

Culture

ATCC® Number:25922™

Organism:	<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers
Designations:	FDA strain Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210]
Isolation:	clinical isolate
Depositor:	FDA
History:	ATCC -FDA- F. Schoenknecht
Biosafety Level:	1
Shipped:	freeze-dried
Growth Conditions:	ATCC medium18: Trypticase soy agar
Temperature:	37.0°C