

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



TESIS

Para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Caracterización fenotípica y genotípica de *Enterobacterias* productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, entre los meses de Marzo-Abril del año 2013.

Autores:

Br. Pedro José Chévez Barrera

Br. Luis Adán Mairena Alvarado

Tutor:

Dr. Erick Amaya Mayorga. PhD.

Profesor Titular, Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Ciencias Médicas.

UNAN-León.

León, 2 de Marzo del 2015

“A la libertad por la Universidad”

DEDICATORIA

Br. Pedro José Chévez Barrera:

Dedico este trabajo a mis padres Juan Chévez y Ana Barrera, quienes siempre fueron los pilares de apoyo incondicional para lograr mis metas. A mis hermanas y amigos que de una u otra forma tuvieron un papel en el transcurso de mi carrera.

Br. Luis Adán Mairena Alvarado:

Dedico este trabajo a Dios primeramente por darme las fuerzas para poder realizarlo, a mi familia especialmente a mis padres Carlos Adán Mairena Rayo y Marisol del Socorro Alvarado Laguna por su apoyo incondicional en lo económico y emocional a lo largo de toda mi vida, a mis hermanos menores Jorge Eduardo Mairena Alvarado y Margarita Belén Mairena Alvarado por ser motivo de superación para salir adelante, al amor de mi vida, novia y futura esposa María Yulieth Sarria Vargas por su apoyo y consejos a lo largo de toda mi carrera y por ultimo a mis amigos.

AGRADACIMIENTOS

Agradecemos a Dios infinitamente por estar a nuestro lado en los buenos y malos momentos y por darnos salud, inteligencia, sabiduría y paciencia para poder elaborar este trabajo y permitirnos cumplir todas nuestras metas. Y a nuestras familias por su invaluable apoyo incondicional.

A nuestro tutor el Dr. Erick Amaya por su apoyo, colaboración y disponibilidad en la realización de este trabajo. Al MSc. Martin DeBrawuere por apoyarnos con los materiales necesarios para realizar este estudio, a la MSc. Claudia Pérez por sus instrucciones brindadas en los procedimientos de laboratorio y apoyo en el procesamiento de muestras, a Don Edwin por apoyarnos e instruirnos en la preparación de los diferentes medios de cultivos que utilizamos, así como a las personas que de alguna forma participaron de manera directa o indirecta en la elaboración de este trabajo.

RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son la segunda causa de infecciones en la comunidad, cerca de 150 millones de personas alrededor del mundo, en su mayoría mujeres son diagnosticadas con ITU cada año, siendo *Escherichia coli* la *Enterobacteria* aislada con mayor frecuencia, la cual ha demostrado un aumento en la resistencia a los antimicrobianos utilizados habitualmente. Por lo antes descrito, se realizó un estudio descriptivo de corte transversal para determinar el perfil fenotípico y genotípico de resistencia en *Enterobacterias* aisladas a partir de urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, entre los meses de Marzo-Abril del año 2013. Para el aislamiento, la identificación bacteriana y caracterización fenotípica de BLEE, se empleó la metodología convencional siguiendo las recomendaciones del CLSI y CNDR/MINSA, y referente a la caracterización genotípica se realizó un PCR multiplex a las *Enterobacterias* positivas para BLEE. Se obtuvieron un total de 51 urocultivos positivos siendo *E. coli* (80%) la bacteria que se aisló con mayor frecuencia, seguido de *Proteus sp.* (14%), *Enterobacter sp.* (4%) y *Klebsiella sp.* (2%). En el tamizaje para la detección de betalactamasa se encontró que el 39% (20/51) fueron productoras de BLEE, de estos aislados el 95% (19/20) eran *E. coli* y el 5% (1/20) correspondió a *Klebsiella sp.* Referente a la expresión de genes que codifican para betalactamasas se detectó en el 100% de los aislados positivos para BLEE, encontrando que el 100% (n=20) codificaban para la enzima tipo CTX-M, el 75% (15/20) para la enzima tipo OXA, el 65% (13/20) para TEM y el 5% (1/20) para SHV. Además se encontró que todos estos aislados productores de BLEE transportaban más de un gen *bla*, el 40% (8/20) de estos presentaban genes *bla*CTX-M/OXA/TEM, el 25% (5/20) presentaban genes *bla*CTX-M/TEM, el 30% (6/20) presentaban genes *bla*CTX-M/OXA, y un 5% (1/20) presentaron genes *bla*CTX-M/OXA/SHV. Por último, para CTX-M se encontró que CTX-M-1 fue el grupo principal y CTX-M-15 el gen específico que codificó para esta Betalactamasa presente en todos los aislados. Para SHV, se identificó el gen SHV-11, para OXA se encontró el gen OXA-1 y para TEM su gen específico fue TEM-1.

Palabras claves: Infección del tracto urinario (ITU), *Enterobacterias*, *Escherichia coli*, resistencia bacteriana, betalactamasa de espectro extendido (BLEE), genes *bla*_{BLEE}.

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
RESUMEN.....	III
INDICE.....	IV
GLOSARIO.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	6
4. PROBLEMA.....	7
5. OBJETIVOS.....	8
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
6. MARCO TEÓRICO.....	9
6.1 ETIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO.....	9
6.2 ENTEROBACTERIAS.....	9
6.3 PRINCIPIOS GENERALES DE LA ANTIBIÓTICOTERAPIA.....	10
6.4 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS.....	11
6.5 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE RESISTENCIA.....	14
6.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	15
6.7 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS.....	18
6.8 ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE CAUSANTES DE ITU.....	23
6.9 EPIDEMIOLOGIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE Y GENES DE RESISTENCIA.....	23
6.10 TRATAMIENTO A ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS QUE CAUSAN ITU.....	26
6.11 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR.....	29
6.12 FACTORES QUE AFECTAN EL DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN.....	30
6.13 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (SIGLAS EN INGLÉS PCR).....	31
6.14 DETECCIÓN DE LOS GENES <i>BLATEM</i> , <i>BLASHV</i> , <i>BLACTX-M</i> Y <i>BLAOXA</i> POR LA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX.....	32
7. DISEÑO METODOLOGICO.....	34
7.1 TIPO Y ÁREA DE ESTUDIO.....	34
7.2 PERIODO Y MUESTREO DE ESTUDIO.....	34
7.3 PROCEDIMIENTOS.....	34
7.3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.....	34
7.3.2 CARACTERIZACION FENOTIPICA DE BLEE Y DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS.....	34

7.3.3.	CARACTERIZACIÓN DE GENES CODIFICADORES DE BLEE.....	35
7.4.	ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO	39
7.5.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	39
8.	RESULTADOS	41
8.1	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.....	41
8.2	DETECCIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS BLEE.....	42
8.3	IDENTIFICACIÓN DE GENES <i>BLASHV</i> , <i>BLATEM</i> , <i>BLACTX-M</i> Y <i>BLAOXA</i>	42
9.	DISCUSIÓN	44
10.	CONCLUSIONES	48
11.	RECOMENDACIONES.....	49
12.	REFERENCIAS.....	50
13.	ANEXO	58

GLOSARIO

Abreviatura	Descripción
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
<i>bla</i>	Betalactamasa
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
BLEA	Betalactamasa de Espectro Amplio
BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido
CLSI	Instituto Clínico de Estándares de Laboratorio
CNDR	Centro Nacional de diagnóstico y referencia Nicaragüense
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EMB	Eosina Azul de Metileno
HEODRA	Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales
IRC	Insuficiencia renal crónica
LIA	Lisina Hierro Agar
ITU	Infecciones del Tracto Urinario
KPC	Klebsiella Pneumoniae Carbapenemasas
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MINSA	Ministerio de Salud
PBPs	Proteínas de Anclaje de Penicilinas
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PhP	SistemaPenePlate
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAPD-PCR	Amplificación aleatoria de AND polimórfico
SIM	Sulfuro Indol Motilidad
SMART	Análisis de Seguimiento de Tendencias de Resistencia a los antimicrobianos
TSI	Hierro Triple Azúcar
UCIN	Unidad de Cuidado Intensivo Neonatal
UFCs	Unidad formadora de colonias
ULG	Universidad de Liegé

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son la segunda causa de infecciones en la comunidad, cerca de 150 millones de personas alrededor del mundo son diagnosticadas con ITU cada año.^(1, 2)

La etiología de estas infecciones es variable y usualmente, dependen del tiempo, área geográfica, edad y género del paciente. No obstante entre las bacterias asociadas a esta patología se encuentran, la *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* que en conjunto representan el 70% de los casos.⁽³⁾

La identificación de la primera bacteria resistente a los betalactámicos fue en 1940⁽⁵⁾. El problema de los microorganismos resistentes ha venido en aumento desde esa fecha, principalmente en las últimas dos décadas, sobre todo en bacterias Gram-negativas asociadas a infecciones del tracto urinario.⁽⁶⁾

Entre los fármacos que usualmente se prescriben, para el tratamiento de ITU, basados en las recomendaciones del MINSA son: Cotrimoxazole, amoxicilina, ampicilina, aminoglucósidos, cefalosporinas, ácido nalidíxico y nitrofurantoína.⁽⁴⁾ Sin embargo, muchos reportes tanto a nivel mundial como local indican la presencia de multirresistencia a estos antibióticos en bacterias asociados a ITU.^(1,2)

El principal mecanismo de resistencia a las cefalosporinas que presenta la familia *Enterobacteriaceae* se debe a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE); Estas pertenecen a las enzimas A de la clasificación de Ambler; muchas de estas enzimas resultan de las variantes de betalactamasas de amplio espectro (BLEA) con los genes 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.⁽⁷⁾ No obstante, las betalactamasas de las familias con genes TEM, SHV, CTX-M y

OXA 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 betalactamasas.⁽⁸⁾

Dado el incremento de bacterias resistente a los antibióticos en la actualidad, en este estudio se pretendió determinar la producción fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) a través del método de Kirby Bauer y la presencia de genes específicos que codifican para este tipo de betalactamasas mediante PCR multiplex a *Enterobacterias* productoras de BLEE (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M y *bla*OXA) aisladas en urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León.

2. ANTECEDENTES

Las *Enterobacterias* productoras de BLEE son actualmente un problema de salud pública a nivel mundial principalmente en pacientes hospitalizados y de la comunidad, siendo reportadas por primera vez en Francia en el año 1940 por Abraham EP y cols., y luego fueron identificadas en Alemania en 1980.⁽⁵⁾ Por su rápido esparcimiento alrededor del mundo se han realizado estudios en donde han habido reportes sobre la prevalencia de estas bacterias productoras de BLEE en diferentes países como: Estados Unidos cuyo porcentaje de bacterias productoras de BLEE fue: *K. pneumoniae* 7.6%, *E. coli* 3.3% y *P. mirabilis* 4.9%; en Europa: *K. pneumoniae* 22.6%, *E. coli* 5.3% y *P. mirabilis* 11.1% según reportes hechos por Winokurt PL y cols., en el año 2001.⁽⁹⁾ En el pacífico de Asia Bell JM y cols., en el año 2002 reportaron para *K. pneumoniae* 25.2%, *E. coli* 10.1% y *P. mirabilis* 1.4%,⁽¹¹⁾ en Latinoamérica, Sader HS y cols., en el mismo año reportaron a *K. pneumoniae* (47.3%) y *E. coli* (6.7%) como las principales *Enterobacterias* productoras de BLEE.⁽¹⁰⁾

Salas R. y cols., en un estudio realizado para evaluar la resistencia bacteriana a los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las ITU en el área de salud de Palmares, Costa Rica en el año 2004, demostraron que el agente etiológico más común fue la *E. coli* (74%), presentando resistencia a Nitrofurantoína (74%), Amoxicilina (45%), Trimetoprim-Sulfametoxazole (43%).⁽¹²⁾

En Nicaragua, existe poca información referente a la prevalencia de bacterias Gram-negativas multirresistentes y productoras de BLEE. 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.⁽¹⁶⁾ Entre las publicaciones que abordan este problema en Nicaragua, Amaya y cols., en el año 2004 realizaron un estudio sobre la resistencia antimicrobiana en bacterias Gram-negativas 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, donde se encontró que la mayoría de estos patógenos fueron altamente resistentes y con una alta prevalencia de producción de genes de resistencias TEM, SHV y CTX-M. Además, se encontraron clones similares de *K. pneumoniae* multirresistentes

y productores de BLEE tanto en muestras de neonatos y del ambiente hospitalario.⁽¹³⁾ Otro ejemplo es el realizado por Matute y cols., en el año 2004 sobre resistencia antimicrobiana en uropatógenos, indican que *E. coli* (56%), *Klebsiella spp.* (18%), *Enterobacter spp.* (11%), *Proteus spp.* (3%) fueron las *Enterobacterias* más aisladas; siendo *E. coli* resistente a amoxicilina (74%), trimetoprim-sulfametoxazole (63%), ciprofloxacina (29%), gentamicina (11%) y amoxicilina-ácido clavulánico (34%) .⁽¹⁴⁾

En otro estudio realizado en el año 2010 Bours y col., analizaron el perfil de resistencia de uropatógenos en Latinoamérica, mostrando resultados con porcentajes altos de resistencia ante antibióticos comúnmente utilizados; por ejemplo, en *E. coli* se encontró una 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%), cabe destacar que en este trabajo no se realizó la caracterización molecular.⁽¹⁵⁾

Pérez C. y cols., en el año 2010 realizaron un estudio para la detección de la frecuencia de genes de resistencia en bacterias gram-negativas productoras de BLEE, en muestras de pacientes ambulatorios atendidos en el laboratorio de bacteriología del hospital regional La Asunción de Juigalpa y laboratorio de microbiología y parasitología UNAN-León; donde analizaron 110 aislados de *Enterobacterias*, siendo la más frecuente en ambos laboratorios la *E. coli*, que representó un 85.45% (94/110) del total de bacterias testadas en este estudio. Referente al perfil fenotípico de resistencia se encontró que el 27% (30/110) de las bacterias estudiadas fueron productoras de betalactamasas, de estos aislados el 90.9% (27/30) eran *E. coli*. El perfil de resistencia de las *E. coli* productoras de BLEE mostraron 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 en este trabajo la resistencia a cefoxitina 30%(9/30) fue un indicativo de producción de betalactamasas tipo AmpC de acuerdo a la norma indicada por CLSI. Referente a la caracterización molecular, encontraron la presencia de los genes *bla*TEM (1/30), *bla*CTX-M (11/30) y de *bla*TEM/*bla*CTX-M (10/30).⁽¹⁶⁾

En un estudio reciente, realizado por Gonzales M. y cols., en el año 2012. Se analizaron 50 muestras de urocultivos de pacientes ambulatorios, de las cuales 19 eran productoras de BLEE. Donde *E. coli* (64%) fue el aislado bacteriano con mayor frecuencia, seguido de *Klebsiella spp* (16%), *Proteus spp* (12%), *Acinetobacter baumannii* (6%) y *Enterobacter spp* (2%). En este estudio la resistencia de *E. coli* para Ciprofloxacina fue de 60%, Trimetoprim-Sulfametoxazole, 56.6%, Ceftriaxona 50%, Ceftazidima 43.3%. Referente a la expresión de genes que codifican para BLEE, esto se detectó en el 78.9% de los aislados (15/19). De los cuales el 100% (n=15) codificaron para la enzima CTX-M, un 40% (6/15) para la enzima TEM y 13.3% (2/15) para SHV. De los aislados bacterianos positivos para enzima CTX-M, el 86.6% (13/15), fueron de tipo CTX-M1, y el 6.7% (1/15) fue de tipo CTX-M2.⁽¹⁷⁾

3. JUSTIFICACIÓN

La detección de bacterias productoras de BLEE en laboratorios es una etapa crucial para el manejo apropiado de pacientes con ITU y otras patologías. Las técnicas que los laboratorios utilizan en el diagnóstico de ITU en su mayoría son métodos fenotípicos por su fácil utilización y bajo costo. Sin embargo, se puede observar poca sensibilidad. Por otro lado los métodos genotípicos por ejemplo: la reacción de la cadena polimerasa (PCR), tienen el potencial de realizarse directamente en el espécimen con mayor sensibilidad y especificidad, con subsecuente reducción del tiempo de diagnóstico. Así la identificación genotípica de las betalactamasas específicas, provee información adicional esencial para la prevención y control de las enfermedades infecciosas.

Mientras las penicilinas y cefalosporinas siguen siendo los antibióticos que se prescriben generalmente en las ITU, a la par las *Enterobacterias* principalmente *E. coli*, *Proteus spp* y *Klebsiella spp*, han incrementado el desarrollo de mecanismos de resistencia ante estos antibióticos, siendo el principal mecanismo la producción de betalactamasas.⁽¹⁶⁾ Debido al aumento del fracaso terapéutico, es relevante examinar la frecuencia de estos tipos de betalactamasas para limitar un uso correcto y racional de la terapia antibiótica prescrita.

Durante las últimas décadas, se han descrito enzimas que aumentaron la resistencia a fármacos betalactámicos, entre ellas las betalactamasas tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA. La gran diversificación que han sufrido estas enzimas a corto plazo representa un interés importante en ampliar estudios sobre la epidemiología de la resistencia a los betalactámicos en las cepas principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*.

A nivel nacional se han realizado pocas investigaciones referentes al tema, por lo que nace la necesidad de indagar un poco más en él, es por ello que este estudio tomo interés en caracterizar fenotípicamente y genotípicamente la producción de enzimas BLEE en *Enterobacterias* provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorio que asistieron al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, con el fin de contribuir en la aportación de datos epidemiológicos actualizados.

4. PROBLEMA

¿Cuál es el perfil fenotípico y genotípico de producción de BLEE en *Enterobacterias* , aisladas a partir de urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, entre los meses de Marzo-Abril del año 2013?

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil fenotípico y genotípico de producción de BLEE en *Enterobacterias*, aisladas a partir de urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, entre los meses de Marzo-Abril del año 2013.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar el género de las *Enterobacterias* aisladas en las muestras de estudio.
- b) Determinar la producción de enzimas BLEE por el método de Kirby-Bauer en las *Enterobacterias* aisladas.
- c) Identificar la presencia de genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M y *bla*OXA así como su grupo y gen específico que codifica para betalactamasas en las *Enterobacterias* aisladas positivas para BLEE, utilizando PCR multiplex.

6. MARCO TEÓRICO

Entendemos por infección la entrada, establecimiento y multiplicación de microorganismos en el interior o en la superficie de un huésped, existiendo distintos grados de relación entre el huésped y el microorganismo: colonización, Infección inaparente y enfermedad infecciosa. ⁽¹⁸⁾

La ITU se caracteriza por la presencia de microorganismos en el tracto urinario a cualquier nivel, desde el extremo distal de la uretra hasta la corteza renal (uretra, vejiga, próstata, uréteres, pelvis renal o riñones), comprendiendo diferentes entidades clínicas que requieren su catalogación mediante la correlación clínica-laboratorio. ⁽¹⁹⁾

6.1 Etiología de las infecciones del tracto urinario.

La etiología de las ITU, no es lineal, sino que varía dependiendo del tipo de infección, de la existencia o no de los factores predisponentes, de los tratamientos antimicrobianos previos y del hábito de adquisición, es decir comunitario o nosocomial, la gran mayoría de episodios está producido por microorganismos que provienen del colon y por tanto la microbiota fecal del paciente condiciona en gran medida la etiología de las ITU. El resto de ITU tiene una etiología exógena por microorganismos introducidos en las vías urinarias durante su manipulación. ⁽¹⁸⁾

En mujeres, *E. coli* causa entre el 80-85 % de cistitis aguda no complicada. *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus agalactiae* y especies de *Klebsiella spp*, son responsable de la gran mayoría de los episodios restantes. ⁽²⁰⁾

6.2 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram-negativos 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 ITU y muchas infecciones intestinales ^(22, 23)

Las características metabólicas de las *Enterobacterias* permiten diferenciarlas con fines diagnósticos y entre las que causan ITU con más frecuencia están:

6.2.1 *Escherichia*

Por lo general, la *E.coli* reacciona positivas para el indol, lisina descarboxilasa positiva 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. ⁽²⁴⁾

6.2.2 *Klebsiella, Enterobacter y Serratia*

Poseen crecimiento mucoso, grandes cápsulas de polisacáridos, son inmóviles, lisina descarboxilasa positiva y citrato positivo. Las especies de *Enterobacter* producen gas a partir de glucosa, *Serratia* produce ADNasa, lipasa y gelatinasa. En general, los tres géneros producen una prueba de Voges-Proskauer positiva. ⁽²⁴⁾

6.2.3 *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. ⁽²⁴⁾

6.3 Principios generales de la antibioterapia

Los antibióticos alteran la biología de los microorganismos por los siguientes mecanismos:

- a) Inhibición de la síntesis de la pared celular: Betalactámicos, Fosfomicina, Cicloserina, Vancomicina y Bacitracina. ⁽²¹⁾

- b) Desorganización de la membrana citoplasmática, lo que conduce a la desintegración celular: Polimixina, Anfotericina B, Nistatina. ⁽²¹⁾

- c) Inhibición de la síntesis de proteínas, por actuar sobre ribosomas en la iniciación de la (subunidad 30S): Tetraciclina; en la elongación (subunidad 50S): Cloranfenicol, Eritromicina, Lincosamida; en ambas subunidades con muerte bacteriana: Aminoglucósidos. ⁽²¹⁾

- d) Interferencia en la síntesis y en el metabolismo de los ácidos nucleicos: Rifampicina (ARN-polimerasa dependiente de ADN), Fluroquinolonas (ADN-girasa), Metronidazol y antivíricos. ⁽²¹⁾

- e) Antimetabolitos que bloquean la síntesis del ácido fólico: Sulfamidas, Sulfatos, Pirimetamina y Trimetoprim. ⁽²¹⁾

6.4 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. ⁽²⁵⁾

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. ⁽²⁶⁾

6.4.1. 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. ⁽²⁵⁾

6.4.2. Inhibidores de betalactamasas

Conservan en su estructura el anillo betalactámicos. 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 betalactamasas de diferentes especies bacterianas, potencian la actividad de penicilinas y cefalosporinas. ⁽²⁵⁾

6.4.3. 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 betalactamasas de bacterias Gram-negativas (*enterobacterias*, *Pseudomonas* y otras bacterias Gram-negativas aerobias). En el caso de los carbapenems, el azufre endocíclico es sustituido por un grupo metileno, quedando el átomo de azufre en posición adyacente al anillo bicíclico. ⁽²⁵⁾

6.4.4. Cefalosporinas

Contienen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazida. Sustituciones en las posiciones 3 y 7 modifican su actividad antibacteriana y sus propiedades farmacológicas. ⁽²⁵⁾

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 Gram-positivos como *S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* y tienen actividad limitada contra *E. coli*, *P. mirabilis* (indol negativo) y *K. pneumoniae*.⁽²²⁾

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*.⁽²⁷⁾

Las cefalosporinas de tercera generación son activas contra bacilos Gram-negativos 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 betalactamasas. Las betalactamasas codificadas cromosómicamente de tipo AmpC, que son inducibles o que pueden ser reprimidas 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 mediada por plásmidos, que transfieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación tienen como consecuencia mutaciones puntuales en los genes TEM o SHV.⁽²⁷⁾

En las cefalosporinas de cuarta generación encontramos dos compuestos cefepime y cefpirome. Puesto que son compuestos eléctricamente neutros, son capaces de cruzar rápidamente la

membrana externa de bacterias Gram-negativas y alcanzar una significativa concentración en el espacio periplásmico. Esta característica combinada con su relativa resistencia a hidrólisis por betalactamasas tipo AmpC y alta afinidad por PBP de bacilos Gram-negativos 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 betalactamasas tipo AmpC y seleccionan de manera estable a *Enterobacterias* derrepemida con menos frecuencia que las cefalosporinas de tercera generación, característica que puede proteger contra la aparición de resistencia entre los bacilos Gram-negativos. ⁽²⁷⁾

6.5 Mecanismos de transmisión de resistencia

Las formas más comunes de trasmisión de mecanismos de resistencia en las bacterias son: Transformación, transducción y conjugación. ⁽²⁸⁾

6.5.1. 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. ⁽²⁸⁾

6.5.2. 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. ⁽²⁸⁾

6.5.3. 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: ⁽²⁸⁾

6.5.3.1. 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 específicas. 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. ⁽²⁸⁾

6.5.3.2. 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. ⁽²⁸⁾

6.5.3.3. 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. ⁽²⁹⁾

6.6 Mecanismos de resistencia

6.6.1. Impermeabilidad de la membrana bacteriana externa

Las bacterias Gram-negativas 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. ⁽³⁰⁾

6.6.2. Alteración de los blancos

Las PBPs tanto en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los betalactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto la célula es resistente a agentes antimicrobianos. ⁽³⁰⁾

6.6.3. Bombas de flujo

Una amplia variedad de bombas de flujo proveen resistencia antimicrobiana tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. 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. ⁽³⁰⁾

6.6.4. 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. ⁽³⁰⁾

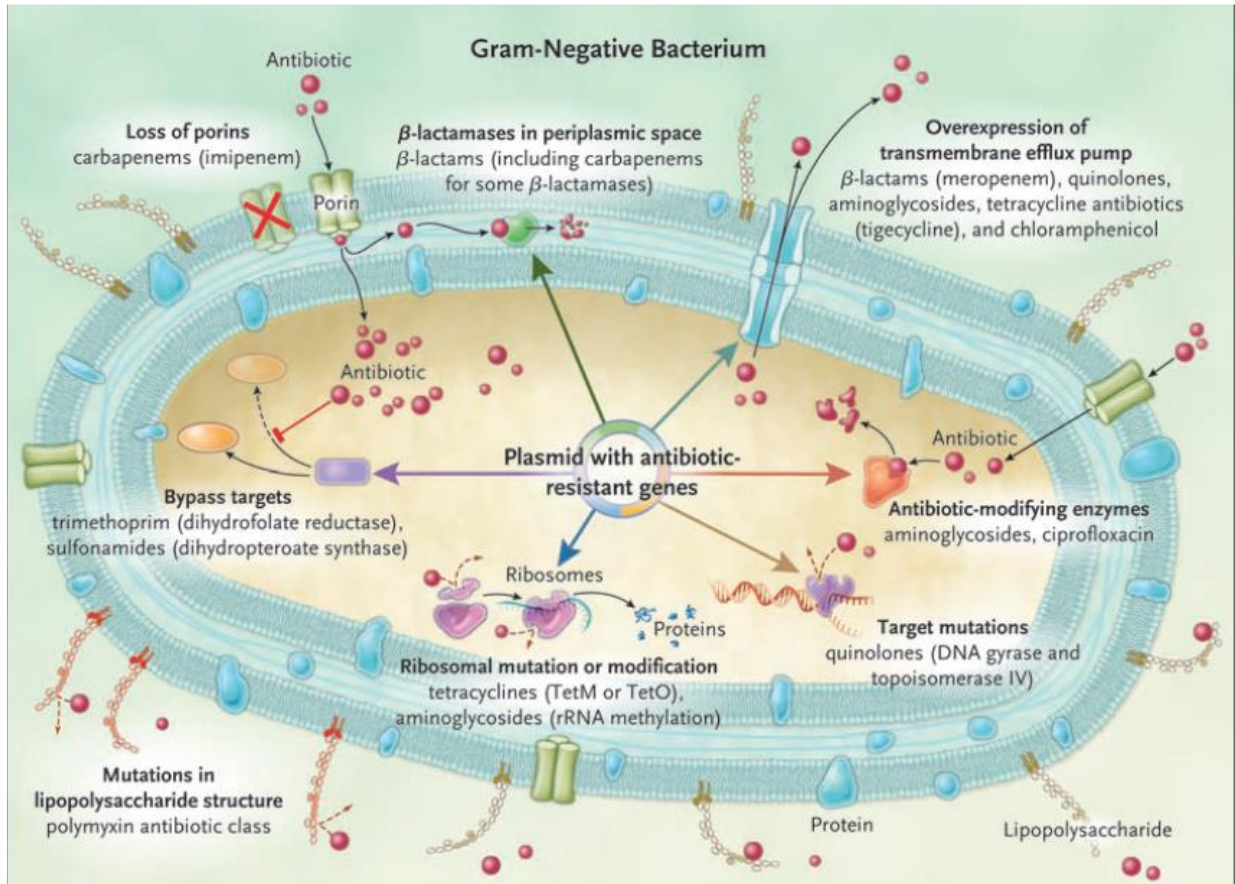


Figura 1. Mecanismos de resistencia en bacterias Gram-negativas y el efecto ante los antibióticos. Varios mecanismos de resistencia se presentan en bacterias Gram-negativas, algunas son mediadas por plásmidos móviles. Estos incluyen pérdida de porinas, que reducen el movimiento de antibióticos a través de la membrana celular. Presencia de betalactamasas en el espacio periplásmico, 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. ⁽³²⁾

6.7 Producción de enzimas

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámicos de estos antibióticos y los convierte en compuestos biológicamente inactivos. En bacterias Gram-negativas, las betalactamasas 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. ⁽²⁵⁾

6.7.1. Clasificación de las betalactamasas

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. ⁽³¹⁾

El esquema de Ambler divide a las betalactamasas 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 betalactamasas las clases A, C y D son betalactamasas con residuos de serina. En contraste, las enzimas de clase B son metalobetalactamasas 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 betalactamasas que son clínicamente relevantes. ⁽³¹⁾

6.7.2. Otras Betalactamasas

6.7.2.1. 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. ⁽³³⁾

La familia de betalactamasas 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. ⁽³³⁾

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 la concentración mínima inhibitoria (CIM) a cefotaxima y más limitado aumento en CIM de ceftazidima. Ahora hay alrededor de 40 BLEE tipo SHV. ⁽³⁴⁾

En Latinoamérica 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. ⁽³⁵⁾ Igualmente se descubrió otra cepa de *K. pneumoniae* en Chile para 1985 que era productora de betalactamasa tipo SHV-5. ⁽³⁶⁾ En la actualidad SHV-5 y SHV-12 predominan en Suramérica en estudios de resistencia. ⁽³⁷⁾ En México, se reportaron betalactamasas tipo SHV-5 y SHV-2 en *K. pneumoniae* aisladas de infecciones del torrente sanguíneo. ⁽³⁸⁾

6.7.2.2. Enzimas tipo TEM

La familia de betalactamasas 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 cefalotina 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 isoelectrico. ⁽³³⁾

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. ⁽³⁹⁾

Alrededor de 100 tipos de betalactamasas 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 betalactamasas, estas tienen actividad hidrolítica insignificante contra cefalosporinas de espectro extendido y no son consideradas BLEE. ⁽⁴⁰⁾

Las enzimas 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*. ⁽⁴¹⁾ Sin embargo las betalactamasas tipo TEM han sido reportadas muy raramente en países latinoamericanos. ⁽³¹⁾ Un reporte muestra que TEM-10 y TEM-12 están entre las enzimas tipo TEM más comunes detectadas en Latinoamérica. ⁽³⁷⁾

6.7.2.3. Enzimas tipo CTX-M

Son mayormente activas contra cefotaxima y ceftriaxona 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 betalactamasas 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. ⁽⁴²⁾

A diferencia de la mayoría de BLEE adquiridas, la fuente original de genes que codifican las betalactamasas 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. ⁽⁴³⁾

Aunque las enterobacterias productoras de betalactamasas 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. ⁽⁴⁴⁾

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 Suramérica (especialmente Argentina); ⁽⁴⁵⁾ Sin embargo, desde el 2000, cepas de *E. coli* productoras de betalactamasas 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.”⁽⁴⁶⁾ 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. ⁽⁴³⁾

6.7.2.4. Carbapenemasas

Son betalactamasas que confieren resistencia a los carbapenémicos (p ej, 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. ⁽⁴⁷⁾

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*. ⁽⁴⁸⁾

Clase B enzimas (Grupo 3 de Bush) son metalobetalactamasas, que normalmente hidrolizan carbapenems de manera eficiente, pero no aztreonam, son resistentes a los inhibidores de betalactamasa, 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*. ⁽⁴⁸⁾

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*. ⁽⁴⁸⁾

6.7.2.5. 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. ⁽⁴⁹⁾

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. ^(49, 50)

La resistencia a las enzimas AmpC mediada por plásmidos es menos común que la producción de betalactamasas de espectro extendido en la mayor parte del mundo. Las AmpC más comunes pertenecen a las familias: CMY, FOX, y DHA. ⁽⁴⁹⁾

6.8 Enterobacterias productoras de BLEE causantes de ITU

Las infecciones de tracto urinario pueden ocurrir en cualquier parte de este sistema pero con mayor incidencia en los riñones y la vejiga. En la gran mayoría de las infecciones, las bacterias ganan acceso a la vejiga a través de la uretra dándose a continuación el ascenso por lo uréteres a los riñones comprometiendo principalmente al parénquima renal. ⁽⁵¹⁾ Desde el punto de vista microbiológico el crecimiento de $\geq 10^5$ organismos por mililitro de orina indica infección. Muchos microorganismos pueden infectar el tracto urinario, pero con mayor incidencia las enterobacterias, siendo las más frecuente *E. coli* que causa el 80% de infecciones agudas, y otras especialmente *Proteus* y *Klebsiella spp.* ^(51,52)

La distribución de infecciones causadas por Enterobacterias productoras de BLEE es mundial y 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 complejo de determinar, debido a que esta puede variar entre diferentes regiones. ⁽¹⁶⁾

6.9 Epidemiología de Enterobacterias productoras de BLEE y genes de resistencia.

La epidemiología de las *Enterobacterias* productoras de BLEE ha sufrido cambios en los últimos años; en un principio en los años 80 y principios de los 90 las BLEE eran del tipo TEM y SHV, se detectaban fundamentalmente en *K. pneumoniae* y el origen era nosocomial y se debía a clones epidémicos, mientras que en la actualidad en la mayoría de los países, son las CTX-M las más frecuentes se aíslan principalmente en *E. coli*, son de origen comunitario y fundamentalmente se transmiten por plásmidos u otros elementos genéticos móviles. ⁽⁵⁴⁾

En los últimos años ha habido muchos informes acerca las infecciones o colonizaciones adquirida en la comunidad por *E. coli*, fundamentalmente produciendo ITU, estas cepas son portadoras de BLEE (CTX-M), y con resistencia a los agentes de elección para el tratamiento de las ITU, como son el Trimetoprim-Sulfametoxazole, Ciprofloxacina o Gentamicina.

Existe una gran diversidad geográfica en Europa en cuanto a la prevalencia de BLEE, encontrándonos Rusia con un 50% y Polonia con un 40%. En España un estudio realizado en el año 2000 muestra una prevalencia en *K. pneumoniae* y *E. coli* de 2.7% y 0.5% respectivamente. La prevalencia de BLEE en Europa es más alta que en Estados Unidos pero más baja que en Asia y América del Sur. ⁽⁵⁴⁾

Es hasta 1989 que se informa el primer aislamiento de BLEE detectado en América latina. Sin embargo, en la actualidad América latina tiene la tasa más elevada del mundo, existiendo variaciones dentro de los países que la forman, siendo los de mayor prevalencia Brasil y Chile. Se han informado caso de CTX-M, PER, TEM, SHV observándose un aumento de las infecciones producidas en la comunidad. Estudios recientes obtienen para América latina la prevalencia más alta en el mundo de aislamientos para *K. pneumoniae* reportadora de BLEE con un 45.4-51.9% y para *E. coli* de un 8.5-18.1%. ⁽⁵⁴⁾

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

En Nicaragua información referente a la prevalencia de bacterias Gram-negativas multirresistentes y productoras de BLEE es poco documentada. 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 cols., en su estudio de resistencia antimicrobiana en bacterias Gram-negativas 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 que clones similares de *K. pneumoniae* multirresistentes y productores de BLEE que afectaron a los neonatos y que también fueron aislados del ambiente. ⁽¹³⁾ Otro ejemplo es el de Matute y cols., 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%). ⁽¹⁴⁾

En otro estudio más reciente Bours y cols., 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%). ⁽¹⁵⁾

En el mismo año Pérez C. y cols., realizaron un estudio para la detección de la frecuencia de genes de resistencia en bacterias Gram-negativas productoras de BLEE en pacientes ambulatorios de Juigalpa y León. Se aislaron 110 *Enterobacterias* siendo la más frecuente en ambos laboratorios la *E. coli*, que representó un 85.45% (94/110) del total de bacterias testadas en este estudio. Referente al perfil fenotípico de resistencia se encontró que el 27% (30/110) de las bacterias estudiadas fueron productoras de betalactamasas, de estos aislados el 90.9% (27/30) eran *E. coli*. El perfil de resistencia de las *E. coli* productoras de BLEE mostraron que estas fueron resistente en un 100% a ceftriaxona. Además, se observó niveles altos de resistencia a otros antibióticos p ej: aztreonam (80.7%), cefotaxima (92.3%), cefpodoxima

(96.1%), ceftazidima (84.6%) y amoxicilina con ácido clavulánico (92.3%). Es importante indicar que en este trabajo la resistencia a cefoxitina 30%(9/30) fue un indicativo de producción de betalactamasas tipo AmpC de acuerdo a la norma indicada por CLSI. Referente al a la caracterización molecular, encontraron la presencia de los genes *bla*TEM (1/30), *bla*CTX-M (11/30) y de *bla*TEM/*bla*CTX-M (10/30).⁽¹⁶⁾

En un estudio reciente, realizado por Gonzales M. y cols., Se analizaron 50 muestras de las cuales 19 eran positivas para BLEE. Donde el aislado con mayor frecuencia era *E. coli* (64%), seguido de *Klebsiella spp* (16%), *Proteus spp* (12%), *Acinetobacter baumannii* (6%) y *Enterobacter spp* (2%). En este estudio la resistencia de *E. coli* para Ciprofloxacina fue de 60%, Trimetoprim-Sulfametoxazole, 56.6%, Ceftriaxona 50%, Ceftazidima 43.3%. Referente a la expresión de genes que codifican para BLEE se detectó en el 78.9% de los aislados (15/19). De estos el 100% (n=15) codificaban para la enzima CTX-M, el 40% (6/15) para la enzima TEM y el 13.3% (2/15) para SHV. De las bacterias positivas para enzima CTX-M, el 86.6% (13/15), fueron de tipo CTX-M1, el 6.7% (1/15) fue de tipo CTX-M2.⁽¹⁷⁾

6.10 Tratamiento a *Enterobacterias* productoras de betalactamasas que causan ITU

Tratamiento para las infecciones de vías urinarias requieren antibióticos específicos dirigidos a un agente conocido o que se presume que está causando la infección.⁽⁴⁸⁾ 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-Sulfametoxazole, quinolonas, macrólidos y nitrofurantoína (cistitis no complicada); quinolonas, ceftriaxona o gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazole (pielonefritis no complicada); ampicilina y gentamicina, quinolonas, aztreonam y ticarcillin/clavulanato (infección de vías urinarias complicada).⁽⁵¹⁾ Los fármacos que usualmente se prescriben basados en las recomendaciones del MINSA son: cotrimoxazole, amoxicilina, ampicilina, aminoglucósidos, cefalosporinas, ácido nalidíxico y nitrofurantoína.⁽⁴⁾

La presencia de BLEE complica la selección del antibiótico a emplear especialmente en pacientes con infecciones serias como bacteremia. La razón de esto es que las bacterias

productoras de BLEE son usualmente multirresistentes a varios antibióticos, un dato interesante es que las cepas productoras de CTX-M acarrean corresponsencia a fluroquinolonas. (44)

6.10.1. 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. (55)

6.10.2. Cefalosporinas

Las cefalosporinas de segunda y tercera generación no son consideradas como opciones de tratamiento debido al alto nivel de resistencia. Sin embargo, cefepime, 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 cefepime, 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. (55)

6.10.3. 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 betalactamasas tipo AmpC. (55)

6.10.4. Combinaciones de betalactámicos/ inhibidores de betalactamasas

El grado de actividad de los inhibidores de betalactamasas contra la hidrólisis de betalactámicos por enzimas BLEE puede variar por el tipo de inhibidor así como el tipo de BLEE. (19) 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. (55)

6.10.5. Aminoglucósidos

Desde que la mayoría de las BLEE están localizados 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. Debido a esto el uso de estos antibióticos es limitado. ⁽⁵⁵⁾

6.10.6. Fluroquinolonas

La resistencia a las fluroquinolonas ha llegado inmensas proporciones en Enterobacteriaceae productoras de CTX-M, con tasas de resistencia que van del 55% al 100% de diferentes áreas del mundo. Por lo tanto, las fluroquinolonas tienen un papel muy limitado en el tratamiento de la infección causada por la bacteria productora de BLEE. Sin embargo siguen siendo una opción si el aislamiento a prueba es susceptible a estos agentes. ⁽⁵⁵⁾

6.10.7. 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%). ⁽⁵⁵⁾

La **Nitrofurantoína** 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. ⁽⁵⁵⁾

La **tigeciclina**, un derivado de la **minociclina**, es el primer miembro de la clase de **glicileclinas** disponible para uso clínico. Tiene la propiedad de evadir los mecanismos comunes de resistencia a las tetraciclinas que expresan bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. La

tigeciclina ha demostrado una excelente actividad frente *E. coli* productora de BLEE, especialmente las productoras de enzimas CTX-M. ⁽⁵⁵⁾

Otros agentes como **temocilina**, **pivmecillinam** 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. ⁽⁵⁵⁾

6.11 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 a 0.5 MacFarlán (1.5×10^8 UFC/ml). ^(30,56)

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 CIM obtenida en las pruebas de dilución. ^(30,56)

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. ^(30,56)

6.12 Factores que afectan el diámetro del halo de inhibición

6.12.1. 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. ⁽⁵⁶⁾

6.12.2. 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. aminoglucósidos, 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. ⁽⁵⁶⁾

6.12.3. 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. ⁽⁵⁶⁾

6.12.4. 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 ≥ 20 mm. ⁽⁵⁶⁾

6.12.5. Efectos de cationes divalentes

La variación en cationes divalentes, principalmente Magnesio y Calcio, afecta los resultados de ensayo de aminoglucósidos 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. ⁽⁵⁶⁾

6.13 Reacción en cadena de la polimerasa (Siglas en inglés PCR)

PCR 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 los extremos 3' del sitio de unión y se une específicamente a este. ⁽⁵⁷⁾

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. ⁽⁵⁷⁾

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. ⁽⁵⁷⁾

6.14 Detección de los genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M y *bla*OXA por la técnica de PCR Multiplex.

La PCR multiplex es una variante de la PCR convencional en la que 2 o más blancos genéticos son simultáneamente amplificados en la misma reacción utilizando varios pares de cebadores. De esta forma se reduce el gasto de reactivos y tiempo invertido, especialmente cuando se analiza un gran número de muestras. ⁽⁶¹⁾

Varios ensayos de PCR multiplex permiten la detección simultánea de varios genes de resistencia (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M y *bla*OXA) a través de la amplificación de fragmentos específicos de estos genes.

La técnica de PCR multiplex se ha utilizado en varios estudios realizados en diferentes países con diferentes finalidades. En este estudio se utilizó la técnica de PCR multiplex desarrollado por Dallene y cols., el año 2010, en el cual implementaron ensayos de PCR multiplex para la detección de genes codificadores de enzimas betalactamasas incluyendo sus grupos y variantes específicas importantes en *Enterobacterias* productoras de BLEE. ⁽⁶¹⁾

En Nicaragua se han realizados varios estudios empleando esta técnica y referente al tema caracterización de genes de resistencia en *Enterobacterias* productoras de BLEE, por ej; en el 2004, Amaya y cols, realizaron un estudio sobre la resistencia antimicrobiana en bacterias Gram-negativas aisladas de neonatos con sepsis y del ambiente de la sala de cuidados intensivos de neonatos (UCIN) del Hospital Oscar Danilo Rosales (HEODRA) León; en el 2010, Perez y cols., emplearon la técnica de PCR multiplex en su estudio para la detección de

la frecuencia de genes de resistencia en bacterias Gram-negativas productoras de BLEE en pacientes ambulatorios de Juigalpa y León. En el 2012, Gonzales y cols., usaron la misma técnica en su estudio de caracterización fenotípica y molecular de *Enterobacterias* aisladas de urocultivos en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León.

7. DISEÑO METODOLOGICO

7.1. Tipo y área de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, el cual tuvo como escenario el Laboratorio del Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN- León (Campus médico).

7.2. Periodo y muestreo de estudio

Durante el periodo comprendido entre Marzo- Abril 2013, se logró captar un total de 102 muestras de orinas obtenidas de pacientes con sospecha de infección del tracto urinario que asistieron a realizarse estudio microbiológico y hayan aceptado participar en este estudio. (Ver anexo). El muestreo se realizó mediante una selección no probabilística por conveniencia.

7.3. Procedimientos

7.3.1. Criterios de selección e identificación bacteriana

A todas las muestras de orina (n=102) se les realizó el cultivo bacteriológico en Agar MacConkey, con incubación a 37°C durante 24h. Se tomaron en consideración todo asilado bacteriológico positivo para *Enterobacterias* en el medio de cultivo (n=51), presentando un recuento igual o mayor de 10⁵UFCs/ml con un sólo tipo de colonia, las cuales fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales según las recomendaciones descritas en el manual de procedimientos bacteriológicos del Ministerio de salud Nicaragüense (MINSA) y Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia Nicaragüense (CNDR) ⁽⁵⁸⁾: Agar hierro triple azúcar (TSI), lisina hierro agar (LIA), Citrato de Simons, Urea de Christensen, sulfuro indol motilidad (SIM) y reactivo de Erlich.

7.3.2. Caracterización fenotípica de BLEE y perfil de resistencia a Carbapenems

Las *Enterobacterias* previamente identificadas fueron inoculadas en agar Mueller-Hinton a una escala MacFarlán de 0.5 (1.5 x 10⁸ UFCs/ml) con el objetivo de realizar la búsqueda de enzimas betalactamasas (BLEE); esto se realizó mediante el método de triple disco,

utilizando dos cefalosporinas de tercera generación; ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) más Amoxicilina/Ácido Clavulánico (AMC) según las recomendaciones del Instituto Clínico de Estándares de Laboratorio (CLSI) y del CNDR/MINSA. ^(30, 56, 58) AMC solo se utilizó para la detección fenotípica de BLEE, por lo que no se evaluó su susceptibilidad. Posteriormente los aislados productores de BLEE fueron inoculados en agar Mueller-Hinton a una escala MacFarlán de 0.5 evaluando su resistencia a Carbapenems: Imipenem (IPM), Meropenem (MEM) y Ertapenem (ETP). Un total de 20 aislados fueron identificados como productores de BLEE, los cuales fueron almacenados en viales de rosca (NUNC, Rochester, Estados Unidos) que contenían 500 µl de solución amortiguadora de fosfato estéril (PBS). Seguidamente fueron refrigeradas a 4° C para futuros análisis.

7.3.3. Caracterización de genes codificadores de BLEE

Todos los aislados con producción de BLEE previamente guardados, fueron recultivados en agar MacConkey, posteriormente se realizó las suspensiones de estos aislados y fueron caracterizados molecularmente utilizando la reacción en cadena de polimerasa multiplex (PCR) desarrollado por Dallene y cols. ⁽⁶¹⁾

7.3.3.1. Detección de genes *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M* y *blaOXA* en *Enterobacterias* por técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Multiplex

7.3.3.1.1. Extracción del ADN

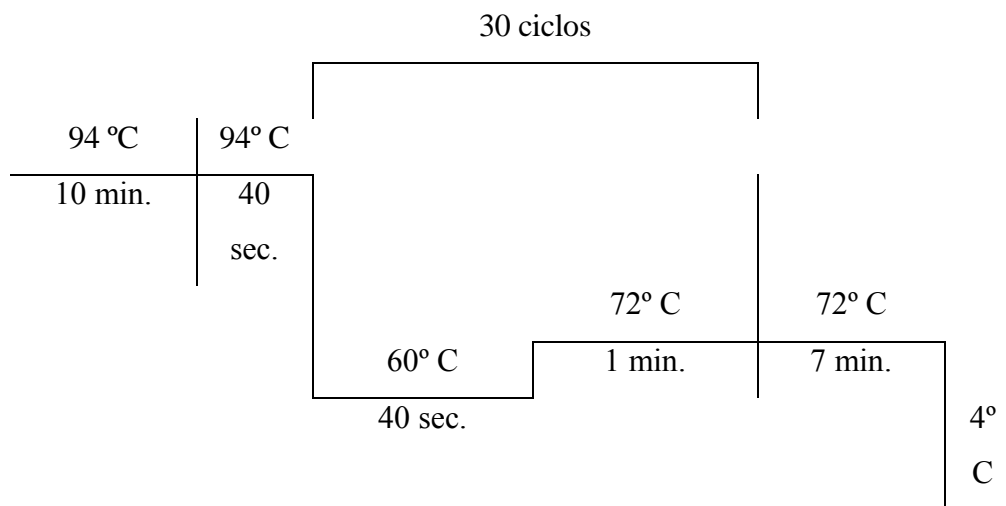
Se realizó a partir de una colonia bacteriana calentada a 95°C por 10 minutos en un volumen total de 100 uL de agua destilada, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos y de la suspensión se obtuvo el ADN para la realización del PCR.

7.3.3.1.2. PCR Multiplex I para *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA* y PCR multiplex II para *blaCTX-M* grupo 1, 2, 9, 8/25.

Los PCR para la detección de los genes que codifican para betalactamasas (*bla*) se realizaron utilizando cebadores universales, siguiendo el procedimiento descrito por Dallene C y cols., (Ver primers en la tabla 1). ⁽⁶¹⁾ El equipo que se utilizó fue el DNA Thermal Cycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para la amplificación, 2 uL de ADN

bacteriano lisado fueron sujetos a cada PCR multiplex (I, II) en una mezcla de reacción de 50 uL conteniendo buffer a una concentración de 1X para cada PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3/50 mM KCl/1.5 mM MgCl₂), concentración de 200 uM de cada trifosfato desoxirribonucleotido, una concentración variable de cebadores de grupos específicos detallados en la tabla 1 y 1 U de Taq polimerasa (Aldrich, St Quentin Fallavier, France).⁽⁶¹⁾

Figura 2: Programa de amplificación para genes *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*CTX-M y *bla*OXA



Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% con marcador de 100 pb (New England Biolab), teñido con bromuro de etidio, expuesto a luz ultravioleta y por último fotografiada.

Una vez detectada la amplificación de un gen *bla*, se procedió al análisis de secuenciación para determinar el grupo de *bla* específico.

7.3.3.1.3. Análisis de secuencia de los productos del PCR Multiplex

Para identificar los genes específicos de betalactamasas detectados en los ensayos de PCR para SHV, TEM, OXA y grupos de CTX-M, se realizó un análisis de secuencia de ADN. Los productos de PCR amplificados fueron purificados usando el kit de purificación de ExoSap (ExoSap-it, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), luego se realizó una secuenciación

bidireccional. Cada secuencia fue comparada con secuencias de genes betalactamasa conocidos (<http://www.lahey.org/studies>) mediante un alineamiento de secuencia múltiple a través del programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).⁽⁶¹⁾

Tabla 1. Primers específicos que se utilizaron en los ensayos

Nombre del PCR	Betalactamasa buscada	Nombre del primer	Secuencia (5' – 3')	Longitud (bases)	Posición de alineamiento	Tamaño del amplicon (bp)	Concentración del primer (pmol/ul)
Multiplex I TEM, SHV y OXA-1	Variantes TEM incluyendo TEM-1 y TEM-2	MultiTSO-T_for	CATTCCGTGTCGCCCTTATC	22	13 – 34	800	0.4
		MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	22	812 - 791		0.4
	Variantes SHV incluyendo SHV-1	MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	21	71 – 91		0.4
		MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	21	783 - 763		0.4
OXA-1, OXA-4 y OXA-30	MultiTSO-O_for	MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	22	201 – 222	564	0.4
		MultiTSO-O_rev	GACCCCAAGTTTCTGTAAGTG	22	764 - 743		0.4
Multiplex II CTX-M grupo 1, 2 y 9	Variantes de CTX-M grupo 1 incluyendo CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-15	MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^b	20	61 – 80	688	0.4
		MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b	21	748 - 728		0.2
	variantes de CTX-M grupo 2 incluyendo CTX-M-2	MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC	18	345 – 362		0.2
		MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^b	21	748 - 728		0.2
	variantes de CTX-M grupo 9 incluyendo CTX-M-9 y CTX-M- 14	MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	19	299 – 317		0.4
		MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG	18	859 - 842		0.4
CTX-M grupo 8/25	CTX-8, CTX-M-25, CTX-M-26 y CTX- M-39 a CTX-M-41	CTX-Mg8/25_for	AACRCRCAGACGCTCTAC ^b	18	172 – 189	326	0.4
		CTX-Mg8/25_rev	TCGAGCCGGAASGTGYAT ^b	19	497 - 479		0.4

7.4. Aspectos éticos del estudio

Este estudio fue dirigido principalmente al cultivo bacteriológico por lo que sólo se consideró el consentimiento verbal del paciente, para acceder a cierta información (Ver anexo). No hubo intervención invasiva para la toma de muestra y sólo se utilizó el aislado bacteriano, por lo que no se remitió al comité de ética. Sin embargo se solicitó permiso a la dirección del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas para la realización de este trabajo. (Ver anexo). Este estudio fue realizado en colaboración con un estudiante de maestría de la Universidad de Liegé (ULG) de Bélgica, el cual proporcionó la mayoría de los materiales, para poder llevar a cabo este estudio.

7.5. Análisis de los resultados

Estadística descriptiva. Los datos se procesaron en programas de computación: Whonet versión 5.6, Excel 2013 para Windows 8.1 y BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La información se agrupó en tablas de acuerdo a la operalización de las variables (Ver tabla 2).

Tabla 2. Operalización de variables

Variable	Definición	Escala
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la toma de muestra.	1. ≤ 15 2. 16-50 3. 51-69 4. ≥ 70
Sexo	Características biológicas que distinguen al macho y a la hembra.	5. Masculino 6. Femenino
Métodos diagnósticos	Método o técnica empleada para la identificación bacteriana y su perfil de resistencia	1. Pruebas bioquímicas. 2. Método de Kirby-Bauer. 3. Detección de genes <i>bla</i> por PCR.
Agente etiológico	Bacteria Gram-negativa causante de la infección de vía urinaria	<i>Enterobacterias</i>
Resistencia	Capacidad de ciertas cepas de bacterias para desarrollar tolerancia a antibióticos específicos.	1. Sensible 2. Intermedio 3. Resistente
Betalactamasas de espectro extendido	Producción de enzimas que confieren resistencia a todos los betalactámicos, excepto cefamicinas y carbapenems.	1. Positivo 2. Negativo
Multiresistencia	Resistencia a más de 3 familias de antibióticos	1. Si 2. No

8. RESULTADOS

8.1 Aislamiento e Identificación bacteriana

Durante el periodo de Marzo-Abril del 2013, se logró captar un total de 102 muestras para urocultivos, obteniendo crecimiento bacteriano positivo para *Enterobacterias* en el 50% de las muestras analizadas. Los urocultivos positivos fueron en su mayoría, de pacientes entre las edades de 16-50 (43%) y de 51-69 (35%) años respectivamente. El 84% de los aislados bacterianos provenían de muestras de pacientes del género femenino. El microorganismo que se aisló con mayor frecuencia fue *E. coli* (80%), seguido de *Proteus sp.* (14%), *Enterobacter sp.* (4%) y *Klebsiella sp.* (2%) (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Características de la población y Detección de *Enterobacterias*

Características	<i>Enterobacterias</i> N= 51				Total = 51 aislados	BLEE total = 20 aislados
	<i>E. coli</i> n (%)	<i>Proteus sp</i> n (%)	<i>Enterobacter sp</i> n (%)	<i>Klebsiella sp</i> n (%)	n (%)	n (%)
Genero						
Femenino	35 (68)	5 (10)	2 (4)	1 (2)	43 (84)	16 (80)
Masculino	6 (12)	2 (4)	-	-	8 (16)	4 (20)
Edad						
≤15	2 (4)				2 (4)	
16-50	15 (29)	4 (8)	2 (4)	1 (2)	22 (43)	7 (35)
51-69	15 (29)	3 (6)			18 (35)	8 (40)
≥70	9 (18)				9 (18)	5 (25)

8.2 Detección fenotípica de producción de enzimas BLEE y resistencia a Carbapenem

El análisis se realizó mediante el método de Kirby-Bauer y el tamizaje para la detección de bacterias productoras de BLEE mediante el método de triple disco (CAZ+AMC+CTX), encontrando que el 39% (20/51) de las bacterias estudiadas fueron productoras de BLEE, de estos aislados el 95% (19/20) eran *E. coli* y el 5% (1/20) correspondió a *Klebsiella sp.* (Ver Tabla 3, arriba expuesta).

Se realizó un tamizaje para la resistencia a Carbapenems mediante el uso de los antibióticos: MEM, IMP y ETP. Sin embargo, no encontramos aislado bacteriano resistente a estos antibióticos testados.

8.3 Identificación de genes *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M* y *blaOXA*

La expresión de genes que codifican para enzimas BLEE se detectó en el 100% (20/20) de los aislados positivos para producción de BLEE en el ensayo fenotípico. El 100% de los aislados (20/20) codificaban para la enzima tipo CTX-M, el 75% (15/20) para la enzima tipo OXA, el 65% (13/20) para TEM y el 5% (1/20) para SHV.

Además se encontró que todas los 20 aislados productores de BLEE transportaban más de un gen *bla* al mismo tiempo, el 40% (8/20) de estos presentaban genes *blaCTX-M/OXA/TEM*; 25% (5/20) de los aislados presentaban genes *blaCTX-M/TEM*; 30% (6/20) presentaban genes *blaCTX-M/OXA*, y un 5% (1/20) presentaron genes *blaCTX-M/OXA/SHV* (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de genes *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M* y *blaOXA* en los aislados bacteriano analizados.

Genes expresados	Frecuencia (%)	<i>Enterobacterias</i>	
		<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp</i>
CTX-M/OXA/TEM	8 (40)	8	
CTX-M/TEM	5 (25)	5	
CTX-M/OXA	6 (30)	6	
CTX-M/OXA/SHV	1 (5)		1

Los 19 aislados de *E. coli* fueron seleccionados para análisis de secuenciación, todos ellos fueron positivos en el PCR multiplex para CTX-M, 14/19 para enzima OXA y 13/19 para enzima TEM. El PCR multiplex para detección de grupo CTX-M-1, 2, 9, 8 y 25 mostró que los 19 aislados de *E. coli* fueron positivos para grupo CTX-M-1. Después de secuenciar se encontró que los genes *blaTEM-1* y *blaOXA-1* estuvieron presentes en los aislados de *E. coli* positivos en el ensayo de PCR multiplex para enzimas TEM y OXA. Para los grupos CTX-M, se encontró que al gen *blaCTX-M-15* como el gen específico en todos los aislados de *E. coli* positivos para grupo CTX-M-1 (Ver tabla 5).

Para la cepa de *Klebsiella sp* BLEE positivo que presentaba genes *blaCTX-M*, *blaOXA* y *blaSHV* mediante PCR multiplex, el análisis de secuenciación mostró la presencia de los genes OXA-1, SHV-11 y CTX-M-15 (Ver tabla 5).

Tabla 5. Distribución de genes específicos que codifican para betalactamasas

Enterobacteria	Gen específico de <i>blaCTX-M</i> grupo CTX-M1	Gen específico para <i>blaOXA</i>	Gen específico para <i>blaTEM</i>	Gen específico para <i>blaSHV</i>
<i>E. coli</i>	CTX-M-15	OXA-1	TEM-1	
<i>Klebsiella sp</i>	CTX-M-15	OXA-1		SHV-1

9. DISCUSIÓN

La adquisición en la comunidad de bacterias resistente a los antibióticos, se ha convertido en un problema de salud pública de gran importancia clínica cuando se trata de pacientes con ITU, afectando en su mayoría a pacientes del género femenino.⁽¹⁶⁾ En el presente estudio el mayor número de aislados bacterianos procedían de muestras de pacientes del género femenino (84%), siendo *E. coli* (80%) el microorganismo encontrado con mayor frecuencia, seguido de *Proteus sp* (14%), *Enterobacter sp* (4%) y *Klebsiella sp* (2%). Estos resultados son similares a los referidos en otros estudios, p ej. Andreu y cols., en su estudio de Etiología de las ITU adquirida en la comunidad reportaron que el 80.3% de los aislados bacterianos analizados provenían de paciente del género femenino, siendo *E. coli* la más frecuente (70.8%), seguida de *Klebsiella sp* (6.8%) y *Proteus sp* (6.6%).⁽¹⁸⁾ Pérez y cols., en su estudio de genes *bla_{BLEE}* en *Enterobacterias*, determinaron que el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *E. coli* (85.45%).⁽¹⁶⁾ Gonzales y cols. En su estudio caracterización fenotípica y molecular de *Enterobacterias* aisladas de urocultivos del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, Junio-Octubre 2012, reporta datos similares donde el mayor número de aislados bacterianos procedían de muestras de pacientes del género femenino (88%), siendo *E. coli* (64%) el microorganismo más frecuente, seguido de *Klesiella sp* (16%), *Proteus sp* (12%), *Acinetobacter sp* (6%) y *Enterobacter sp* (2%).⁽¹⁷⁾ Reflejando así que *E. coli* es el microorganismo que afecta con mayor frecuencia a las pacientes del género femenino con ITU.

En los últimos años se ha detectado un aumento de *Enterobacterias* productoras de BLEE causante de infecciones adquiridas en la comunidad^(18,20). En este estudio se encontró que el 39% de las *Enterobacterias* aisladas fueron productoras de BLEE, *E. coli* (95%) y *Klebsiella sp* fueron las principales bacterias aisladas. Diversos estudios han reportado datos similares a los encontrados, p ej. Villegas y cols., en el 2011 en Latinoamérica realizó la investigación SMART (Análisis de Seguimiento de Tendencias de Resistencia a los antimicrobianos) en el que se aislaron muestras en 10 países de Latinoamérica encontrando que el 26.8% de *E. coli* y el 37.7% de *K. pneumoniae* eran productores de BLEE.⁽⁶²⁾ En el mismo año, Tabbouche y cols., realizaron un estudio en el Norte de Líbano acerca de la detección de los genes BLEE,

demostrando que 58/73 cepas de *E. coli* fueron productoras de BLEE aisladas de muestras de orina, lo cual indicaba una alta ocurrencia de ITU. ⁽⁶³⁾

Bours y cols., realizaron un estudio de resistencia en aislados bacterianos provenientes de urocultivos en el HEODRA y centros de atención primaria en León, encontrando que el 29.5% de los aislados de *E. coli* fueron productores de BLEE. ⁽¹⁵⁾ Pérez y cols., en el año 2010, en su estudio de frecuencia de genes *bla*_{BLEE} en *Enterobacterias*, realizado en León y Juigalpa, reportaron que el 27.3% de las muestras de orina analizadas eran productoras de BLEE, de las cuales el 90% fueron *E. coli*. ⁽¹⁶⁾ Gonzales y cols., en el 2012, en su estudio de caracterización fenotípica y molecular de *Enterobacterias*, realizado en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, UNAN- León, encontraron que 38% de las bacterias analizadas fueron productoras de BLEE, de las cuales el 40.6% fueron *E. coli*. ⁽¹⁷⁾

En el presente estudio los genes encontrados con mayor frecuencia fueron *bla*CTX-M (100%), seguido de *bla*OXA (75%), *bla*TEM (65%) y *bla*SHV (5%). Aunque *bla*TEM se define como el gen productor de betalactamasa más frecuente en los años 80 y a principios de los 90, hoy en día hay informes que el gen *bla*CTX-M es el más frecuente en muchas partes del mundo, siendo responsables de epidemias nosocomiales y comunitarias por su rápida aparición y diseminación. ⁽⁶⁴⁾ Nuestros hallazgos coinciden con los obtenidos por Eftekhar y cols., quienes reportaron que *bla*CTX-M fue el gen encontrado con mayor frecuencia (31.37%). ⁽⁶⁵⁾ De igual manera Rodríguez-Baño y cols., detectaron genes que codifican para la producción de *bla*CTX-M (69%), *bla*SHV (32%) y *bla*TEM (6%) en 122 aislados de *E. coli* procedentes de la comunidad. ⁽⁶⁶⁾ Pérez y cols., en su estudio reportaron la presencia de los genes *bla*CTX-M y *bla*TEM, siendo más frecuente *bla*CTX-M (36.6%). ⁽¹⁶⁾ Gonzales y cols., en su estudio, encontraron la presencia de genes *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*OXA, siendo más frecuente *bla*CTX-M (100%). ⁽¹⁷⁾ Lo que confirma la epidemiología cambiante de las BLEE a nivel mundial, así se reconoce que actualmente las enzimas del tipo CTX-M son la de mayor prevalencia a nivel mundial y en nuestro medio. ⁽⁶⁷⁾

En nuestro estudio, todos los 20 aislados positivos albergaban más de un tipo diferente de genes, el 40% eran portadores de genes betalactamasa CTX-M/OXA/TEM; 30% presentaban genes betalactamasa CTX-M/OXA; 25% presentaban genes betalactamasa CTX-M/TEM para *E. coli*. Mientras que el 5% presentaron genes betalactamasa CTX-M/OXA/SHV para *Klebsiella sp*. Resultados similares son los encontrados por Gonzales y cols., en su estudio reportaron que el 53.3% de los aislados bacteriano codificaban solo para la enzima tipo CTX-M, el 13.3% codifico para enzimas CTX-M/TEM, el 20% codifico para enzimas CTX-M/TEM/OXA y el 13.3% para CTX-M/TEM/SHV/OXA. ⁽¹⁷⁾

En este estudio el gen tipo TEM-1 fue encontrado en el 65% de los aislados principalmente de *E. coli*. El PCR multiplex para detección de grupo CTX-M-1, 2, 9, 8 y 25 mostró que los 19 aislados de *E. coli* fueron positivo para grupo CTX-M-1 como el grupo dominante de los genes. Después de secuenciar se encontró a CTX-M-15 como la enzima específica para CTX-M-1. Para el único aislado de *Klebsiella sp* que presentaba gen CTX-M, fue analizado por secuenciación encontrándose CTX-M-15 como la betalactamasa específica presente en el aislado que fue positivo en el ensayo de PCR multiplex para CTX-M-1. Estos resultados son similares a los referidos en otros estudios, p ej. En Suecia, Tarnberg., en su estudio de *Enterobacterias* productora de BLEE, determino que la mayoría de *E. coli* portaban genes CTX-M perteneciente al grupo CTX-M-1 (67%), seguido de CTX-M-9 (27%). De igual manera, los genes CTX-M fueron detectados en el 50% de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* perteneciendo todos al grupo CTX-M-1, además los genes tipo TEM-1 fueron encontrado en 68% de *E. coli*. ⁽⁶⁹⁾ En el Reino Unido Coque y cols., observaron un incremento dramático reciente de la prevalencia de *Enterobacterias* productora de BLEE aisladas de hospitales y comunidad, encontraron que CTX-M-1 fue el grupo dominante para *E. coli* cuyo gen específico correspondió a CTX-M-15, seguido de CTX-M-9 (16-31%). ⁽⁷⁰⁾ Pérez y cols., investigaron la presencia de los genes *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2 y *bla*CTX-M-9. Logrando identificar 21 cepas productoras de CTX-M, las cuales correspondían al grupo *bla*CTX-M-1 (16) y *bla*CTX-M-2 (3) todas *E. coli*. ⁽¹⁶⁾

Entre las cepas productoras de BLEE tipo CTX-M que presentaban el gen específico CTX-M-15, se observó una producción simultánea de otro tipo de genes que codifican betalactamasa como; TEM-1, OXA-1 y SHV-11. Amaya y cols., detectaron una alta prevalencia en bacterias Gram-negativas 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. ⁽¹³⁾ Pitout y cols., en su estudio de detección fenotípica y molecular de betalactamasas CTX-M producida por *E. coli* y *Klebsiella sp* indica que CTX-M-15 está asociada con la coproducción de otros genes que codifican betalactamasas como TEM-1, OXA-1 y de enzimas modificadoras de aminoglucósidos. ⁽⁶⁸⁾

En un estudio realizado por Bradford., refiere que SHV puede ser el tipo de BLEE más frecuente en aislados clínicos de cualquier tipo. ⁽³³⁾ Sin embargo, en este estudio apenas se identificó mediante análisis de secuenciación la presencia del gen *bla*SHV-11, en un sólo aislado bacteriano de *Klebsiella sp*. Tarnberg., en su estudio encontró que de 20 aislados BLEE positivo para *Klebsiella pneumoniae* 14 tenían presenten un sólo gen, de estos 14 aislados positivos 5 presentaron un único gen SHV-11 que codificaba para betalactamasa. ⁽⁶⁹⁾

En este estudio se realizó un tamizaje para la resistencia a Carbapenems mediante el uso de los antibióticos: MEM, IMP y ETP. Sin embargo, no encontramos aislado bacteriano resistente a estos antibióticos testados.

1. CONCLUSIONES

1. *Escherichia coli* fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia, seguido por *Proteus sp*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*.
2. El 39% de las *Enterobacterias* analizadas fueron productoras de BLEE, siendo *E. coli* el principal microorganismo representativo. El gen codificador para enzimas BLEE tipo CTX-M, fue el más frecuente identificado entre los aislados bacterianos.
3. Para CTX-M, se encontró que CTX-M-1 fue el grupo principal y CTX-M-15 el gen específico que codifica para esta betalactamasa presente en todos los aislados. Para SHV, se identificó el gen específico SHV-1, para OXA se encontró el gen OXA-1 y para TEM su gen específico fue TEM-1.

10. RECOMENDACIONES

Dado a las dificultades e inquietudes encontradas en la realización de este trabajo podemos recomendar lo siguiente:

- ✓ Ampliar este tipo de estudios no solamente a nivel local sino que también en otros departamentos del país, de manera que podamos aislar *E. coli* multirresistentes y que producen BLEE, de manera que se le pueda realizar un análisis clonal fenotípico mediante el sistema PenePlate (PhP) o genético por Amplificación aleatoria de AND polimórfico (RAPD-PCR) que indique si un mismo clon o diferentes clones de *E. coli* multirresistentes están afectando a la población Nicaragüense.

- ✓ Indagar más en el tema de las enfermedades renales no solo desde el punto de vista microbiológico sino que bioquímico/toxicológico, dado que en la actualidad las enfermedades renales van en aumento desconociendo su origen y que drásticamente los pacientes terminan con un diagnóstico de insuficiencia renal crónica (IRC).

11. REFERENCIAS

1. **Akram M, Shahid M, Khan AU.** Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. *Ann of Clin Microbiol and 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, Yousef J.** Urinary Tract Infections: Bacteriology and Antibiotic Resistance Patterns. *Indian Pediatr.* 2009 Jul; 46(7):617-20.
4. **Centro Nicaraguense de Farmacoepidemiología.** Elección de antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas. León. 2008.
5. **Abraham EP, Chain E.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.*1940:146; 837.
6. **Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K.** Extended spectrum betalactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med.* 2008; 28:401-12.
7. **Pfeifer Y, Cullik A, Witte W.** Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *J Med Microbiol.* 2010: 300; 371–379.
8. **Perez F, Endimian A, Hujer KM, Bonono R.** The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7:459–469.
9. **Winokur PL, Canton R, Casellas JM, 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(Suppl. 2):94-103.

- 10. Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, 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
- 11. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, 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.
- 12. Salas R, Sancho J.** Resistencia bacteriana a los antibióticos en infecciones del tracto urinario bajo en pacientes de consulta externa en el área de Palmares J. *Fármacos.* 2004; 17: 1-2.
- 13. Amaya EJ.** Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria affecting children from León, Nicaragua [Tesis doctoral] Estocolmo. Karolinska Institutet. 2010
- 14. Matute AJ, Hak E, Schurin C, MacArthur A, Alonso E, Paniagua M y col.** Resistance of uropathogens in symptomatic urinary tract infections in León, Nicaragua. *J Antimicrob Agents.* 2004; 23: 506–509
- 15. Bours PHA, Polak R, Hoepelman AIM, Delgado E, Jarquin A, Matute AJ.** Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. *J Infect Dis.* 2010; 14.
- 16. Pérez C, Pérez J.** Frecuencia de genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de β -lactamasas aisladas de urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios de los municipios de León y Juigalpa. [Tesis para optar al título de Licenciado en Bioanálisis Clínico]: UNAN-León; 2010.
- 17. Gonzales M, Medina A.** Caracterización fenotípica y Molecular de Enterobacterias aisladas de urocultivos en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la

UNAN-León. [Tesis para optar al título de Licenciado en Bioanálisis Clínico]: Junio-
Octubre 2012.

18. **Andreu A, Alos J.** Etiology and antimicrobial susceptibility among uropathogens causing community acquired lower urinary tract a nationwide surveillance study infections. *J Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23: 4-9.
19. **Mandell G.** Principles and Practice of Infectious Diseases. *J Infect Dis.* 2005; 1: 881-3.
20. **Alós J.** Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *J Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23(4):3-8.
21. **Chambers H.** Principios generales de la antibioticoterapia. undecima ed. Hill MG, editor. España 2007.
22. **Murray P.** Microbiología Médica 5^{ta} Edición. Elsevier España, S.A. 2006.
23. **Madigan MT, Martinko JM, Parker J.** Biology of Microorganism. 10 edition. Prentice-Hall editorial. 2005.
24. **Brooks FG, Butler JS, Jawetz E, Melnick JL, Ornston LN, Alderberg EA.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Alderberg. 15^a Ed Manual moderno. México.
25. **Flores J.** Farmacología Humana.3ra Ed.Masson.1997.España.
26. **Blanc V.** Caracterización de cepas y de plásmidos de Enterobacteriaceae portadores de betalactamasas de espectro extendido [Tesis Doctoral]. Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona. 2007.
27. **Mandell D, Bennetts.** Principles & Practice of Infectious Diseases 5th.Churchill Livingstone. 2000.

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

38. **Mosqueda-Gomez y cols.** 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.
39. **Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B.** Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clin Microbiol Newsletter*. 2009; 31:8.
40. **Queenan AM Bush K.** Carbapenemases: the Versatile Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 440–458.
41. **Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonono MD, Rice LB y col.** 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.
42. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum betalactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48 (1): 1-14.
43. **Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C.** The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14:33-41.
44. **Pitout JDD, Laupland KB.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 159-66
45. **Peirano G, Pitout JDD.** Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M beta-lactamases: .the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *J Antimicrob Agents*. 2010; 35:316–321.
46. **Canton R, Coque TM.** The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 5:466-75.

47. **Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B.** Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clin Microbiol Newsletter*. 2009; 31:8.
48. **Queenan AM Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 440–458.
49. **Jacoby GA.** AmpC Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 161–182.
50. **Thomson KS.** ESBL, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1019-1025.
51. **Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS.** Harrison: Principles of Internal Medicine. McGraw Hill. 2008.
52. **Ennglerberg NC, Dirita V, Dernoty TS.** Mechanisms of microbial disease. 4 ta Edición. Lippincott Williams and Wilkins. 2007.
53. **Lee JBL, Neild GH.** Urinary tract infection. *Medicine* 2007;35; 423-428.
54. **Canton R, Novais A.** Prevalence and Spread of Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *J Clin Microbiol Infect*. 2008;14(1); 144-53.
55. **Pitout JDD.** Infections with Extended-Spectrum beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Changing Epidemiology and Drug Treatment Choices. *Drugs*. 2010; 70:313-333.
56. **Clinical y Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved Standard—Ninth Edition. M2-A9, vol. 26. CLSI. 2007.
57. **Passarge E.** Color Atlas of Genetics 2nd. Editorial Thieme. 2001.

- 58. CNDR/MINSA.** Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica Edición 2004. MINSA. Managua. 2004.
- 59. Seral C, Pardos M, Castillo F.** Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(Supl 1):12-18.
- 60. Famiglietti y cols.** Consenso sobre pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en enterobacterias. *Revista argentina de microbiología.* 2005; 37:57-66.
- 61. Dalenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G.** Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important betalactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65, 490-5.
- 62. Villegas M, Guzman B, Sifuentes O, Rossi F.** Increasing prevalence of extended spectrum-betalactamases among gram-negative bacilli en Latin America-2008 update from the study of monitoring antimicrobial resistance trends (Smart). *J infect Dis* 2011 ; 15 :34-9.
- 63. Tabbouche S, Khudary R, Beyrouthy R, Dabboussi F, Achkar M, Mallat H y cols.** Detection of genes TEM, OXA, SHV and CTX-M in 73 clinical isolates of *Escherichia coli* producers of extended spectrum Beta-lactamases and determination of their susceptibility to antibiotics. *iMedPub Journals*, 2011; 1: 1-5.
- 64. Romero L, López L, Rodriguez J, Hernández J, Pascual A.** Long term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum betalactamases. *Clin Microbiol and Infect.* 2005 ; 11: 625-31.
- 65. Eftekhari F, Rastegar M.** Detection of extended-spectrum betalactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in relation to *Bla* and *Bla* genes carriage. *J public Health.* 2012 ; 41: 127-32.

- 66. Rodríguez-Baño J, Alcalá J, Cisneros JM.** *Escherichia coli* producing SHV-typed extended-spectrum betalactamases in a significant cause of community acquired infection. J Antimicrob Chemother. 2009 ; 63: 781-784.
- 67. Oteo J, Pérez M, Campos J.** Extended-spectrum betalactamases producing *Escherichia coli* : changing epidemiology and clinical impact. Curr Opin In Infect Dis. 2010 ; 23 : 320-326.
- 68. Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND.** Phenotypic and molecular detection of CTX-M-betalactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella sp.* J Clin Microbiol. 2004 ; 42: 5715-2.
- 69. Tarnberg M.** Extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae : aspects on detection, epidemiology and multi-drug resistance. Linköping University medical dissertations. 2002-2007. No. 1300. page 28-29.
- 70. Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Euro Surveill. 2008. 13(47)

2. ANEXO

Número de código:

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PERSONAS MAYORES DE 18 AÑOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, LEON
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Mediante la firma de este documento, Yo _____ doy mi consentimiento voluntariamente para donar una muestra de orina y ser entrevistado por un colaborador de un estudio de infecciones del tracto urinario y resistencia antibacteriana, que se desarrollaran en el departamento de microbiología y parasitología de la UNAN-León. Entiendo que la entrevista está relacionada con la sintomatología clínica, así como las características epidemiológicas de las infecciones del tracto urinario en el municipio de León.

Entiendo que fue elegido para participar en este estudio, y la donación de una muestra de orina contribuirá al entendimiento del comportamiento clínico, epidemiológico y fisio-patológico de las principales enterobacterias que causan infecciones del tracto urinario en Nicaragua, así como, el establecimiento de diagnóstico y tipificación molecular de bacterias antibióticos resistente, la cual permitirá en el futuro el fortalecimiento de los programas de prevención de las infecciones del tracto urinario.

Se me ha informado que los responsables de este estudio no están obligado a cubrir los costos médicos de esta enfermedad, y que los resultados de los análisis de laboratorio me serán proporcionados por los colaboradores de este estudio en el caso que yo los solicitara y que puedo requerir información adicional en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León (Tel: 2311-0022 ext-2077).

He concedido libremente una muestra de orina y esta entrevista a un colaborador de este estudio. Se me ha notificado totalmente voluntario y que aún después de iniciado puedo rehusarme a responder cualquier pregunta o decir darla por terminado en cualquier momento. Se me ha dicho que las repuestas a las preguntas no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificara de forma alguna.

Nota: en caso que el paciente sea menor de 18 años se requerirá el permiso de consentimiento dado por el tutor del menor.

Firma del entrevistado: _____ fecha: ___/___/___/

Firma del entrevistador: _____ fecha: ___/___/___/

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA-LEON
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE ENFERMEDADES INFECCIOSA

Fecha de la toma de muestra: ___/___/___/

Código Campo: /___/___/___/ - MA

Código Laboratorio (identificador): /___/___/___/

DATOS GENERALES

Nombres y Apellidos:

Fecha de Nacimiento: /___/___/___/ Género: Masculino: /___/ Femenino: /___/

Edad: (años): /___/ (meses): /___/ peso (lbs): /___/

Esta embarazada: SI___ NO___ Cuanto tiempo___

Es sexualmente activo(a) SI___ NO___

Procedencia: Urbana: /___/ Rural: /___/

Dirección:

_____/

Localidad: /_____/

DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGICOS:

Ha tenido infecciones del tracto recurrente SI___ NO___

Cuántas veces en un año _____

Signos y Síntomas asociados: Nauseas: /___/ Vómito: /___/ Fiebre (>38°C): /___/ Pérdida de Apetito: /___/ Calambre Abdominal: /___/ Dolor en la parte baja de la espalda: /___/ Cistitis: /___/ Disuria: /___/

Ha sido hospitalizado en los últimos 3 meses:

SI___ NO___

Cuantos días___

Porque fue hospitalizado_____ fue cateterizado(a) SI___ NO___

Cuanto tiempo estuvo cateterizado(a) _____

En su hogar, existe algún familiar que haya tenido o tenga infección de las Vías Urinarias
 SI: /___/ NO: /___/; en respuesta SI, pregunte parentesco: /_____/

Fuente de agua para el consumo del hogar:

Agua de grifo _____

Agua de pozo _____

Agua de río _____

Otras _____

Tratamiento Antibiótico en los últimos 3 meses: SI: /___/ NO: /___/; en caso de respuesta SI complete lo siguiente:

Tipo de antibiótico: Trimetoprim-Sulfametoxazole: /___/ Amoxicilina-ácido clavulánico: /___/

Ampicilina: /___/ ciprofloxacina: /___/ Cloranfenicol: /___/ Gentamicina: /___/ Imipenem: /___/

Otros: /_____/

OBSERVACIONES: _____

RESULTADOS DE LABORATORIO:

Examen de Urocultivo

Resistencia bacteriana a los antibióticos en caso de ser BLEE positivo

ESBL	R-I-S	BLEE (+)	R-I-S	Meropenem (+) CPE	R-I-S
Meropenem		Ampicilina		Temocilina	
Gentamicina		Amikacina		Imipenem	
Ciprofloxacina		Clistin sulfate		Ertapenem	
Trimetoprim sulfametoxazole		Acido nalidíxico		Aztreonam	
Nitrofurantoin				Cefoxitina	
Cefoxitina					

Resistente= R

Intermedio= I

Sensible= S

Nombre y firma del Colector de Muestra Fecha: /___/ ___/_____/ **Hora:** /___/

Nombre y firma del que Recibe Muestra (Lab) Fecha: /___/___/___/ **Hora:** /___/