

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**CARRERA BIOANÁLISIS CLÍNICO**



**Trabajo de tesis**

**Para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis**

**Caracterización Fenotípica y Molecular de  
*Enterobacterias* aisladas de urocultivos en el  
Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la  
UNAN-León, Junio-Octubre 2012**

**Autoras:**                    **María Hortencia González Cadena**  
                                      **Anielka Azucena Medina Escoto**

**León, Julio 2014**

*“A la libertad por la Universidad”*



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**CARRERA BIODIAGNÓSTICO CLÍNICO**



**Trabajo de tesis**

**Para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis**

**Caracterización Fenotípica y Molecular de  
*Enterobacterias* aisladas de urocultivos en el  
Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la  
UNAN-León, Junio-Octubre 2012**

**Autoras:** María Hortencia González Cadena  
Anielka Azucena Medina Escoto

**Tutores:** Dr. Erick Amaya Mayorga. Ph.D  
Profesor Titular del Departamento de Microbiología UNAN-León

Dr. Daniel Reyes Navarrete. MD., M.Sc, Ph.D  
Profesor Titular del Departamento de Microbiología UNAN-León

**León, Julio 2014**

*“A la libertad por la Universidad”*

## **DEDICATORIA**

A nuestros familiares y amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por permitirnos cumplir nuestras metas y a nuestras familias por su apoyo incondicional.

A nuestros tutores Dr. Erick Amaya y Dr. Daniel Reyes, por su apoyo, colaboración y disponibilidad en la realización de este trabajo.

## RESUMEN

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las enfermedades más comunes en mujeres jóvenes a nivel mundial, muchos microorganismos pueden ser causa de ITU, pero el agente más frecuente es *Escherichia coli*. En los últimos años se ha producido un aumento de las tasas de resistencia de estos microorganismos frente a los antimicrobianos utilizados habitualmente. Por lo antes descrito, se realizó un estudio descriptivo de corte transversal para determinar los patrones Fenotípicos y de Resistencia Antimicrobiana en Enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, Junio-Octubre 2012.

La identificación bacteriana, el estudio de resistencia y el tamizaje para la detección de BLEE se realizaron mediante metodología convencional siguiendo las recomendaciones del CLSI y MINSAL. Se realizó caracterización bioquímica y molecular a las bacterias productoras de BLEE, mediante el sistema PhP-RE y PCR.

Se obtuvieron 50 urocultivos positivos. El microorganismo que se aisló con mayor frecuencia fue *E. coli* (64%), seguido de *Klebsiella spp* (16%), *Proteus spp* (12%), *Acinetobacter spp* (6%) y *Enterobacter spp* (2%). La resistencia de *E. coli* para Ciprofloxacina fue de 60%, Trimetoprim-Sulfametoxazol, 56.6%, Ceftriaxona 50%, Ceftazidima 43.3%. El 38% (n=19) de los aislados bacterianos fueron productores de BLEE, estos exhibieron 9 patrones de resistencia, siendo el más frecuente CAZ+CRO+SXT+CIP+NIT+GM (26.3%).

La expresión de genes que codifican para enzimas BLEE se detectó en el 78.9% de los aislados bacterianos (15/19), de los aislados positivos para cualquiera de estos genes, el 100% (n=15) codificaba para la enzima tipo CTX-M, el 46.6% (7/15) para TEM, el 33.3% (5/15) para OXA y el 13.3% (2/15) SHV. El 53.3% de los aislados bacterianos analizados codificó solo para la enzima tipo CTX-M, el 13.3% codificó para enzimas CTX-M/TEM, el 20% codificó para enzimas CTX-M/TEM/OXA y el 13.3% para CTX-M/TEM/SHV/OXA.

De las bacterias positivas para enzima CTX-M, el 86.6% (13/15), fueron de tipo CTX-M-1, el 6.7% (1/15) CTX-M-2.

*E. coli* se agrupó en 2 fenotipos comunes (n=8) y 5 no comunes. Sin embargo el primer fenotipo común que agrupó 6 aislados de *E. coli* mostró variabilidad respecto a la expresión de genes de resistencia bla<sub>BLEE</sub>.

Palabras claves: infección del tracto urinario, *Escherichia coli*, resistencia bacteriana, Betalactamasa de espectro extendido, genes bla<sub>BLEE</sub>.

## INDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	I
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	II
<b>RESUMEN</b> .....	III
<b>INDICE</b> .....	IV
<b>ABREVIATURAS/CONCEPTOS DE TÉRMINOS</b> .....	V
1 Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación .....	5
2 Planteamiento del Problema.....	6
3 Objetivos .....	7
3.1 General.....	7
3.2 Específicos .....	7
4 Marco Teórico .....	8
4.1 Etiología de las infecciones del tracto urinario.....	8
4.2 Principios generales de la antibiòticoterapia .....	8
4.2.1 Antibiótico betalactámico .....	9
4.3 Mecanismo de resistencia bacteriana.....	9
4.2.1 Betalactamasas.....	11
4.3 Epidemiología.....	14
4.4 Métodos de detección de BLEE.....	16
4.4.1 Técnicas confirmatorias de BLEE .....	17
4.4.2 Caracterización Molecular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés: PCR, Polymerase Chain Reaction)...	18
4.4.3 Identificación bioquímica de Bacterias por Sistema PhenePlate (PhP)	19
5 Materiales y Métodos .....	20
5.1 tipo y área de estudio .....	20
5.2 período y muestreo de estudio .....	20
5.3 Criterios de selección e Identificación bacteriana.....	20
5.4 tipificación bioquímica mediante método php-re .....	21
5.5 Caracterización de genes codificadores de BLEE .....	22
5.6 Aspectos Éticos del estudio .....	26
5.7 Análisis de los Datos .....	26
6 Resultados .....	28
7 Discusion.....	34
8 Conclusiones .....	37
9 Recomendaciones.....	38
10 Referencias .....	39

## ABREVIATURAS/CONCEPTOS DE TÉRMINOS

Abreviatura	Descripción
ITU	Infección del tracto urinario
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
BLEA	Betalactamasa de espectro ampliado
PhP	Sistema PhenePlate
CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorios
MINSA	Ministerio de salud
UCI	Unidad de cuidados intensivos
HEODRA	Hospital Escuela Doctor Oscar Danilo Rosales Arguello
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
PBPs	Proteínas fijadoras de penicilinas
ATCC	American Type Culture Collection
UFC	Unidad formadora de colonia
CMI	Concentración mínima inhibitoria

## 1 INTRODUCCION

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las enfermedades más comunes en mujeres jóvenes a nivel mundial, el 60% de las mujeres experimenta al menos un episodio durante su vida. <sup>(1)</sup> La morbilidad por ITU urinario adquiridas en la comunidad es alta y el tratamiento inicial de esta enfermedad generalmente es empírico. <sup>(2, 3)</sup>

Muchos microorganismos pueden ser causa de ITU, pero los agentes habituales son las bacterias gram-negativas, de la familia *Enterobacteriaceae* entre ellos el más frecuente es *Escherichia coli* que origina alrededor del 80-90% de las infecciones. La resistencia creciente de los microorganismos causantes de ITU frente a los antibióticos de primera línea y la aparición de cepas resistentes productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en la comunidad es motivo de gran preocupación. <sup>(4)</sup>

Las cepas con BLEE tienen distribución mundial. Durante un tiempo el problema estuvo centrado, sobre todo, en hospitales, las especies en las que más frecuentemente se encontraban eran *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y los principales tipos enzimáticos pertenecían a las familias TEM y SHV. Esta situación ha cambiado de forma drástica en la última década, en la que se han comenzado a aislar de forma cada vez más frecuente cepas productoras de BLEE en el medio extrahospitalario, habiéndose observado un crecimiento enorme de las  $\beta$ -lactamasas de la familia CTX-M y describiéndose además en otras especies como *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp.* <sup>(5)</sup>

En Nicaragua hay pocas investigaciones que indiquen la prevalencia de bacterias productoras de betalactamasas y los genes asociados en la producción de estas enzimas. Entre esos estudios, el realizado por Pérez, C. y cols., para detectar la frecuencia de genes bla en bacterias gram-negativas, aisladas en urocultivos de pacientes ambulatorios de León y Juigalpa, encontraron la presencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub> (1/30), *bla*<sub>CTX-M</sub> (11/30) y de *bla*<sub>TEM</sub>/*bla*<sub>CTX-M</sub> (10/30), confirmándose que un 73.3% (22/30) eran cepas productoras de BLEE. <sup>(6)</sup> Cabe destacar que no se han realizado estudios similares en otros departamentos con respecto a esta problemática de salud.

Tomando en cuenta el aumento de la resistencia bacteriana en nuestro medio, el presente trabajo pretende determinar los fenotipos bioquímicos, utilizando como herramienta un

método de tipificación bioquímico (PhP-microplate, <http://www.phplate.se>) y los patrones de resistencia antimicrobiana de Enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León. Esto se realizó según criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio [CLSI, por sus siglas en inglés].<sup>(7)</sup>

## 1.1 ANTECEDENTES

Los primeros casos de Enterobacterias productoras de BLEE fueron detectados en Europa, en Alemania e Inglaterra (1983), donde se detectó la variante SHV-2 en una cepa de *E. coli* en pacientes ingresados en la Unidad de cuidados intensivos (UCI), pero fue en Francia donde se detectó el primer brote nosocomial en 1986, se trató de una cepa de *K. pneumoniae* con la variante TEM-3, produciéndose un aumento dramático de los casos de BLEE en los años sucesivos en todo el mundo.<sup>(8)</sup>

Existe una gran diversidad geográfica dentro de Europa en cuanto a la prevalencia de BLEE, encontrándose Rusia con un 50% y Polonia con un 40%. La prevalencia de BLEE en Europa es más alta que en Estados Unidos pero más baja que en Asia y América del Sur.<sup>(9)</sup>

En un estudio multicéntrico realizado en España durante el año 2000 (proyecto GEIH-BLEE 2000) para determinar la prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadoras de BLEE en 40 hospitales españoles se constató que en *E. coli* las BLEE CTX-M-9, CTX-M-14 y SHV-12 constituían el 70% de las enzimas detectadas, mientras que en *K. pneumoniae* más del 50% fueron del tipo TEM.<sup>(10)</sup>

Estudios recientes obtienen para América latina la prevalencia más alta en el mundo de aislamientos para *K. pneumoniae* portadora de BLEE con un 45.4-51.9% y para *E. coli* de un 8.5-18.1%, existiendo variaciones dentro de los países que la forman, siendo los de mayor prevalencia Brasil y Chile.

Salas R. y cols, realizaron un estudio para evaluar la resistencia bacteriana a los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las ITUs en el área de salud de Palmares, Costa Rica en el año de 2004, demostrando que el agente etiológico más común fue la *E. coli* (74%), presentando resistencia a Nitrofurantoína (74%), Amoxicilina (45%), Trimetoprim-Sulfametoxazole (43%).<sup>(11)</sup>

Matute y cols., en su estudio realizado en el HEODRA, 2004, sobre resistencia antimicrobiana en uropatógenos, indican que el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *E. coli* (56%), resistente a Amoxicilina (74%), Trimetoprim-Sulfametoxazole

(63%), Ciprofloxacina (29%), Gentamicina (11%) y Amoxicilina/Ácido Clavulánico. (34%).<sup>(12)</sup>

Bours y cols., analizaron el perfil de resistencia de uropatógenos en el HEODRA y centros de atención primaria de salud de León, en 2010, muestran que el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *E. coli* (48.8%), presentando resistencia a la Ampicilina (61.4%), Cefalotina (45.4%), Trimetoprim-Sulfametoxazol (38.6%), Ciprofloxacina (31.8%), Ceftriaxona (20.5%). Amikacina y Nitrofurantoína fueron los únicos medicamentos a los que más del 90% de las bacterias fueron sensibles. El 29.5% de *E. coli* aisladas en este estudio, fueron sospechosas de producir BLEE.<sup>(13)</sup>

Un estudio realizado por Pérez, C. y cols., en el año 2010, para la detección de la frecuencia de genes en bacterias gram-negativas productoras de BLEE en 110 pacientes ambulatorios de León y Juigalpa, encontraron la presencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub> (1/30), *bla*<sub>CTX-M</sub> (11/30) y de *bla*<sub>TEM</sub>/*bla*<sub>CTX-M</sub> (10/30), confirmándose que un 73.3% (22/30) eran cepas productoras de BLEE.<sup>(6)</sup>

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

La resistencia bacteriana es un problema actual, dado el número creciente de microorganismos que han desarrollado multirresistencia a una amplia gama de antimicrobianos, que compromete el tratamiento de pacientes implicados en infecciones nosocomiales y comunitarias.

Durante las últimas décadas, se han descrito enzimas que aumentaron la resistencia a fármacos  $\beta$ -lactámicos, entre ellas las  $\beta$ -lactamasas 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  $\beta$ -lactámicos en las cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Debido al aumento del fracaso terapéutico en las infecciones por microorganismos productores de Betalactamasas, principalmente *E. coli*, *Proteus spp* y *Klebsiella spp*, es relevante examinar la frecuencia de estos tipos de  $\beta$ -lactamasas para limitar un manejo correcto y racional de la terapia antibiótica prescrita.

A nivel nacional se han realizado pocas investigaciones sobre el tema, por lo antes descrito, este estudio tomo interés en caracterizar fenotípica y molecularmente Enterobacterias aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León.

## **2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Cuál es el patrón fenotípico y de resistencia antimicrobiana de Enterobacterias productores de betalactamasas aisladas de urocultivos en pacientes ambulatorios que asistieron al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León durante el periodo de Junio-Octubre 2012?

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL**

Determinar Patrones Fenotípicos y de Resistencia Antimicrobiana en Enterobacterias aisladas en urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, Junio-Octubre 2012

#### **3.2 ESPECIFICOS**

1. Identificar los aislados bacterianos en las muestras de estudio, empleando la metodología convencional.
2. Determinar el patrón de resistencia y producción de enzimas BLEE en los aislados bacterianos, mediante el método Kirby-Bauer.
3. Caracterizar el fenotipo bioquímico de los aislados bacterianos productores de BLEE, utilizando el sistema PhP-RE.
4. Identificar presencia de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> por la técnica de PCR en los aislados bacterianos positivos para BLEE.

## 4 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.<sup>(14)</sup>

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.<sup>(15)</sup>

### 4.1 ETIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO.

La etiología de las ITUs, 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 etología exógena por microorganismos introducidos en las vías urinarias durante su manipulación.<sup>(14)</sup>

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.<sup>(16)</sup>

### 4.2 PRINCIPIOS GENERALES DE LA ANTIBIÓTICOTERAPIA

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

- a) Inhibición de la síntesis de la pared celular:  $\beta$ -lactámicos, Fosfomicina, Cicloserina, Vancomicina y Bacitracina.<sup>(17)</sup>
- b) Desorganización de la membrana citoplasmática, lo que conduce a la desintegración celular: Polimixina, Anfotericina B, Nistatina.<sup>(17)</sup>

- 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.<sup>(17)</sup>
- d) Interferencia en la síntesis y en el metabolismo de los ácidos nucleicos: Rifampicina (ARN-polimerasa dependiente de ADN), Fluoroquinolonas (ADN-girasa), Metronidazol y antivíricos.<sup>(17)</sup>
- e) Antimetabolitos que bloquean la síntesis del ácido fólico: Sulfamidas, Sulfatos, Pirimetamina y Trimetoprim.<sup>(17)</sup>

#### **4.2.1 Antibiótico betalactámico**

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

Se ha empleado una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos 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  $\beta$ -lactámicos es interferir en la síntesis de Peptidoglicano, un componente de la pared bacteriana.<sup>(19)</sup>

#### **4.3 Mecanismo de resistencia bacteriana**

Se entiende por resistencia bacteriana la condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. La resistencia puede estar mediada por genes cromosómicos o material extracromosómico (DNA plasmídico).<sup>(20)</sup>

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no asociados con el incremento de la dosis del antibiótico.<sup>(20)</sup>

La resistencia adquirida aparece por mutación, por el contrario los plásmidos y transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias. La transferencia de este material genético se realiza a través de diversos mecanismos como son la transformación, conjugación y transducción.<sup>(21)</sup>

En el primero se dan casos tales como la transformación de una betalactamasa en una BLEE o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo.<sup>(21)</sup>

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción.

➤ Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana:

Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos ( $\beta$ -lactámicos) o alteran los sistemas de transporte (Aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.<sup>(22)</sup>

➤ Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a  $\beta$ -lactámicos). Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos, y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos.<sup>(22)</sup>

➤ Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las  $\beta$ -lactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas.<sup>(22)</sup>

### **4.2.1 Betalactamasas**

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, constituyendo el mecanismo más común de resistencia en contra de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.<sup>(23)</sup>

Las  $\beta$ -lactamasas son la mayor defensa de las bacterias gram-negativas frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Son enzimas responsables de la mayor parte de los fracasos terapéuticos debido a que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico, inactivándolo. En las bacterias gram-negativas, las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas, pueden ser constitutivas o inducibles.<sup>(24)</sup>

#### **4.2.1.1 Clasificación de las Betalactamasas**

El esquema de Ambler divide a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro grupos mayores (A-D). La base de este esquema de clasificación recae sobre la homología de las proteínas (similitud de aminoácidos) y no en las características fenotípicas. A la vez en este esquema de clasificación de  $\beta$ -lactamasas las clases A, C y D son  $\beta$ -lactamasas con residuos de serina. En contraste, las enzimas de clase B son 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  $\beta$ -lactamasas que son clínicamente relevantes.<sup>(25)</sup>

#### **4.2.1.2 Producción de betalactamasas**

Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma de las bacterias o en segmentos de ADN extracromosómico, denominados plásmidos los cuales son los responsables de la diseminación de la mayor parte de las  $\beta$ -lactamasas. Los genes que codifican algunas  $\beta$ -lactamasas son transportados por transposones y muchos genes son encontrados en integrones, los cuales a menudo incluyen genes que confieren resistencia a otros antibióticos.<sup>(24)</sup>

Las principales  $\beta$ -lactamasas responsables de la resistencia en los bacilos gram-negativos son las  $\beta$ -lactamasas inducibles AMPC (clase c) y las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de amplio espectro y BLEE de clase A.<sup>(26)</sup>

#### **4.2.1.3 Betalactamasas cromosómicas**

Muchas bacterias gram-negativas poseen  $\beta$ -lactamasas cromosómicas que podrían derivar de las penicillin binding proteins (PBP) con las que comparte alguna homología. Su origen sería debido a la presión selectiva ejercida por los  $\beta$ -lactámicos sobre microorganismos del suelo encontrados en el ambiente.<sup>(27)</sup> Las betalactamasas cromosómicas pueden ser de producción constitutiva (alto o bajo nivel) o inducible.<sup>(28)</sup>

Algunos microorganismos poseen  $\beta$ -lactamasas antes del uso de los antibióticos como AmpC de Enterobacterias. La razón de ello podría ser que estas enzimas juegan un papel importante en la síntesis del peptidoglicano y defienden a la bacteria frente a otras bacterias y hongos.<sup>(26)</sup>

*E. coli* posee una  $\beta$ -lactamasa AmpC constitutiva de bajo nivel la cual no contribuye a la resistencia frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Por el contrario, *Pseudomona aeruginosa* y otras Enterobacterias principalmente *Enterobacter aerógenes* presentan una  $\beta$ -lactamasa AmpC inducible. La producción de AmpC en ausencia del antibiótico inductor se mantiene en un estado reprimido y prácticamente no se produce debido a la acción de los genes reguladores (ampR, ampD, ampE, ampG). En presencia del antibiótico inductor estos mismos genes permiten la expresión de la enzima, lo que se denomina estado “desreprimido reversible”. Puede suceder que mutaciones en los genes reguladores provoquen la expresión de grandes cantidades de la enzima constitutiva es el denominado estado “desreprimido estable”, estos mutantes son resistentes a cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefamicinas, penicilinas de amplio espectro e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.<sup>(26)</sup>

#### **4.2.1.4 Betalactamasas plasmídicas**

En general las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas son diferentes a las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas, pero en algunos casos existe un solapamiento, como por ejemplo en el caso de SHV-1 que normalmente es una  $\beta$ -lactamasa plasmídica pero en *K. pneumoniae* es cromosómica y la AmpC que puede presentarse en plásmidos.<sup>(24, 29)</sup>

Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas incluyen las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, las  $\beta$ -lactamasas resistentes a los inhibidores, las cefamicinas, AmpC y las Carbapenemasas.<sup>(24)</sup>

#### **4.2.1.5 Betalactamasas de amplio espectro BLEA**

Dentro de este grupo están incluidas TEM-1, TEM-2, SHV-1 y las de tipo OXA. Las  $\beta$ -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 pertenecen a la clase molecular A y son inhibidas por el Ácido Clavulánico. Presentan actividad frente a Bencilpenicilinas, amino-, carboxi- y ureido-penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido (Cefazolina, Cefalotina, Cefuroxima, Cefamandol). Ninguna de estas  $\beta$ -lactamasas hidroliza cefalosporinas de tercera generación, Cefamicinas, Monobactams o Carbapenems.<sup>(24,30)</sup>

#### **4.2.1.6 Betalactamasas de espectro extendido BLEE**

Son enzimas que hidrolizan a las cefalosporinas de espectro extendido que contienen una cadena lateral oximino; entre las que están incluidas la ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y también el aztreonam. No actúan sobre cefamicinas ni carbapenems. Son inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas como el sulbactam o tazobactam.<sup>(31)</sup>

Estas enzimas de configuración plasmídica producidas por bacilos gram-negativos, principalmente Enterobacterias, en concreto *E. coli* y *K. pneumoniae*, también pueden aparecer en bacilos no fermentadores y otras Enterobacterias. Derivan de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1), pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medieros; cuando estas sufren mutaciones (el hecho de que se produzca un cambio de uno o más aminoácidos implica una apertura del sitio activo del enzima permitiendo un mayor acoplamiento de la gran cadena lateral del  $\beta$ -lactámico) en el centro activo dan lugar a estas otras BLEE, que hidrolizan a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos, clasificándose en el subgrupo 2be (clase molecular A); no todas las BLEE pertenecen al grupo 2be, ya que algunas oxacilinasas (OXA), que pertenecen al grupo 2d (clase molecular D), son BLEE.<sup>(31, 32)</sup>

A parte de las TEM y SHV en 1989 se describió otro tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M, derivan de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de especies del género *Kluyvera*, pertenecen

a la clase molecular A y son resistentes a cefotaxima, Cefuroxima, cefepima y en menor medida a ceftazidima.<sup>(33)</sup>

Las cepas productoras de BLEE son con frecuencia resistentes a otros grupos de antimicrobianos, incluyendo aminoglucósidos y fluoroquinolonas.<sup>(34)</sup> La resistencia a aminoglucósidos está relacionada, sobre todo, con la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA). La secuenciación de integrones completos que contienen genes que codifican BLEE (en particular CTX-M) y EMA ha permitido comprobar, en estudios realizados en Francia y en Chile, que los genes más frecuentemente identificados han sido aac (6')-Ibyaac (3)-IIa.<sup>(35)</sup>

La resistencia a quinolonas en cepas que producen BLEE se explica, en parte, por mutaciones en *gyrA* solas o asociadas a mutaciones en *parC*. Además, en *K. pneumoniae* (y presumiblemente en otras Enterobacterias) las cepas BLEE positivas acumulan trastornos de la permeabilidad por pérdida de porinas con más frecuencia que las cepas BLEE negativas, y cuando la pérdida de dichas porinas es completa las cepas también hiperexpresan con frecuencia un mecanismo de expulsión activa de quinolonas.<sup>(36)</sup>

Finalmente, múltiples estudios recientes indican que algunas cepas BLEE positivas contienen genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos, que contribuyen al fenotipo de resistencia observado.<sup>(36)</sup>

### **4.3 Epidemiología**

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.<sup>(37)</sup>

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-Sulfametaxazol, 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.<sup>(37)</sup>

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 casos de CTX-M, PER, TEM, SHV y OXA, 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%.<sup>(37)</sup>

En Nicaragua información referente a la prevalencia de bacterias Gram-negativas multirresistentes y productoras de BLEE es escasa. Sin embargo es importante indicar que el Ministerio Nacional de Salud posee un sistema de vigilancia en algunos departamentos del país para la detección de BLEE, no así de los genes que lo producen, sin embargo no ha habido un reporte oficial hasta la fecha de hoy. Entre las publicaciones que abordan este problema en Nicaragua, Amaya y col., en su estudio de resistencia antimicrobiana en bacterias 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 Argüello (HEODRA), de León, indican que la mayoría de estos patógenos fueron altamente resistentes y con una alta prevalencia de producción de TEM, SHV y CTX-M. Además, se encontraron clones similares de *K. pneumoniae* multirresistentes y productores de BLEE que afectaron a los neonatos y que también fueron aislados del ambiente.<sup>(38)</sup>

Otro ejemplo es el de Matute y col., en su estudio sobre resistencia antimicrobiana en uropatógenos, indican que *E. coli* (56%), *Klebsiella spp.*(18%), *Enterobacter spp.*(11%), *Proteus spp.*(3%) fueron los microorganismos más aislados; siendo *E. coli* resistente a

amoxicilina (74%), trimetoprim-sulfametoxazole (63%), ciprofloxacina (29%), gentamicina (11%) y amoxicilina-ácido clavulánico (34%).<sup>(12)</sup>

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%).<sup>(13)</sup>

En un estudio realizado por Pérez, C. y cols., en el año 2010, para la detección de la frecuencia de genes en bacterias gram-negativas productoras de BLEE en 110 pacientes ambulatorios de León y Juigalpa, se encontró que el 27.3% (30/110) de las bacterias estudiadas fueron productoras de  $\beta$ -lactamasas, así mismo, se determinó la presencia de los genes *bla*TEM (1/30), *bla*CTX-M (11/30) y de *bla*TEM/*bla*CTX-M (10/30).<sup>(6)</sup>

#### **4.4 Métodos de detección de BLEE**

Las técnicas para la detección de las BLEE van de lo simple con aspectos fenotípicos hasta las pruebas complejas moleculares de geno-detección específica.<sup>(39, 40)</sup>

El CLSI ha establecido recomendaciones para el tamizaje y confirmación de BLEE en *E. coli* y *Klebsiella spp* <sup>(6)</sup>. Sin embargo, a pesar de que no han sido estandarizados los métodos por parte del CLSI para detectar BLEE en otros microorganismos Gram negativos, estas técnicas han sido adaptadas por los microbiólogos a otros gérmenes de importancia clínica. Básicamente, las pruebas para la detección de BLEE se agrupan en las de tamizaje inicial y las de confirmación. El CLSI ha aprobado las pruebas fenotípicas de tamizaje de difusión de disco y confirmatorias de CMI.<sup>(39, 41, 42)</sup>

Existen diferentes técnicas mediante las cuales se pueden deducir la presencia de una BLEE, los que se basan en la capacidad del ácido clavulánico (AC) para incrementar la actividad de una cefalosporina de 3 generación (CF3G) gracias al efecto inhibitorio que este compuesto ejerce sobre las BLEE.<sup>(43)</sup>

El método de difusión y su aplicación al estudio de sinergia entre CF3G y AC descrito por Jarlier et al, consiste en efectuar una prueba de susceptibilidad a CF3G, colocando discos conteniendo estos antimicrobianos y un discos con AC (en su defecto, un disco con amoxicilina/ ácido clavulánico), a una distancia razonable (20mm). Si la cepa ensayada resulta ser productora de una BLEE, se produce incremento del halo de inhibición en la zona de interconexión entre las CF3G y AC.<sup>(43)</sup>

En ocasiones puede ser difícil visualizar el efecto sinérgico. En aquellos casos en los que se observa resistencia a una CF3G y la prueba de sinergia resulta ser negativa, puede encontrarse presente una betalactamasas del tipo IRT o, en su defecto, las cepas bacterianas ensayadas pueden poseer otro mecanismo de resistencia, por ejemplo impermeabilidad.<sup>(43)</sup>

#### **4.4.1 Técnicas confirmatorias de BLEE**

**Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).** Esta técnica utiliza las cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima) con la adición de una concentración de 4 µg/ml de ácido clavulánico; una disminución en la CMI de  $\geq 3$  diluciones dobles de ceftazidima y cefotaxima en combinación con el ácido clavulánico comparada con la CMI de las cefalosporinas sin el inhibidor confirma la producción de BLEE.<sup>(39, 44)</sup>

**Etest (prueba Epsilon) Beta-ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden).** Son tiras impregnadas de antibióticos, poseen una excelente sensibilidad y especificidad para detectar y confirmar las BLEE. Actualmente el uso de la tira cefepime y cefepime/ácido clavulánico es útil conjuntamente con las tiras ceftazidima y ceftazidima/ ácido clavulánico y cefotaxima y cefotaxima/ ácido clavulánico para detectar la producción de BLEE en microorganismos productores de enzimas AmpC. Esto debido a que esta cefalosporina es muy estable a la hidrólisis de las enzimas AmpC, y el sinergismo con el ácido clavulánico puede observarse en las cepas productoras de AmpC y BLEE. La utilización de las tiras Etest® presentan algunas veces dificultades de interpretación por la producción de zonas fantasmas ocasionadas por las bajas CMI expresadas a las cefalosporinas y la difusión del ácido clavulánico hacia el lado de la tira que contiene la cefalosporina sin el inhibidor. A pesar de ser la prueba más fácil de usar para detectar las BLEE, su uso rutinario en los laboratorios clínicos es limitado por su alto costo.<sup>(39, 45)</sup>

#### **4.4.2 Caracterización Molecular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés: PCR, Polymerase Chain Reaction)**

El desarrollo de métodos moleculares rápidos de alta sensibilidad y especificidad como la tecnología del PCR, que permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento de ADN específico ha mejorado el tiempo y la precisión del diagnóstico de determinantes de resistencia a antibióticos.<sup>(46, 47)</sup>

La PCR estándar es un método rápido de amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas dentro de una muestra. La amplificación requiere de un mínimo de información sobre la secuencia del ADN objetivo. Esta información permite la construcción de dos oligonucleótidos (oligos), habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, complementarios de los extremos 3' de la secuencia diana, que actuarán como cebadores (iniciadores, en inglés primers) en la reacción.<sup>(48)</sup>

La PCR es una reacción en cadena porque las hebras de ADN de nueva síntesis sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis en ciclos posteriores. Tras unos 30 ciclos, la PCR habrá generado aproximadamente un millón de copias de la secuencia diana específica. Una vez amplificado, puede ser caracterizado. El análisis de los fragmentos se realiza por electroforesis en gel y son detectados como bandas discretas de un tamaño específico.<sup>(48)</sup>

Cada ciclo involucra tres etapas, que comprenden: desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra a 93-95°C, unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases a temperaturas que varían entre 50 y 70°C, dependiendo de la  $T_m$  (temperatura de fusión) del dúplex esperado y la síntesis de ADN típicamente a 70-75°C, utilizando una ADN polimerasa termoestable (a partir de microorganismos que viven en fuentes calientes como el *Thermophilus aquaticus*, del cual proviene la taq polimerasa).<sup>(48)</sup>

##### **4.4.2.1 Detección de los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>OXA</sub>* por PCR múltiple.**

La PCR múltiple 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<sup>(47)</sup>

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

#### **4.4.3 Identificación bioquímica de Bacterias por Sistema PhenePlate (PhP)**

La caracterización bioquímica en biotipos para diferenciar cepas en función de la capacidad de fermentar un determinado número de carbohidratos (manitol, trealosa, lactosa, ramnosa, sorbitol), o degradar determinados aminoácidos (lisina, ornitina, arginina u otros) que ponen de manifiesto ante la presencia de determinados enzimas como la  $\beta$ -D-glucuronidasa.<sup>(49)</sup>

Relacionado con este tipo de clasificación en biotipos, se han descrito numerosos sistemas automatizados que resultan rápidos y sencillos de realizar. Una variante de este sistema es la técnica de fenotipado bioquímico conocida como PhenePlate System (PhPlate—<http://www.phplate.se>), que se basa en la clasificación de diferentes aislamientos (grupos fenotípicos, clones) bacterianos en función de la capacidad y cinética de degradación de los diferentes substratos analizados.<sup>(50)</sup>

Es un sistema automatizado para subtipificación de bacterias, que ha permitido diferenciar grupos poblacionales de bacterias en diferentes partes del mundo, así como dar seguimientos a rutas potenciales de infecciones. Con este método también ha permitido realizar estudio con grandes números de aislamientos bacterianos, que asociado a la automatización han ayudado a obtener datos preliminares sobre la identificación y tipificación rápida de las poblaciones, siendo también un método útil en estudios epidemiológicos. Además, este sistema permite desarrollar investigaciones ecológicas donde la población completa de bacterias es caracterizada, encontrando la diversidad en cada población y la similaridad entre diferentes poblaciones.<sup>(50)</sup>

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 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).

### **5.2 PERÍODO Y MUESTREO DE ESTUDIO**

Durante el periodo comprendido entre Junio- Octubre 2012, se logró captar un total de 150 muestras de orinas obtenidas de pacientes con sospecha de infección del tracto urinario que asistieron a realizarse estudio microbiológico, el muestreo se realizó mediante una selección no probabilística por conveniencia. A todas las muestras de orina (n=150) se les realizó el cultivo bacteriológico (Agar sangre y Agar MacConkey), con incubación a 37°C durante 24h.

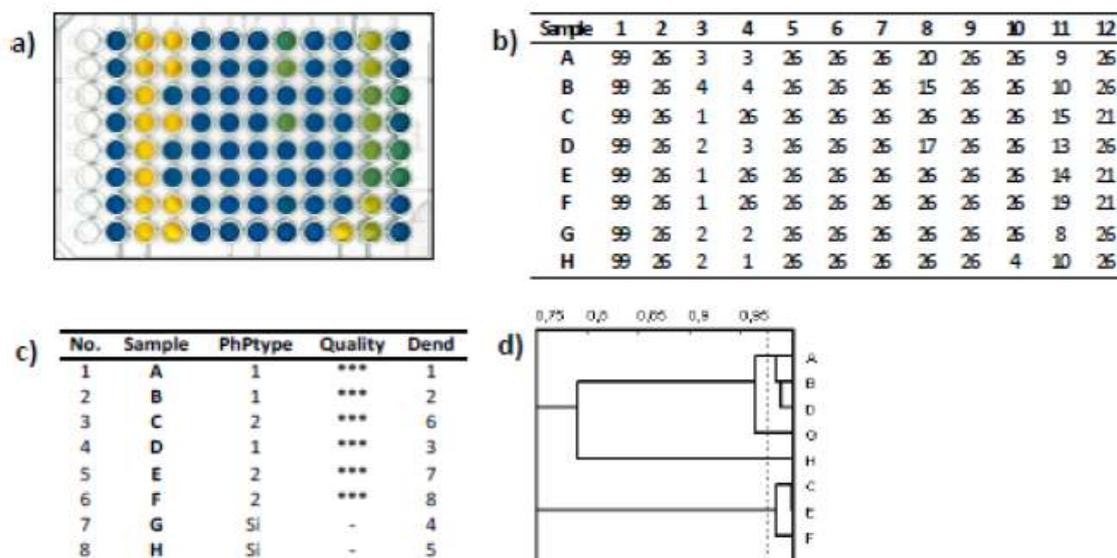
### **5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA**

Se tomaron en consideración todo cultivo bacteriológico positivos para Enterobacterias (n=50), presentando un recuento igual o mayor de  $10^5$  UFCs/ml, en cultivo con un solo tipo de colonia, además de cultivos con 2 o más tipo colonias en las que el recuento total sobrepasa  $10^5$  UFCs/ml, pero que individualmente cada grupo tiene un recuento mayor a  $10^2$  UFCs/ml<sup>(7, 51)</sup>. Las cuales fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales según las recomendaciones descritas en el manual de procedimientos bacteriológicos del MINSA<sup>(7, 51)</sup>.

A todos los aislados se les realizó prueba de susceptibilidad antimicrobiana para los antibióticos Ceftacidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Nitrofurantoína (NIT), Gentamicina (GM), Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT) y Ciprofloxacina (CIP). utilizando el método de Kirby-Bauer y considerando las recomendaciones del CLSI y del MINSA<sup>(7, 51)</sup>. Así mismo se realizó la búsqueda de aislado productores de enzimas betalactamasas (BLEE); esto se realizó mediante el método de triple disco, utilizando dos cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona y ceftazidima) más Amoxicilina/Ácido Clavulánico (AMC) según las recomendaciones del CLSI y del MINSA<sup>(7, 51)</sup>. AMC solo se utilizó para la detección fenotípica de BLEE, no se evaluó su susceptibilidad. A las bacterias productoras de BLEE también se les evaluó su susceptibilidad a Amikacina (AK), Ácido nalidixico (NAL), Colistín (CL) y Carbapenems (Imipenem, IPM y Meropenem, MEM). Un total de 19 aislados fueron identificados como productores de BLEE, los cuales fueron almacenados en caldo cerebro corazón con glicerol al 20% a 4°C para su posterior análisis.

## 5.4 TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA MEDIANTE MÓTODO PHP-RE

La determinación de fenotipos bioquímicos se realizó por el método de PhP-RE (Phene-Plate, <http://www.phplate.se>), de acuerdo al procedimiento descrito por manufactura. Este sistema consiste en unidades de microplacas que contienen 96 pocillos con 11 reactivos deshidratados, puestos en paralelos en un total de 8 filas permitiendo un alto nivel de discriminación bioquímica entre los aislados bacterianos. (Figura 1).



**Figura 1.** Ejemplo de tipificación con el sistema PhP, reacciones e imágenes al análisis: **a)** Reacciones de 8 aislados bacterianos ante 11 reactivos (2-12) en microplacas PhP-RE; **b)** Cuantificación de las reacciones que presentan el patrón bioquímico de cada aislado ensayado (A-H). Contenido de pocillos (columnas 1-12, en su orden respectivo): pocillo de inoculación, Celobiosa, Lactosa, Rhamnosa, Deoxyribosa, Sucrosa, Sorbosa, Tagarosa, D-Arabitol, Raffinosa, Gal-Lactona, Ornitina. **c)** Lista de fenotipos obtenidos (PhP); **d)** Representación gráfica (dendograma) de los aislados A-H de cada muestra. Adaptado de Reyes, D.<sup>(52)</sup>

### Procedimiento del método utilizando el sistema PhP-RF

1. Preparación del medio de suspensión conteniendo 0.1% de peptona, 0.0016M de buffer fosfatado y 0.011% de azul de bromotimol (PhenePlate; <http://www.phplate.se>).
2. Se dispensa 350  $\mu$ l del medio en la primera columna (pozos de inoculación) y 150 $\mu$ l en el resto de los otros pocillos del plato.
3. Inoculación de colonias bacterianas (seleccionadas aleatoriamente una colonia para cada pocillo) en la primera columna de cada microplaca.

4. Transferencia de 15µl de la suspensión bacteriana de la primera columna a las columnas conteniendo los reactivos de prueba, Posteriormente, todas las microplacas fueron colocadas en cámara húmeda (utilizamos contenedor plástico con tapa y papel toalla humedecida) e incubadas a temperatura de 37°C.
5. Realización de las mediciones colorimétricas de las reacciones bioquímicas generadas por cada aislado bacteriano, durante el período de incubación (16, 40 y 64 horas). Utilizando un Escáner (HP-Scanjet 4389), para capturar imágenes, que fueron convertidas a datos numéricos, utilizando un sistema automatizado de computación (PhPWin-Software versión 6.0; <http://www.phplate.se>).
6. Análisis de datos (lecturas obtenidas de cada aislado bacteriano), para agrupar a los aislados de Enterobacterias con un coeficiente de similitud superior o igual a 0,975 dentro de grupo fenotípico específico.

Los aislados que mostraron iguales patrones bioquímicos se les asignaron el nombre de Fenotipos Comunes (FBc) y a los que no presentaron similitudes con ninguno de los aislados se denominaron Singles o no comunes (FBsi).

## **5.5 CARACTERIZACIÓN DE GENES CODIFICADORES DE BLEE**

Todos los aislados con producción de BLEE previamente guardados (n=19), fueron recultivados en medios de agar MacConkey para realizar suspensiones de aislados bacterianos y caracterizados utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y el sistema PhP-RE.<sup>(7, 51)</sup>

### **Detección de genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> mediante PCR múltiple**

#### **Extracción de ADN**

Para este proceso se realizó una suspensión de colonia en 500µl de PBS 1X estéril, para una densidad 4 de MacFarland y hervidas durante 20 minutos a 100°C, seguidamente fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 3 minutos para sedimentar los restos celulares, utilizando el sobrenadante como muestras de ADN para la realización del PCR.

La detección de genes codificantes de BLEE, se realizó utilizando cebadores universales, siguiendo el procedimiento descrito por Fang et al.<sup>(53)</sup>(Tabla 1). Como control positivo para la

detección de los genes se utilizó una cepa previamente analizada en este estudio (muestra 4, *Klebsiella spp*).

**Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección de genes que codifican para betalactamasas de espectro extendido.**

<b>Objetivo</b>	<b>Secuencia (5´-3´)</b>	<b>Producto</b>
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	f: CTT TAT CGG CCC TCA CTC AA r: AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG	273pb
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	f: CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA r: ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT	445pb
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	f: ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC r: TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG	593pb
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	f: ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C r: AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC	813pb

Para la amplificación del ADN bacteriano se preparó una mezcla de reacción de 25 µl con puReTaqReady-To-Go PCR Beads (GE Healthcare UK). Cada mezcla de reacción consistía en 2 µl de lisado bacteriano, 20 µl de agua milliQ y 0.5 µl de cada cebador a 10 µM para una concentración final de 0.2µM. (Tabla 2).

La amplificación por PCR se realizó con las siguientes condiciones de termociclado: 95°C por 5 minutos , 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 6°C por 90 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos. (Figura 2A).

Para la detección de los grupos *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-8</sub> se realizó PCR única, siguiendo el procedimiento descrito por Pitout et al <sup>(54)</sup> (Tabla 3).

Tabla 2. Mezcla para PCR para la detección de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Material	μL por reacción	Concentración final
<i>bla</i> <sub>CTX-Mf</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
<i>bla</i> <sub>CTX-Mr</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
<i>bla</i> <sub>TEMf</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
<i>bla</i> <sub>TEMr</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
<i>bla</i> <sub>SHVf</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
<i>bla</i> <sub>SHVr</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
<i>bla</i> <sub>OXAf</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
<i>bla</i> <sub>OxAr</sub> 10 μM	0.5	0.2 μM
Agua MilliQ	19	
ADN bacteriano	2	
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>	

Tabla 3. Cebadores utilizados para la detección de grupos específicos para genes *bla*<sub>CTX-M-1, 2, 9 y 8</sub>.

Objetivo	Secuencia (5'-3')	Producto
<b>CTX-M Grupo 1</b>	f: GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC r: AGC CG C CGA CGC TAA TAC A	499pb
<b>CTX-M Grupo 2</b>	f: GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C r: CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	351pb
<b>CTX-M Grupo 9</b>	f: GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG r: GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG	474pb
<b>CTX-M Grupo 8</b>	f: CGC TTT GCC ATG TGC AGC ACC r: GCT CAG TAC GAT CGA GCC	307pb

Para la amplificación del ADN bacteriano se preparó una mezcla de reacción de 25  $\mu$ l con puReTaqReady-To-Go PCR Beads. Cada mezcla de reacción consistía en 2  $\mu$ l de lisado bacteriano, 19  $\mu$ l de agua milliQ y 2  $\mu$ l de cada cebador a 10  $\mu$ M para una concentración final de 0.8 $\mu$ M. (Tabla 4).

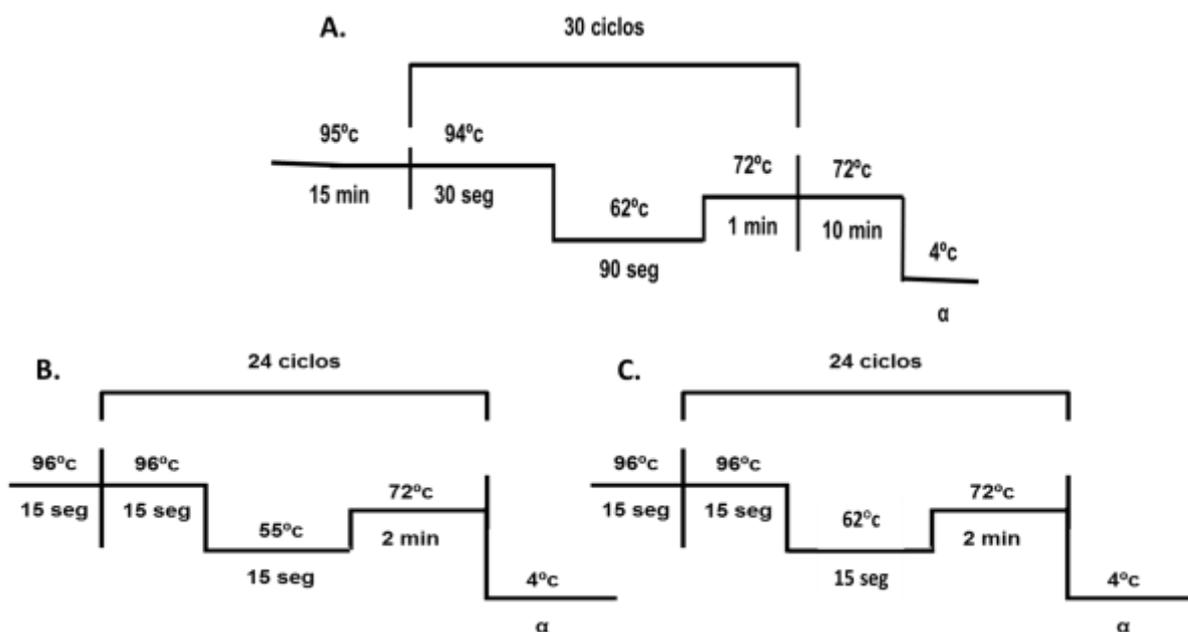
**Tabla 4. Mezcla de PCR para a detección de grupos específicos *bla*<sub>CTX-M-1, 2, 9 y 8</sub>.**

<b>Material</b>	<b><math>\mu</math>L por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Cebador f 10 <math>\mu</math>M</b>	2	0.8 $\mu$ M
<b>Cebador 10 <math>\mu</math>M</b>	2	0.8 $\mu$ M
<b>Agua MilliQ</b>	19	
<b>ADN bacteriano</b>	2	
<b><i>Volumen total</i></b>	<b>25</b>	

La amplificación por PCR para grupos específicos de *bla*<sub>CTX-M</sub> se realizó con las siguientes condiciones de termociclado: 96 $^{\circ}$ c por 15 segundos, 24 ciclos de 96 $^{\circ}$ c por 15 segundos, 55 $^{\circ}$ c por 15 segundos, excepto para *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (62 $^{\circ}$ c por 15 seg) 72 $^{\circ}$ c por 2 minutos y una extensión final de 72 $^{\circ}$ c por 10 minutos. (Figura 2B-C).

El equipo que se utilizó fue el DNA ThermalCyclerGeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los productos de PCR amplificados se sometieron a electroforesis en un ge de agarosa al 1.5% en 1X tampón TAE, usando el marcador de peso molecular de 100 pb (New England Biolab), fue expuesto a luz ultravioleta y fotografiado para su posterior análisis.



**Figura 2.** Programa de amplificación. **A)** *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>. **B)** Grupos específicos de *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, 2 y 8. **C)** Grupo específico CTX-M-9.

## 5.6 ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO

Este estudio fue dirigido al cultivo bacteriológico, solo se consideró el consentimiento verbal del paciente para acceder a información (edad, género, tratamiento antimicrobiano previo). No hubo intervención invasiva para la toma de muestra y solo 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.

## 5.7 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Estadística descriptiva. Los datos se procesaron en programas de computación: Whonet versión 5.6, PhP-Win versión 6.0, Excel para Windows, SPSS versión 15.0 para Windows; La información se agrupó en tablas y gráficos de acuerdo a la distribución de variables.

## Operacionalización de variables

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

## 6 RESULTADOS

Durante el periodo Junio-Octubre 2012, se logró captar un total de 150 muestras para urocultivos, obteniendo crecimiento bacteriano positivo para Enterobacterias en el 33.3% de las muestras analizadas, en el 66.7% no hubo crecimiento bacteriano. Los urocultivos positivos fueron en su mayoría, de pacientes entre las edades de 16-70 años (rango, 9 meses a 73 años). El 88% de los aislados bacterianos provenían de muestras del género femenino. El microorganismo que se aisló con mayor frecuencia fue *E. coli* (64%), seguido de *Klebsiella sp.* (16%), *Proteus sp.* (12%), *Acinetobacter spp.* (6%) y *Enterobacter spp.* (2%) (Tabla 5).

El análisis de resistencia antimicrobiana se realizó mediante el método de Kirby-Bauer, los aislados de *E. coli* (n=32) mostraron altos porcentajes de resistencia frente a los antibióticos testados, CIP (60%), SXT (56.6%), CRO (50%) y CAZ (43.3%). Los aislados de *Klebsiella spp.* (n=8) fueron altamente resistentes a NIT (71.2%). *Proteus spp.* mostró resistencia a CAZ, CRO, CIP (80% para cada antibiótico) y NIT (60%). Los aislados de *Acinetobacter spp.* mostraron resistencia a NIT (100%), el aislado de *Enterobacter spp.* fue susceptible a todos los antibióticos testados. El porcentaje de microorganismos que presentaron multiresistencia fue de 52% (26/50) (Tabla 5).

El tamizaje para la detección de bacterias productoras de BLEE se realizó mediante el método de triple disco (CAZ+AMC+CRO), permitiendo identificar la producción de estas enzimas en el 38% de las bacterias analizadas (19/50), siendo todas estas bacterias sensibles a los Carbapenems evaluados (IPM, MEM) (Tabla 5).

En las bacterias productoras de BLEE se observaron 9 patrones: CAZ+CRO+SXT, CAZ+CRO+CIP+GM, CAZ+CRO+SXT+CIP, CAZ+CRO+SXT+GM, CAZ+CRO+CIP+GM+NIT, CAZ+CRO+SXT+CIP+NIT, CAZ+CRO+SXT+CIP+GM, CAZ+CRO+SXT+CIP+NIT+GM y CAZ+CRO+SXT+CIP+GM+CT, siendo el más prevalente CAZ+CRO+SXT+CIP+NIT+GM (26.3%) (Tabla 6).

A todos los aislados bacterianos que fueron identificados como productores de BLEE se les realizó la caracterización de patrones bioquímicos y detección de *bla*-genes que codifican para la producción de enzimas CTX-M, TEM, SHV y OXA.

Tabla 5. Características de la población, Distribución de Enterobacterias y su Perfil de Resistencia

Características	Enterobacterias n=50(%)					Total n=50 (%)	BLEE n=19 (%)
	<i>E. coli</i>	<i>Proteus spp</i>	<i>Klebsiella spp</i>	<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Enterobacter spp</i>		
<b>Género</b>							
Femenino	28 (56)	5 (10)	7 (14)	3 (6)	1 (2)	44 (88)	15 (78.9)
Masculino	4 (8)	1 (2)	1 (2)			6 (12)	4 (21.1)
<b>Grupo etareo</b>							
≤15 años	1 (2)	1(2)			1 (2)	3 (6)	
16-50 años	14 (28)	2 (4)	3 (6)	3 (6)		22 (44)	7 (36.8)
51-70 años	13 (26)	2 (4)	5 (10)			20 (40)	8 (42.1)
>70 años	4 (8)	1 (2)				5 (10)	4 (21.1)

Microorganismos	Perfil de Resistencia Antibióticos* (%)						BLEE n=19 (%)
	CAZ	CRO	SXT	CIP	GM	NIT	
<i>E. coli</i> (n=32)	43.3	50	56.6	60	33.3	10	13 (40.6)
<i>Klebsiella spp</i> (n=8)	28.5	28.5	42.2	42.2	14.2	71.2	2 (25)
<i>Proteus spp</i> (n=6)	80	80	60	80	40	60	4 (66.7)
<i>Acinetobacter spp</i> (n=3)						100	
<i>Enterobacter spp</i> (n=1)							

Microorganismos	Perfill de resistencia de bacterias productoras de BLEE a antibióticos de segunda elección Antibióticos** (%)			
	AK	NAL	IPM	MEM
<i>E. coli</i> (n=13)	50	60		
<i>Klebsiella spp</i> (n=2)		50		
<i>Proteus spp</i> (n=4)	100	100		

\*CAZ, Ceftriaxona; CRO, Ceftriaxona; CIP, Ciprofloxacino; GM, Gentamicina; NIT, Nitrofurantoína; SXT, Trimetoprim-Sulfametoxazol.

\*\*AK, Amikacina; NAL, Ácido nalidixico; IPM, Imipenem; Meropenem

Tabla 6. Patrones de Resistencia Antimicrobiana.

Patrones de Resistencia	N=19	%
CAZ+CRO+SXT	2	10.5
CAZ+CRO+CIP+GM	1	5.3
CAZ+CRO+SXT+CIP	2	10.5
CAZ+CRO+SXT+GM	2	10.5
CAZ+CRO+CIP+GM+NIT	1	5.3
CAZ+CRO+SXT+CIP+GM	2	10.5
CAZ+CRO+SXT+CIP+NIT	3	15.8
CAZ+CRO+SXT+CIP+NIT+GM	5	26.3
CAZ+CRO+SXT+CIP+GM+CT	1	5.3

El estudio para la identificación de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> se realizó mediante PCR múltiple. La expresión de genes que codifican para enzimas BLEE se detectó en el 78.9% (15/19), siendo el 21.1% (4/19) negativos para los genes estudiados. De los aislados positivos para cualquiera de estos genes, el 100% (n=15), codificaban para la enzima tipo CTX-M, el 46.6% (7/15) para la enzima tipo TEM, el 33.3% (5/15) para OXA y el 13.3% (2/15) para SHV. (Figura 3A)

El 53.3% de los aislados bacterianos analizados codificó solo para la enzima tipo CTX-M, el 13.3% codificó para enzimas CTX-M/TEM, el 20% codificó para enzimas CTX-M/TEM/OXA y el 13.3% para CTX-M/TEM/SHV/OXA (Tabla 7).

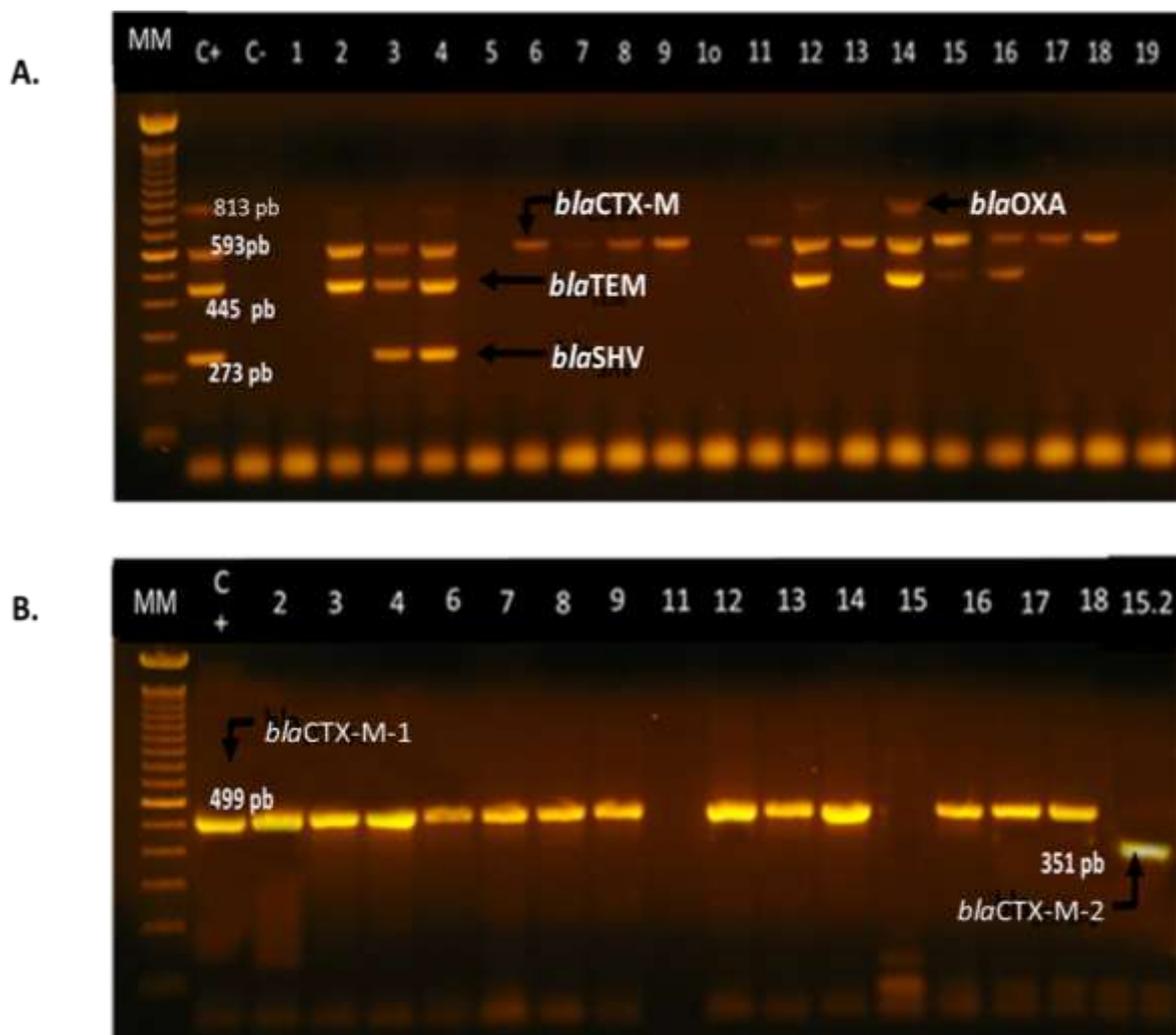
Tabla 7. Distribución de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> en los aislados bacterianos analizados.

Genes expresados	Frecuencia (%)	Enterobacterias		
		<i>E. coli</i>	<i>Proteus spp</i>	<i>Klebsiella spp</i>
CTX-M	8 (53.3)	5	3	
CTX-M/TEM	2 (13.3)	1	1	
CTX-M/TEM/OXA	3 (20)	3		
CTX-M/TEM/SHV/OXA	2 (13.3)			2

A todos aquellos aislados bacterianos positivos en el PCR múltiple para la producción de enzimas CTX-M (n=15), se les realizó PCR para la detección de grupos específicos *bla*<sub>CTX-M-1, 2, 9 y 8</sub>. Los resultados muestran que el 86.6% (13/15) pertenecen al grupo CTX-M-1, el 6.7% (1/15) fue positivo para CTX-M-2, y el 6.7% (1/15) fue negativo para los grupos estudiados. Ninguna cepa fue positiva para genes *bla*<sub>CTX-M</sub> grupo 8 y 9. (Figura 3B).

En relación a la caracterización bioquímica, mediante el sistema PhP-RE, los aislados de *E. coli* (13/19) se agruparon en 2 grupos fenotípicos comunes (FBc) y 5 no comunes o independientes (FBsi). Aunque se observaron 2 fenotipos comunes en patrones bioquímicos, el primer fenotipo común que agrupó 6 aislados de *E. coli*, presentó variabilidad en la producción de genes de resistencia *bla* (Figura 4).

Los aislados de *Klebsiella spp* (2/19) presentaron diferentes patrones bioquímicos, sin embargo la expresión de genes *bla* observada fue común para ambos aislados. Relacionado a los aislados de *Proteus spp* (4/19), fueron agrupados en un fenotipo común, mostrando similitud en los genes que expresaron (Figura 4).



**Figura 3. Ensayo de PCR para genes productores de enzimas betalactamasas.**

**A) PCR múltiple para genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>.** MM, marcador de peso molecular (100pb); c+, control positivo; c-, control negativo; carril 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, cepas que albergan el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> (593 pb). Carril 2, 3, 4, 12, 14, 15 y 16, cepas que albergaron el gen *bla*<sub>TEM</sub> (445 pb). Carril 2, 3, 4, 12 y 14, cepas que albergaron el gen *bla*<sub>OXA</sub> (813 pb). Carril 3 y 4, cepas que presentaron el gen *bla*<sub>SHV</sub> (273 pb). Carril 1, 5, 10 y 19 fueron negativos para los genes examinados. **B) PCR para grupos específico del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>:**MM, marcador de peso molecular (100 pb) C+, control positivo grupo 1; Carril 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16, 17 y 18, cepas positivas para *bla*<sub>CTX-M</sub> grupo 1 (499 pb); Carril 15.2, cepa cód. 15 positiva para grupo 2 (351 pb). Carril 11 fue negativo para los grupos investigados.

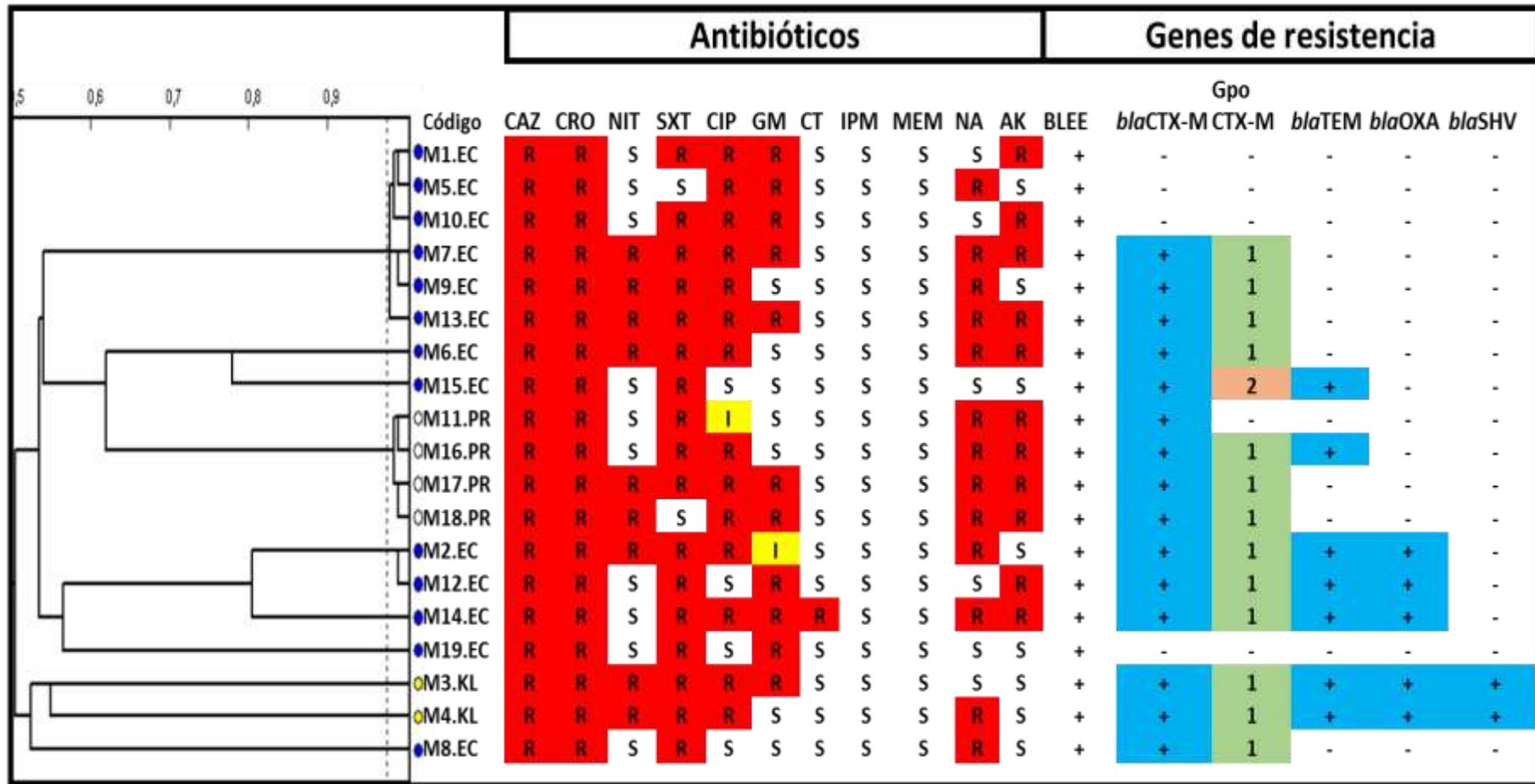


Figura 4. Distribución de aislados bacterianos productores de BLEE, utilizando el sistema PhP-RE. La figura muestra los patrones y genes de resistencia antimicrobiana. La línea punteada vertical indica el nivel de identidad que fue determinado por la reproducibilidad del método (ID=0.975) para encontrar fenotipos similares y/o idénticos. Los círculos azules representan los aislados de *E. coli* (EC) los blancos *Proteus spp* (PR), y los amarillos *Klebsiella spp* (KL).

## 7 DISCUSION

En nuestro estudio el mayor número de aislamientos bacterianos provenían de muestras del género femenino (88%), siendo *E. coli* (64%) el microorganismo más frecuente, seguido de *Klebsiella spp* (16%) y *Proteus spp* (12%). Estos resultados son similares a los referidos en diversas literaturas, p ej. Andreu y cols, en su estudio de Etiología de la ITU Adquirida en la Comunidad reportó que el 80.3% de los aislados bacterianos analizados provenían del sexo femenino, siendo *E. coli* la más frecuente (70.8%), seguida de *Klebsiella spp* (6.8%) y *Proteus spp* (6.6%).<sup>(55)</sup>

La resistencia antibiótica es actualmente un problema de importancia para la salud pública, debido al uso generalizado e inadecuado de los diferentes antibióticos, los uropatógenos generalmente sensibles han ido desarrollando resistencia antibacteriana.<sup>(56,57)</sup>

Las altas tasas de resistencia contra SXT se ven como un problema mundial porque este antibiótico es usado como primera línea en tratamiento de las ITU. Los estudios de América latina muestran altas tasas de resistencia no sólo a SXT, sino también a otros como CIP.<sup>(14, 58-60)</sup>

Se observó una resistencia de *E. coli* a CIP de 60%, valor que se encuentra por encima a los encontrados en estudios realizados anteriormente por Matute y cols. en el 2004 (30%), y Bours y cols. en el 2010(31.8%)<sup>(12-13)</sup> lo que pudiese estar atribuido a la utilización de este antibiótico como tratamiento de primera línea ante la presencia de una ITU sin su respectivo antibiograma y a la presión selectiva que ha venido ejerciendo.<sup>(61)</sup>

La resistencia de *E. coli* a SXT fue de 56.6%, este porcentaje de resistencia difiere a los reportados por Matute y cols (64%) y Bours y cols (38.6%).<sup>(12-13)</sup>

La resistencia de *E. coli* observada para cefalosporinas de tercera generación fue alta, CAZ (43.3%) y CRO (50%), los resultados del estudio realizado por Gómez y cols, difieren al nuestro, ya que la resistencia observada en Cefalosporina de tercera generación fue muy baja (2.1%).<sup>(62)</sup>

Los aislados de *E. coli* mostraron resistencia baja a NIT (10%), independientemente de la presencia de mecanismos de resistencia que afectan a otros grupos de antimicrobianos, sin embargo la resistencia para este antibiótico observada en especies de *Klebsiella*, *Proteus* y *Acinetobacter* fueron altas. Esto se debe a que NIT es activa contra la mayoría de bacterias gramnegativas causantes de ITU, como *E. coli* y en menor grado frente a *Klebsiella spp.* no tiene buena actividad contra *Acinetobacter spp* y *Proteus spp*, puesto que esta bacteria al hidrolizar la urea, alcaliniza la orina e inactiva a la NIT. <sup>(63)</sup>

En los últimos años se ha detectado un aumento de Enterobacterias portadoras de BLEE en el ámbito comunitario. Nuestro estudio encontró que el 38% de las Enterobacterias aisladas fueron productoras de BLEE, *E. coli* (40.6%) y *Proteus spp* fueron los principales agentes, diversos estudios han reportado datos similares a los encontrados. Villegas y cols, 2011 en América Latina realizó la investigación SMART (Análisis de Seguimiento de Tendencias de Resistencia a los antimicrobianos) en el que se aislaron muestras en 10 países de América Latina encontrando que el 26.8% de *E. coli* y el 37.7% de *K. pneumoniae* eran productores de BLEE. <sup>(39)</sup>

Bours y cols, realizó 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. <sup>(13)</sup> Pérez y cols, en el año 2010, en su estudio de frecuencia de genes *bla*<sub>BLEE</sub> 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*. <sup>(6)</sup>

En el presente estudio los genes encontrados con mayor frecuencia fueron *bla*<sub>CTX-M</sub> (100%), seguido de *bla*<sub>TEM</sub> (46.6%) y *bla*<sub>OXA</sub> (33.3%). Aunque 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*<sub>CTX-M</sub> es el más frecuente en muchas partes del mundo, siendo responsable de epidemias nosocomiales y comunitarias por su rápida aparición y diseminación. <sup>(64)</sup> Nuestros hallazgos coinciden con los obtenidos por Eftekhar y cols, quienes reportaron que *bla*<sub>CTX-M</sub> fue el gen encontrado con mayor frecuencia (31.37%), <sup>(65)</sup>. Así mismo, Pérez y cols en su estudio de frecuencia de genes *bla*<sub>BLEE</sub> en enterobacterias, realizado en León y Juigalpa, reportaron la presencia de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>, siendo el más frecuente *bla*<sub>CTX-M</sub> (36.6%).

En nuestro estudio, las cepas que albergaron los cuatro tipos genes ( $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{OXA}$ ,  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$ ) correspondían a los 2 aislados de *Klebsiella spp.* Esta es una de las bacterias más comunes que muestra resistencia a múltiples antibióticos en el mundo y es productora de varios tipos de BLEE.<sup>(66)</sup>

Las enzimas tipo CTX-M-1 se encontraron en el 86.7% (n=13/15) de los aislados, de estos el 61.5% (n= 8/13) corresponden a *E. coli*, el 23.1% (n=3/13) a *Proteus sp.* y el 15.4% (n=2/13) a *Klebsiella spp.* Solamente un aislado bacteriano de *E. coli* codificó para la enzima CTXM-2 (7.7%). El predominio de enzimas tipo CTX-M-1, como vemos aquí, ha sido informado anteriormente por diversos estudios. Woodford E. y cols, encontraron que el 86.4% de los aislados estudiados codificaban para este tipo de enzima.<sup>(67)</sup> Pérez y cols, en su estudio de frecuencia de genes  $bla_{BLEE}$  en enterobacterias, realizado en León y Juigalpa reportaron que el 85.7% de las bacterias analizadas codificaban para enzimas tipo CTX-M-1 (de estos, el 88.8% correspondieron a *E. coli*) y el 16.6% codificó para enzimas CTX-M-2.<sup>(5)</sup>

En relación al estudio de caracterización bioquímica de los aislados de *E. coli*, se logró identificar un total de 7 grupos fenotípicos (2 comunes y 5 no comunes). Fenotipos que poseen una alta variabilidad, la cual fue demostrada por la heterogeneidad en la distribución de los aislados en varios grupos fenotípicos, un dato importante es la variabilidad respecto a la expresión de genes  $bla_{BLEE}$  observada en el primer fenotipo común que agrupó 6 aislados de *E. coli*, este resultado es de particular interés y podría deberse a que estos genes se encuentran en las Enterobacterias formando parte de integrones de clase I, que a su vez pueden ser movilizados en plásmidos o transposones, por lo que la expansión potencial de los mismos, no solo es de forma clonal, sino también entre distintas especies y géneros.<sup>(68)</sup>

Los aislados de *Klebsiella spp.*, mostraron patrones bioquímicos diferentes, sin embargo expresaron los mismos genes, posiblemente por la transferencia de genes intraespecie, lo cual, podría conducir a una rápida diseminación de estos genes entre los principales plásmidos que circulan en *Enterobacteriaceae*.<sup>(69)</sup>

## 8 CONCLUSIONES

1. *E. coli* fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia, mostrando un alto nivel de resistencia a los antimicrobianos evaluados, CIP (60%), SXT (56.6%), CRO (50%) y CAZ (43.3%).
2. El 38% de las bacterias analizadas fueron productoras de BLEE. El gen codificador para enzimas BLEE tipo CTX-M, fue el más frecuentemente identificado entre los aislados bacterianos.
3. Se identificaron 7 grupos fenotípicos de *E. coli*, 2 comunes y 5 no comunes, sin embargo se observó variabilidad respecto a los genes expresados. Para los aislados de *Klebsiella spp* se observaron patrones bioquímicos diferentes, pero expresaron los mismos genes de resistencia.

## **9 RECOMENDACIONES**

- Ampliar estudios a nivel local y en otras zonas del país, para conocer la prevalencia de bacterias productoras de BLEE, examinando la presencia de genes codificadores de estas enzimas, incluyendo cebadores para la detección de otros tipos de genes que no fueron ensayados en este estudio por razones económicas.

## 10 REFERENCIAS

1. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon.* 2003;49:53-70.
2. Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections: Transmission and risk factors, incidence and cost. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17:227-41.
3. Foxman B, Ki M, P B. Antibiotic resistance and pyelonephritis. *Clin Infect Dis* 2007;45:281-3.
4. Leal A, Cortés J, G A. Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporina de tercera generación en *Enterobacteriaceae* causantes de Infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica.* 2013;31:298-303.
5. Rodríguez J, Navarro M, Romero L, Martínez L, Muniain M. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Microbiol.* 2004;44:1089-94.
6. Pérez C, Pérez J. Frecuencia de genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas aisladas de urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios de los municipios de León y Juigalpa. [Tesis para optar a títulos de Bioanálisis Clínico]: UNAN-León; 2010.
7. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first international supplement 2011.
8. Paterson D. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-586.
9. Canton R, Novais A, et al. Prevalence and spread of extended spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *J Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):144-53.
10. Hernández J, Martínez L, Cantón R, Coque M, Pascual A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. *Spanish Group for Nosocomial Infections.* 2004.
11. Salas R, Rodríguez J. Resistencia bacteriana a los antibióticos en infecciones del tracto urinario bajo en pacientes de consulta externa en el área de Palmares *J Fármacos.* 2000; 17: 12-5.
12. Matute A, Hak E, Schurin C, MacArthur A, Alonso E, Paniagua M, et al. Resistance of uropathogens in symptomatic urinary tract infections in León, Nicaragua. *J Antimicrob Agents.* 2004; 23: 506-9.
13. Bours P, Polak R, Hoepelman A, Delgado E, Jarquin A, Matute A. 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: 770-4.

14. 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.
15. Mandell G. Principles and Practice of Infectious Diseases. *J Infect Dis*. 2005; 1: 881-3.
16. 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.
17. Chambers H. Principios generales de la antibioticoterapia. undecima ed. Hill MG, editor. España 2007.
18. Flores J. Farmacología Humana. 3 ed. España 1997.
19. Blanc V. Caracterización de cepas y de plásmidos de Enterobacteriaceae portadores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2007.
20. Bush K, Jacoby G. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *J Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 1211-33.
21. Marin M, Gudiol F. Beta-Lactam antibiotics. *J Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21: 42-55.
22. Jorgenser J. Antimicrobial Susceptibility testing. Special needs for Fastidious organism and difficult-to-detect resistance mechanisms. *J Clinical Infectious diseases*. 2000; 30: 799-808.
23. Ambler R. The structure of betalactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289: 321-31.
24. Jacoby G, Munoz Price. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005;352:380-91.
25. Paterson D, Bonomo R. Extended-Spectrum betalactamases. *Clin Microbiol*. 2005:657-86.
26. Levison M. Plasmid-mediated Extended-spectrum beta-Lactamases in Organisms Other Than *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: A Hidden Reservoir of Transferable Resistance Genes. *Curr Infect Dis Rep*. 2002;4:181-3.
27. Gupta V. An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res*. 2007;126:417-27.
28. Livernore D. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(557-581).
29. Mattew R. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. 1979;138:557-62.
30. Heritage M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44:309-18.
31. Paterson D. Extended-spectrum beta-lactamases. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003;24:79-88.
32. Philippon A. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33:1131-6.

33. Walther R. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Can J Microbiol.* 2004;48:137-65.
34. Martínez L, Hernández S, Alberti S, Tomás J, Benedi V, Jacoby G. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 1996;40:342-8.
35. Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-Resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:317-21.
36. Martínez L, Pascual A, Conejo M, García I, Joyanes P, Domenech A. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *J Antimicrob Chemother.* 2002;46:3926-32.
37. Canton R, Novais A. Prevalence and Spread of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. 2008.
38. Amaya EJ. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria affecting children from León, Nicaragua (Tesis doctoral) Estocolmo. Karolinska: Karolinska Institutet; 2010.
39. Villegas M, Guzmán B, Sifuentes O, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamases among gram-negative bacilli in Latin America- 2008 Update from the Study for Monitoring Antimicrobiol Resistance Trends (SMART). *J infect Dis* 2011;15:34-9.
40. Pacheco M, León E. Epidemiología de las Infecciones por Microorganismos productores de BLEE en el Hospital Vozandes Quito entre los años 2005-2009. *Rev Médica Vozandes.* 2011;22:15-21.
41. Cockerill F. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty First Informational Supplement. 2011;31.
42. Hawser S, Bouchillon S, Hoban D, Badal R, Po-Ren H. Emergence of high levels of extended-spectrum beta-lactamases - producing gram negative bacilli in the Asia pacific region: Data from the study for monitoring Antimicrobial Resistance trends (SMART) Program 2007. *Antimicrob Agents chemother* 2009;53:3280-4.
43. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10:867-78.
44. Hawser S, Bouchillon S, Hackel M, Hoban D, Badal R, Woodford N. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Intra-Abdominal Infections and Molecular Characterization of Ertapenem-Resistant Isolates. *Antimicrob Agents chemother.* 2011;55:3917-21.

45. Gaurav D. Prevalence of Extended Spectrum Betalactamases (ESBL) Producers among Gram negative Bacilli from Various Clinical isolates in a Tertiary Care Hospital at Jhalawar Rajasthan, India Clinical and Diagnostic Research. 2012;6:182-7.
46. Cartwright C. Techniques and diagnostics application of in vivo nucleic acid amplification. Clin Microbiol News. 1994;16:33-40.
47. Pérez C. Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a glucopéptidos en Enterococos en los hospitales de Canarias Santa Cruz de Tenerife: Universidad de la Laguna 2002.
48. Passarge E. Color Atlas of Genetics 2ed: Thieme; 2001.
49. Landgren M, Odén H, Kühn I. Diversity among 2481 *Escherichia coli* from women with community-acquired lower urinary tract infections in 17 countries. Rev Antimicrobial Chemotherapy. 2005:1-10.
50. Ahmed W, Tucker J, Bettelheim K. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic *E. coli* in surface waters. Rev Water Res. 2007;41:3785-91.
51. MINSA, CNDR, Bacteriología Dd. Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica. Nicaragua 2004.
52. Reyes D. *Escherichia coli* and Diarrhea in Nicaraguan Children. Suecia: Karolinska Institutet; 2010.
53. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated healthcare facilities from 2001 to 2006. J Clin Microbiol. 2008;46:707-12.
54. Pitout J, Hossain A, Hanson N. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* J Clin Microbiol. 2004;42:5715-22.
55. Andeu A, I P. Etiología de la Infección Urinaria baja Adquirida en la Comunidad y Resistencia de *E. coli* a los Antimicrobianos de primera línea. Estudio Nacional Multicéntrico. Med Clin. 2008;130:481-6.
56. Kiffer C, Mendes C, Oplustil C, Sampaio J. Antibiotic Resistance and Trend of Urinary Pathogens in General Outpatients from a Major Urban City J Urol. 2007;33:42-9.
57. Junquera S, Loza E, F B. Changes in the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from nosocomial versus community-acquired urinary tract infections. Microbiol Clin. 2005;23:197-201.
58. Alós J, Serrano M, Gómez-Garcés J, Perianes J. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. Clin Microbiol Infect. 2005; 11:199-203.
59. Garín L, Santos P, Álvarez S, Gelabert A. Evolución de la resistencia antibiótica en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Rev Clin Esp. 2005;205:259-64.

60. Andrade S, Sader S, Jones R, Perira A, Pignatori A, Gales A. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolates from urinary tract infection in latin América. Mem Inst Oswaldo, 2006.
61. Horcajada J, Fariñas M. Implicaciones de las resistencias bacterianas en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;23:1-3.
62. Gómez E, Plata S, Sejnau J, Villegas R, Clara L. Resistencia de la *E.coli* en urocultivos de pacientes con sospecha de infección urinaria intra y extra-hospitalaria en la Fundación Santa Fe de Bogotá. Urol Colom. 2009;18:53-8.
63. Mancuso C, Bagilet D. Eficacia y Seguridad De La Nitrofurantoína en el Tratamiento de las Infecciones Urinarias no Complicadas. Argentina: Hospital Escuela “Eva Perón”, 2011.
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 b-lactamases. Clinical Microbiology and Infection. 2005;11:625-31.
65. Eftekhari F, Rastegar M. Detection of Extended Spectrum B-Lactamases in Urinary Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Relation to Bla and Bla genes carriage. J Public Health. 2012;41:127-32.
66. Oteo J, Cuevas O, Lopez I, Banderas F, Vindel A. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. J Antimicrob Chemother. 2009;64:524–8.
67. Woodford N, Ward M, Kaufmann M. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum b-lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother 2004;54:735-40.
68. Seral C, Pardos M, Castillo F. Betalactamasas de espectro extendido en Enterobacterias distintas de *E. coli* y *Klebsiella* Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:12-8.
69. D’Andrea M, Arena F, Pallechia L, Rossolini G. CTX-M-type Beta-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. Medical Microbiology 2013;303:305– 17.