

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



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS CLÍNICO

Caracterización Fenotípica y Genotípica de *Escherichia coli*
productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido y
Carbapenemasas aisladas de aguas residuales y de recreación de
la ciudad de León. Marzo-Agosto 2015.

Autores: Br. Lester Iván Gutiérrez Pérez
Br. Roberto José Herrera García

Tutores: Erick Amaya Mayorga. PhD
Profesor Titular Departamento de Microbiología y parasitología. UNAN, León.

Daniel Reyes Navarrete. MD, MSc, PhD
Profesor Titular Departamento de Microbiología y Parasitología. UNAN, León

Samuel Vílchez Rugama. PhD
Profesor Titular Departamento de Microbiología y Parasitología. UNAN, León

León, 2015

“A la libertad por la universidad”

Resumen

El esparcimiento de *Escherichia coli* productoras de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (KPC), se ha convertido en un problema de salud significativo a nivel mundial, por reducir aún más las opciones terapéuticas a las infecciones producidas por esta especie perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Estudios recientes han mostrado una fuente alternativa de esparcimiento de *E. coli* productoras de BLEE y KPC, al contaminar las aguas de recreación (ríos y océanos), por las aguas residuales provenientes de centros hospitalarios - representando un riesgo de dispersión de este tipo de bacteria al entorno ambiental. En vista a lo anterior, el presente estudio describe una forma de caracterizar aislados de *E. coli* productoras de enzimas BLEE y KPC a partir de muestras de aguas residuales recolectadas en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello, 3 plantas de sedimentación y de 8 zonas de convergencia de dichas aguas (Rio Chiquito, Rio Quezalhuaque y zonas costeras), de la ciudad de León. Como método de tamizaje se realizó un ensayo en medios CHROMagar® Orientation BLEE y KPC para el aislamiento presuntivo de aislados de *E. coli* productores de BLEE y KPC. Los aislados obtenidos fueron analizados por el método *PhenePlate (PhP)-RE*, Kirby Bauer y test de Hodge modificado para la confirmación, agrupación y determinación fenotípica de BLEE, Amp-C, así como clasificación de KPC, respectivamente. Un total de 746 aislados de *E. coli* del medio CHROMagar® Orientation BLEE y 25 aislados de *E. coli* del medio CHROMagar® Orientation KPC, fueron recuperados. Se procesó el 40% de estos aislados (n=309) por PhP-RE donde se identificaron 27 fenotipos comunes de los cuales 3 de ellos fueron fenotipos dominantes y representan el 37.9% de los aislados analizados. Mediante Kirby Bauer se identificaron 100 aislados resistentes a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación (n=86), y a carbapénicos (n=24). De estos, 73/86 aislados fueron productores de BLEE, de las cuales 2 de ellos también fueron positivas para Amp-C, el resto de aislados fueron negativos para estos dos mecanismos. A los aislados sospechosos de producir KPC (n=24) se les realizó el test de Hodge y prueba de discos combinados para su clasificación, obteniendo que 23/24 pertenecen a metalobetalactamasa Clase B y 1/24 Clase A. Un total de 75 aislados presuntivos BLEE codificaban los siguientes genes *bla*_{TEM} (54.6%), *bla*_{CTX-M} (90.6%) y *bla*_{OXA} (62.6%), con coexistencia de genes observados para *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA} (38.7%), confirmado por un ensayo múltiple-PCR.

Dedicatoria

En primer lugar a Dios nuestro señor, quien con su buena gracia espiritual nos ayudó durante nuestro tiempo de estudio.

A nuestros padres que con apoyo y sacrificio nos han servido de inspiración en cada paso que damos para alcanzar nuestras metas.

A nuestros tutores por brindarnos su tiempo y paciencia al igual que sus conocimientos para el desarrollo de esta investigación.

Agradecimientos

En el camino que nos lleva a alcanzar nuestras metas, se necesita de mucho esfuerzo, sabiduría y de una mano amiga que nos ayude a seguir adelante.

Por ello agradecemos a:

Nuestros tutores Dr. Erick Amaya, Dr. Daniel Reyes Navarrete y Dr. Samuel Vilchez por su tiempo y conocimiento brindado.

Lic. Claudia Pérez y Lic. Johann Pérez por su apoyo en la recolección y procesamiento de las muestras.

A todo el personal del laboratorio de Microbiología y Parasitología que de manera directa e indirecta nos brindaron su ayuda.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	5
4. Planteamiento del Problema	6
5. Objetivos	7
6. Marco Teórico	8
6.1. Generalidades estructurales e identificación de <i>Escherichia coli</i>	8
6.2. Resistencia Antimicrobiana.	8
6.2.1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	10
6.3. <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE.....	11
6.4. <i>Escherichia coli</i> productoras de β -Lactamasas AmpC	12
6.5. <i>Escherichia coli</i> productoras de carbapenemasas.....	13
6.6. Resistencia bacteriana en aguas residuales.....	14
7. Materiales y Métodos	16
7.1. Recolección y Procesamiento de la muestra.....	17
7.2. Identificación de fenotipos de utilizando el sistema PhenePlate	19
7.3. Confirmación y caracterización de los mecanismos de resistencias.....	20
7.4. Confirmación de producción y clasificación de Carbapenemasas.....	20
7.5. Detección genotípica de β -lactamasas por PCR convencional	21
7.6. Operacionalización de las Variables.....	23
8. Resultados	24
9. Análisis de Resultados	33
10. Conclusiones	36
11. Recomendaciones	37
12. Referencias	38
13. Anexos	44

1. Introducción

La *Escherichia coli* es una bacteria que está presente en una gran variedad de ecosistemas incluido el tracto gastrointestinal del ser humano y de los animales de sangre caliente ^(1, 2). Este microorganismo es integrante de la flora comensal del intestino ⁽³⁾, sin embargo algunas cepas son consideradas patógenas, y pueden transmitirse generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, asimismo a través de carnes poco cocidas y leche cruda ⁽²⁾.

A nivel mundial, pero principalmente en países en vías de desarrollo, *E. coli* es una bacteria que provoca diversos tipos de enfermedades, es el principal causante de infecciones del tracto urinario y un importante patógeno causante de diarrea ⁽³⁻⁵⁾. Sin embargo, el mayor problema es que esta bacteria ha adquirido resistencia a diferentes agentes antimicrobianos debido al uso y abuso de los mismos en los hospitales, comunidad, crianza de animales, acuicultura y agricultura, que junto con los pobres sistemas de alcantarillado contribuyen a la aparición y propagación de dichos patógenos ^(1, 6). La Organización Mundial de la Salud considera el surgimiento de bacterias antibiótico resistente como un problema grave a la salud pública, tal es el caso del surgimiento de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ⁽⁷⁾ y bacterias productoras de Carbapenemasas ^(8, 9), que a su vez dificultan considerablemente la terapia antimicrobiana ⁽⁹⁻¹³⁾.

Como describimos anteriormente, *E. coli* puede transmitirse fácilmente mediante las heces fecales y orinas excretadas por seres humanos y animales en las aguas residuales, esta bacteria podría ser portadoras de importantes mecanismos de resistencia codificados en plásmido de conjugación ^(1, 6). Estas aguas residuales son consideradas como “Puntos Calientes” en la trasmisión horizontal de estos plásmidos, lo que contribuye su esparcimiento y diseminación en el medio ambiente ^(11, 14-17)

El presente trabajo, pretende caracterizar tanto fenotípica como genotípicamente los aislados de *E. coli* productores de BLEE y Carbapenemasas presentes en distintos ambientes acuáticos de la ciudad de León.

2. Antecedentes

Durante más de medio siglo, los antibióticos han sido de mucha utilidad para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. En la década de los 40'se introdujo por primera vez la penicilina y con ello se creía que las infecciones bacterianas habían sido erradicadas^(18, 19). La terapia con antibióticos había llevado a un dramático descenso de la mortalidad y morbilidad, así también en la capacidad de prevenir, curar y reducir la transmisión de enfermedades infecciosas⁽¹⁸⁾. Sin embargo, pocos años después, muchas bacterias que podían ser tratadas fácilmente, empezaron a mostrar diversas formas de resistencia a los antibióticos casi tan pronto como se introdujeron los mismos en el mercado⁽²⁰⁾, dando inicio así a una lucha que hoy enfrentamos día a día: “La resistencia antimicrobiana”.

En 1983 se descubrió en Alemania la primera enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de más amplio espectro (SHV-2), inaugurando el capítulo de las BLEE^(20, 21). En Francia, un año después, se describió una TEM-3 con fenotipo semejante⁽²⁰⁾. En 1989 se detectó un aislado clínico de *E. coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima. Se considera que las cefotaximasas CTX-M plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp.⁽²¹⁾ Entre 1986 y 1992 aparecieron, casi simultáneamente, las primeras CTX-M en Japón, Alemania, Argentina, Italia y Francia. En 1991, en Turquía, y más tarde en Francia, se detectaron por primera vez oxacilinasas, que se inhibían débilmente por el ácido clavulánico pero que conferían, por lo demás, un fenotipo similar al de las BLEE. Resultaron ser mutantes de las *betalactamasas* tipo OXA.⁽²¹⁾ Estas enzimas son comúnmente aisladas en las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y son conocidas como BLEE^(20, 22). Actualmente se conocen más de trescientos tipos de BLEE, que se clasifican en base a su secuencia aminoacídica, la mayoría de ellas descritas por primera vez en países Europeos⁽²⁰⁾.

Los BLEE son particularmente peligrosos porque están integrados en plásmidos que se pueden intercambiar con una colección variada de especie bacteriana⁽²²⁾. La amplia distribución geográfica de las cepas resistentes a los antibióticos quizás esté relacionada

con su transmisión entre hospitales, depuradoras y el medio ambiente, siendo el agua la principal fuente unión entre ellos ^(1, 4, 11, 14, 15, 17, 23, 24).

Un estudio realizado por Chagas y cols., en 2008, encontraron un 44% de bacterias productoras de BLEE en las aguas residuales provenientes de Hospital en Rio de Janeiro, Brazil; donde *E. coli* fue uno de los microorganismos más prevalente junto con *Klebsiella pneumoniae*. En este mismo estudio detectaron gen *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV} en un 82, 67 and 48% de los aislados productoras de BLEE respectivamente, siendo la asociación de *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} la más prevalente con un 36% seguida por *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV} con un 23% ⁽²⁵⁾.

En 2010 Zhang y cols., aislaron 665 *E. coli* a partir de muestras de superficie de ríos en China, en donde detectaron genes *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en 51.3, 14.9, 8.7, y 17.4% respectivamente ⁽²⁶⁾.

Un estudio realizado en 2013 por Korzeniewska E. y cols. en Olsztyn, Polonia afirma que los procesos de tratamiento de aguas residuales reducen número de bacterias, pero que algunas resistentes a los antibióticos pueden permanecer en el flujo de las aguas residuales y éstas terminan propagando resistencia en el medio ambiente. Demostró que *E. coli* es capaz de sobrevivir a los procesos de tratamiento de estas aguas, detectando que más de $2,7 \times 10^3$ UFC/ml es capaz de sobrevivir el tratamiento. En este mismo estudio se analizaron 395 muestras provenientes de aguas residuales de Hospital y aguas ambientales de los cuales casi todos (95,7%) de las cepas de *E. coli* identificadas demostrado ser resistentes a la cefotaxima. Otras cefalosporinas variaron resistencia entre 21,1% a 94,7%. Además, encontraron *E. coli* productoras de BLEE en 76.5% de los aislados de efluentes del hospital, 57.1% de las muestras de aguas residuales de flujo de entrada y salida, y un 44,2% de las muestras de agua de los ríos. El principal gen asociado a esta resistencia fue que *bla*_{CTX-M-1} (60.6%) ⁽¹¹⁾

El estudio realizado por Kamruzzaman M. y cols., aislaron 48 muestras de *E. coli* de agua superficial del medio ambiente en Bangladesh (Sur de Asia) en 2012, 20/48 muestras de

E. coli resistentes a cefalosporinas de tercera generación, también mostraron resistencia a Ciprofloxacina (n=19), y trimetoprim/sulfametoxazole (n=19). Es importante mencionar que 19/20 aislados resistente a las cefalosporinas de tercera generación fueron positivos para el gen *bla*_{CTX-M-15}⁽¹⁴⁾

Kwak Y.K y cols., analizó aguas residuales de Estocolmo en el año 2014, donde afirma que la planta de tratamiento estudiada expulsa un promedio de 4.6×10^{13} *E. coli* de las cuales 34% son resistente al menos a un antibiótico y que 2.3% son productoras de BLEE. Además, 13.6% de las muestras provenientes del hospital contienen *E. coli* son productoras de BLEE⁽¹⁷⁾.

En León-Nicaragua, entre octubre de 2008 y mayo de 2009 Amaya E. y cols., estudiaron *E. coli* y su resistencia a los antibióticos en aislados de aguas residuales provenientes del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA), en los que se encontraron altos niveles de resistencia a ampicilina (100%), ácido nalidíxico (70%), ciprofloxacina (69%), cloranfenicol (69%) y trimetoprim-sulfametoxazol (100%). En este mismo estudio encontraron predominio de *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV} en 65 y 53% respectivamente en los aislados analizados, *bla*_{TEM} fue positivo para el 14%, mientras que el gen *bla*_{OXA} no fue identificado en las muestras del Hospital.⁽⁴⁾

3. Justificación

La propagación de bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente es una amenaza para la salud humana, por tanto es de suma importancia realizar estudios para conocer la situación actual de este problema en Nicaragua. La *E. coli*, es una bacteria dominante del intestino y a su vez es uno de los principales patógeno humano, particularmente por considerarse un patógeno importante de reservorio de genes de resistencia contenido en plásmido que fácilmente pueden transmitirse, aumentado de esa manera su diseminación a otras especies bacterianas ^(4, 11, 14, 17).

Paralelo a lo anteriormente citado, es también importante la caracterización de las bacterias resistentes a los antibióticos en depósitos de Aguas, ya que estos lugares no sólo son una forma de difusión de microorganismos resistentes a los antibióticos entre las poblaciones humanas y animales, sino también es la ruta por la cual se introducen genes de resistencia en ecosistemas bacterianos naturales ^(1, 4, 11, 15, 17, 24). Se ha demostrado que las bacterias se vuelven resistentes a través del mal uso de los antibióticos tanto en el tratamiento médico humano, como en la crianza de animales y agricultura, y que dentro de las fuentes importantes del incremento y propagación de resistencia están los efluentes de hospitales, alcantarillado municipal y planta de tratamiento de aguas residuales ⁽²⁴⁾; sitios que proporcionan condiciones favorables para la proliferación de bacterias y la propagación de genes de resistencia, como la producción de enzimas tipo BLEE, AmpC y Carbapenemasas ^(1, 3, 11, 14).

El presente estudio nos permitió obtener resultados que representan una situación a nivel poblacional de bacterias antibiótico-resistente, considerando que las aguas residuales son un conjunto de muestras biológicas de todos los pobladores. Además, de la factibilidad de intercambiar su información genética, lo que puede conllevar al esparcimiento de la resistencia. Brindando por tanto una base para la implementación de un sistema de vigilancia alternativa de *E. coli* antibiótico-resistente, con el fin de determinar su probable ruta de dispersión en la comunidad. Información oportuna que podrá servir a las autoridades de salud competentes, para tomar las medidas de prevención necesarias ante un posible esparcimiento de este tipo de bacteria.

4. Planteamiento del Problema

La detección adecuada de *E. coli* productoras de BLEE y carbapenemasas es crucial para elaborar medidas de control de infecciones y la elección adecuada de la terapia antimicrobiana, por ende nos hemos planteado la siguiente pregunta:

¿Cuál es la frecuencia de *E. coli* antibiótico-resistente en las aguas residuales y de recreación que circulan en la ciudad de León; así también, cuál son sus mecanismos de resistencias asociados?

5. Objetivos

General

- Determinar las características fenotípicas y genotípicas de *E. coli* productoras de BLEE y Carbapenemasas aisladas en muestras de aguas residuales y de recreación de la Ciudad de León.

Específicos

- Determinar *E. coli* productoras de BLEE y Carbapenemasas en muestras de aguas residuales y de recreación de León.
- Identificar Patrones fenotípicos de los aislados productores de mecanismos de resistencia mediante el sistema de Phene-Plate.
- Determinar mecanismos de resistencia antimicrobiana de tipo BLEE, Amp-C y KPC, en los fenotipos más relevantes.
- Identificar genes de resistencia que codifican para los fenotipos de *E. coli* productoras de BLEE relevantes.

6. Marco Teórico

6.1. Generalidades estructurales e identificación de *Escherichia coli*.

La *E. coli* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram-negativo, de 0.5-1 μm , su estructura química se define por proteínas flagelares y polisacáridos de envoltura, anaerobio facultativo cuyo crecimiento óptimo tiene lugar a temperaturas entre 30-37°C y pH 7.2-7.5; prolifera bien a temperatura ambiente. Es encontrada como un habitante normal de la microflora intestinal humana, comprende un grupo extremadamente versátil y diverso de organismos.^(27, 28) El género *Escherichia* incluye una sola especie (*E. coli*) la cual comprende varios grupos serológicos que se diferencian por sus propiedades bioquímicas, antigénicas y culturales⁽²⁹⁾.

Se utilizan diversos métodos de identificación, siendo los más utilizados las pruebas de reacciones bioquímicas (ver Tabla 1)⁽³⁰⁾. Los medios de cultivo Selectivos-diferenciales (Ej: CLED, MacConkey y medios cromogénicos y fluorogénicos) detectan caracteres fenotípicos bacterianos que ponen de manifiesto la presencia de enzimas características (Beta-glucuronidasa y Beta-galactosidasa) de grupos taxonómicos^(27, 28, 31)

6.2. Resistencia Antimicrobiana.

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico^(1, 10, 12, 15, 24). La resistencia antibiótica es ahora considerada un problema global de salud que aumenta la morbilidad, una mortalidad y costos de tratar enfermedades contagiosas^(4, 10, 13, 32). Por ende, es un problema serio en países en desarrollo donde las infecciones bacterianas permanecen siendo las causas principales de morbilidad y la mortalidad, especialmente en la infancia.⁽³²⁾

Tabla 1: Identificación Bioquímica de *E. coli* ⁽²⁷⁾

Prueba bioquímica	% de positividad	Prueba bioquímica	% de positividad
Producción de Indol	98	Fermentación de salicina	40
Rojo de metilo	99	Fermentación de L-arabinosa	99
Citrato de Simmons	1	Fermentación de la rafinosa	50
Acido de glucosa	100	Fermentación de L-ramnosa	80
Gas de glucosa	95	Fermentación de maltosa	95
Lisina descarboxilasa	90	Fermentación de D-xilosa	95
Arginina dihidrolasa	17	Fermentación de trealosa	98
Ornitina descarboxilasa	65	Fermentación de celobiosa	2
Movilidad a 36 °C	95	Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de lactosa	95	Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de la sacarosa	50	Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de D-manitol	98	Fermentación de glicerol	75
Fermentación de D-sorbitol	94	Nitrato a nitrito	100
Fermentación de mucato	95	ONPG	95
Fermentación de dulcitol	60	Utilización de Acetato	90

Entre los factores que han contribuido para esta amenaza es el aumento en el uso de antibiótico (el control sub-óptimo de la venta, la calidad, así como también el uso de antibióticos en la medicina humana y animal), mayor movimiento de personas, cambios medioambientales, y aguas residuales pobres y redes fluviales^(10, 15, 24, 32). Por tanto, los antibióticos han sido integrados a la vida cotidiana de la población y se utiliza a “gusto y antojo” sin preocupación de sus efectos⁽¹⁰⁾. Además, los antibióticos han sido incorporado al arsenal terapéutico empleado en la agricultura y ganadería, donde su control es mucho menor que en la Medicina^(1, 6, 33). Con el poco control que se ejercen sobre los antibióticos, más la facilidad que tiene las bacterias de compartir genes de resistencia día a día esta problemática aumenta considerablemente, en cual las aguas juegan un papel fundamental tanto en la diseminación como en potencializar el intercambio genético^(1, 14, 15, 17, 24)

6.2.1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana en bacteria Gram negativa son muy variados y cierta cantidad ellos está mediada por un plásmido móvil ⁽³⁴⁾. Estos mecanismos incluyen la pérdida de porinas (reduce el movimiento de antibiótico a través de la membrana plasmática), la presencia de β - lactamasas en el espacio del periplásmico (degradan el anillo β - lactámico), la expresión de una bomba de eflujo (expela el antibiótico de la bacteria antes de que pueda hacer efecto); la presencia de enzimas que modifican el antibiótico (hace al antibiótico incapaz de interactuar con su blanco); las mutaciones del sitio del blanco (que previenen el antibiótico de aglutinarse para su sitio de acción); las mutaciones ribosomal o las modificaciones (que previenen el antibiótico de aglutinarse) y la síntesis de proteínas; los mecanismos metabólicos de circunvalación son los que usan una enzima resistente alternativa para pasar por encima del efecto inhibitorio del antibiótico; y una mutación en el lipopolisacárido, que da la clase de la polimixina de antibióticos.^(34, 35)

6.2.1.1. Bombas de Eflujo

Las bombas del eflujo juegan un papel clave en la resistencia antibiótica y también el otro de saque funciona en bacterias como el cañón de la chimenea de nutrientes esenciales e iones, excreción de productos finales metabólicos y las sustancias perniciosas así como también la comunicación entre celdas y el medio ambiente. Este mecanismo de resistencia es una preocupación principal porque una sola bomba del eflujo puede producir una resistencia simultánea para varios antibióticos ^(34, 35).

6.2.1.2. La permeabilidad exterior de la membrana

La membrana de bacteria Gram negativa es una barrera formada por compuestos hidrófobos e hidrófilos. Combinando un biestrato altamente lípido hidrófobo con proteínas que forjan poro de propiedades específicas de excepción de tamaño, La membrana actúa como una barrera selectiva. Las propiedades de permeabilidad de esta barrera, por consiguiente, tienen un impacto principal en la susceptibilidad del microorganismo para antibióticos, que, hasta la fecha, es esencialmente dirigido a sectores específicos en procesos intracelulares. La existencia de tensiones resistentes a antibióticos en un gran número de especie bacteriana debido a modificaciones en el lípido o composición proteica

de la membrana ciertamente resalta la importancia de la barrera en la sensibilidad antibiótica⁽³⁶⁾.

6.2.1.3. Las modificaciones del blanco

Este mecanismo se basa en alteraciones de sitios bacterianos que son dirigidos a sectores específicos previniendo así la acción de los antibióticos. Por ejemplo la resistencia del fluoroquinolone es atribuida a mutaciones dentro de los blancos de la droga (la ADN-girasa y topoisomerase)⁽³⁷⁾.

6.2.1.4. La modificación enzimática del antibiótico

Las enzimas que modifican antibióticos antibacteriales como las β -lactamasas que degradan antibióticos y otros (incluyendo el macrólidos y proteínas que modifican aminoglucósido) que realizan transformaciones químicas para dar el antibiótico ineficiente⁽³⁸⁾.

6.3. *Escherichia coli* productoras de BLEE

Las BLEE, son una familia de enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, fundamentalmente enterobacterias especialmente frecuentes en *E. coli*. Son capaces de inactivar, además de a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam.^(20, 39)

Las cepas productoras de BLEE son multirresistentes. Presentan resistencia a todos los betalactámicos, excepto, a cefamicinas y a los carbapenémicos. Además, los plásmidos que codifican esta resistencia portan genes de resistencia a otros antibióticos, como cotrimoxazol, aminoglucósidos y tetraciclinas. La resistencia de las β -lactamasas plasmídicas es transferible, lo que posibilita la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre diferentes especies bacterianas^(18, 39).

Hasta la década de 2000, la mayoría de las BLEE eran estructuralmente relacionadas con el TEM- de espectro reducido y de tipo SHV-Lactamasas⁽⁴⁰⁾. Las mutaciones genéticas que dan lugar a BLEE amplían el patrón de resistencia parental a un fenotipo que incluye resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro (por ejemplo, cefotaxima [CTX] y ceftazidima [CAZ]) y monobactamas (por ejemplo, aztreonam)⁽⁴¹⁾. Por otra parte, a finales de 1990, salió a luz un nuevo tipo de BLEE, las enzimas CTX-M y fue detectada en todo el mundo, sobre todo a partir de *E. coli* ^(40, 42). Más de 50 enzimas CTX-M han sido reportados y se pueden agrupar en cinco subgrupos principales de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de similitud (CTXM-1, CTM-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, y CTX- M-25)⁽⁴²⁾. La mayor parte del CTX-Ms hidroliza CTX mejor que CAZ. Sin embargo, varios CTX-Ms, incluyendo CTX-M-15, que ahora es la enzima más extendida en todo el mundo, también hidrolizan CAZ eficiente⁽⁴⁰⁻⁴³⁾.

En la actualidad hasta no disponer de mayor experiencia clínica procedente de ensayos aleatorizados, el tratamiento de elección de las infecciones graves por *E. coli* productoras de BLEE son los carbapenémicos, que son altamente estables a la hidrólisis por β -lactamasas y que parecen ser los únicos capaces de mantener la actividad bactericida durante veinticuatro horas frente a altos inóculos de cepas BLEE positivas.⁽³⁹⁾

6.4. *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas AmpC

Las β -lactamasas AmpC son cefalosporinasas clínicamente importantes codificada en el cromosoma de muchos *Enterobacteriaceae* y algunos otros organismos en los que median la resistencia a la cefalotina, cefazolina, cefoxitina, la mayoría de las penicilinas, y β -lactamasa combinadas con inhibidor β -lactámicos. En muchas bacterias, las enzimas AmpC son inducible y se pueden expresar en alto los niveles de mutación. La sobreexpresión confiere resistencia a cefalosporinas de amplio espectro incluyendo cefotaxima, ceftazidima, y ceftriaxona y es un problema en el tratamiento de infecciones bacterianas, donde un aislado inicialmente susceptibles a estos agentes pueden llegar a ser resistentes en la terapia⁽⁴⁴⁾.

Los plásmidos transmisibles han adquirido genes de enzimas AmpC, por lo que ahora puede aparecer bacterias que carecen o mal expresan un gen *bla*_{AmpC} cromosómica, tal como *E. coli*. La resistencia debida a plásmidos AmpC es menos común que la producción de BLEE en la mayor parte del mundo, pero puede ser a la vez más difícil detectar y más amplio en el espectro. Enzimas AmpC codificada es codificada por ambos genes cromosómicos y plásmidos, también están evolucionando para hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro más eficiente. Los Carbapenémicos generalmente pueden ser utilizados para tratar infecciones debido a bacterias productoras de AmpC, pero la resistencia a carbapenem puede surgir en algunos organismos por mutaciones que reducen afluencia (exterior pérdida porina de membrana) o mejorar eflujo (activación bomba de eflujo)^(4, 44)

6.5. *Escherichia coli* productoras de carbapenemasas

La rápida emergencia y diseminación de *Enterobacteriaceae* resistente a los carbapenémicos como Imipenem y Meropenem son una considerable amenaza para la terapia clínica del paciente y para la salud pública⁽⁹⁾. Las cepas productoras de carbapenemasas son resistente a todos antibióticos β -lactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenems, así también a las fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cotrimazoles^(8, 9).

Las carbapenemasas se dividen en tres clases según su secuencia de aminoácidos: Clase de Ambler A (carbapenemasas serina); clase B (metalo-carbapenemasas); y la clase D (carbapenemasas OXA). Dentro de estas clases, se hacen más divisiones y se encuentran con frecuencia nuevas variantes^(8, 9). La rápida aparición y propagación de cepas carbapenemasas productoras es causada principalmente por las epidemias de bacterias que llevan enzimas plásmido mediada KPC (clase A), VIM-1 y NDM (clase B) y OXA-48 (clase D). Las concentraciones mínimas inhibitorias de carbapenem (CIM) observadas en los microorganismos productores de carbapenemasas pueden exhibir una variación considerable dependiendo del tipo y la expresión de la enzima carbapenemase, las especies bacterianas y la presencia de otros mecanismos de resistencia tales como las BLEE, bombas de eflujo o las AmpC^(9, 45).

6.6. Resistencia bacteriana en aguas residuales.

Los organismos resistentes a los antibióticos entran en las aguas ambientales provenientes de fuentes humanas y animales. Estas bacterias son capaces de difundir su resistencia a los microbios indígenas del agua, que también pueden contener genes de resistencia. Por otro lado, muchos antibióticos de origen industrial circulan en las aguas ambientales, lo que podría alterar los ecosistemas microbianos⁽¹⁾.

Tanto patógenos de humanos y animales, como bacterias potencialmente patógenas son constantemente liberadas desde las aguas residuales a las aguas ambientales. Muchos de éstos contienen insertada información genética móvil⁽⁴⁶⁾.

El agua constituye no sólo una forma de diseminación de organismos resistentes a los antibióticos entre la población humana y animal, sino también la vía por la cual se introducen genes de resistencia a ecosistemas bacterianos naturales⁽¹⁾. En tales sistemas, las bacterias no patógenas pueden servir como un reservorio de genes de resistencia. Además, la introducción (y acumulación progresiva) en el ambiente de agentes antimicrobianos, detergente, desinfectantes y residuos de contaminación industrial, como metales pesados, contribuyen a la evolución y esparcimiento de organismos resistentes en aguas ambientales. El uso intenso de antibióticos profilácticos en la acuicultura puede ser particularmente relevante⁽⁴⁷⁾. De lo contrario, las bacterias ambientales actúan como una fuente ilimitada de genes que pudieran actuar como genes de resistencia cuando entran en un organismo patógeno⁽¹⁾.

Los cuatros reactores genéticos ambientales que potencializan la resistencia a los antibióticos

Los reactores genéticos son sitios en los que se produce la ocasión para que se lleve a cabo una evolución genética, en particular debido a la alta conectividad biológica, la generación de variación, y la presencia de la selección específica. Más allá de los eventos mutacionales, la variación genética significativa se produce como consecuencia de eventos

de recombinación, con frecuencia como resultado de los intercambios genéticos entre los organismos dentro de las poblaciones y comunidades. Hay cuatro principales reactores genéticas en las que evoluciona la resistencia a los antibióticos⁽¹⁾

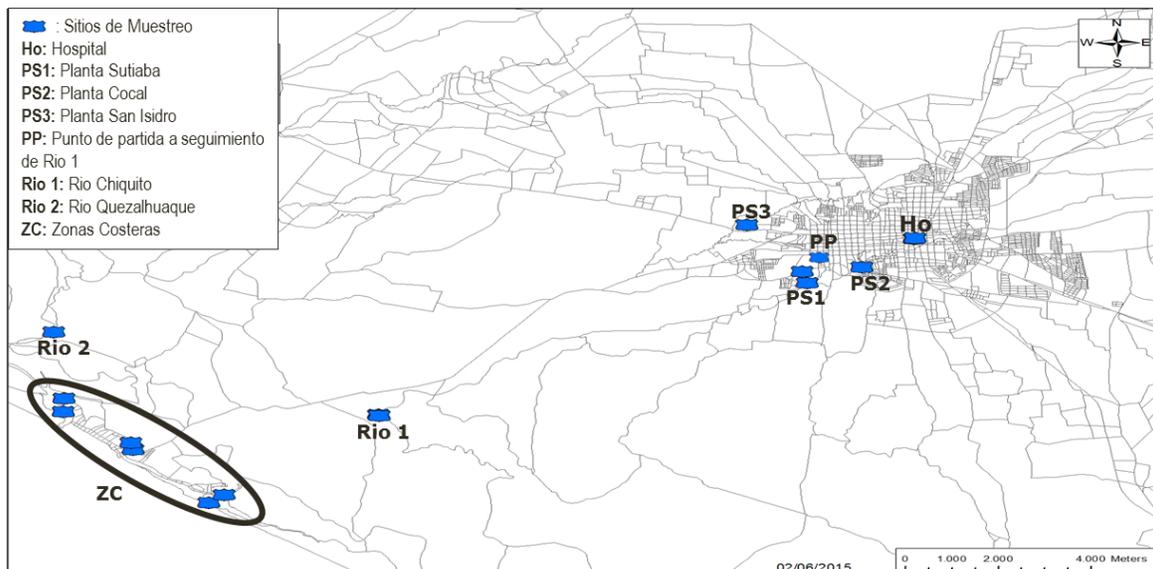
El reactor primario está constituido por la microbiota humana y animal, con más de 500 especies bacterianas implicadas, en los que los antibióticos terapéuticos o preventivos ejercen sus acciones. El reactor secundario implica los hospitales, centros de atención a largo plazo, granjas, o cualquier otro lugar en el que los individuos susceptibles están presentes y se exponen a cambio bacteriano. El tercer reactor corresponde a las aguas residuales y de cualquier tipo de residuos biológicos que se originó en el reactor secundario, incluyendo, por ejemplo, lagunas, plantas de tratamiento de aguas residuales, en el que organismos bacterianos de muchas personas diferentes tienen la oportunidad de mezclar y reaccionar genéticamente. El cuarto reactor es el suelo y los ambientes de aguas superficiales o subterráneas, donde los organismos bacterianos se originaron en la mezcla de los reactores anteriores y contrarrestan con los organismos ambientales. El agua está implicada como un agente crucial en todos los cuatro reactores genéticos, pero particularmente en los últimos.⁽¹⁾

7. Materiales y Métodos

Tipo y Área de estudio

El estudio fue descriptivo de corte transversal no probabilístico por conveniencia, se realizó en diversos ambientes acuáticos de la ciudad de León, ubicando las áreas de estudios en puntos estratégicos para un mejor seguimiento del esparcimiento bacteriano. Las áreas de estudios fueron analizadas entre Marzo-Agosto 2015, considerando los siguientes puntos el muestreo:

Imagen 1. Distribución de la zona de muestreo en la ciudad de León



Tanto de PS1 y PS2 se muestrearon en sus afluentes como efluentes. PS3 por problemas de funcionamiento sólo se muestreó en sus afluentes. PP fue tomado en consideración para hacer un contrastes entre las aguas de Río1 previo al efluentes de PS1 y PS2 (los cuales desembocan en este mismo Río) con las aguas posteriores al desagüe de estas plantas.

7.1.Recolección y Procesamiento de la muestra.

La recolección de las muestras provenientes de las áreas en estudio se realizó en intervalos de tiempo, se recolectó 75 mL cada 15 minutos utilizando tubos Falcon de 50 ml en un lapso de dos horas; y de esa manera tener un volumen final de 600 mL, el cual fue transportado en botellas de plásticos estériles de 1000 mL. Todas las muestras recolectadas fueron transportados en termos a una temperatura de 4-8°C al Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Campus Médico (UNAN, León) para su respectivo análisis. (Información detallada en Anexo Imagen 1)

Para el aislamiento de *E. coli* sospechosas de ser productoras de BLEE y Carbapenemasas, se realizó cultivo bacteriano de las muestras mediante la técnica de filtración utilizando membrana de Éster-Celulosa de 47 mm de diámetro con poros de 0.45 µm, en ellas se filtró un volumen de 50 mL de las diluciones preparadas, posteriormente la membrana fue colocada en medios cromogénicos con suplementos (CHROMagar® ESBL y CHROMagar® KPC), que son medios enriquecidos, selectivos y diferenciales para aislamiento de bacterias sospechosas de ser productoras de BLEE y Carbapenemasas, respectivamente; éstos medios se incubaron por 20-24 horas a 37°C. Las diluciones seriadas se realizaron utilizando Fosfato Buffer Salina (PBS) a una concentración de 1x, estas diluciones dependieron de la concentración bacteriana que presentaron cada zona en estudio en cada medio utilizado; para ello, estandarizamos las diluciones más factibles por área y medio de cultivo. Ej: las muestras del Hospital se filtraron utilizando las diluciones de 10^{-2} a 10^{-4} para CHROMagar® ESBL y de 10^{-1} a 10^{-3} para CHROMagar® KPC.

Identificación y Recuento de *E. coli* antibiótico-resistente

La identificación presuntiva de *E. coli* productora de BLEE y Carbapenemasa se realizó en los medios cromogénicos antes mencionados, observando las característica y coloración de *E. coli* en los mismos. En ambos casos, este microorganismo adquiere una coloración rosa oscuro o rojiza, diferenciándolas del resto de bacterias que se encuentren en la muestra. Los suplementos suministrados a los medios nos permitieron conocer las bacterias sospechosas

de ser tanto BLEE como KPC, a su vez se utilizó el medio sin suplemento para tener un recuento general de todas las *E. coli* presentes en la muestra.

El recuento se realizó tomando como base el resultado obtenido en la técnica de filtración en membrana. Luego de las 20-24 horas de incubación se procedió a realizar el recuento de colonias características de *E. coli* (Rosadas) y posteriormente se calculó la concentración bacteriana como UFC / 100 mL de la siguiente manera:

$$\text{UFC} = \frac{\text{Números de colonias (UFC rosadas)}}{(50 \text{ mL}) \times \text{Factor de dilución}} \times 100$$

Del crecimiento obtenido en la filtración de las muestras, se procedió a purificar 24 aislados tanto BLEE como KPC de cada zona de estudio por cada mes de muestreo. Estos aislados fueron guardados en crioviales con Infusión Cerebro-Corazón con 30 % de Glicerol a -20 °C para su posterior análisis.

7.2. Identificación de fenotipos de utilizando el sistema PhenePlate

Después del finalizar el periodo de recolección de muestra, seleccionamos el 40% del total de aislados purificados para ser procesadas mediante el sistema PhP-RE, la escogencia se realizó por conveniencia tomando como prioridad los aislados del Hospital y los aislados sospechosos de ser KPC, el resto de los aislados fueron seleccionados aleatoriamente hasta completar el 40% antes establecidos.

La identificación fenotípica de *E. coli* se realizó utilizando microplacas PhP-RE del sistema *PhenePlate*, las cuales están diseñadas para el fenotipado y diferenciación bioquímica de la bacteria (ver anexo procedimientos 1 y 2). Este sistema consiste en unidades de microplacas que contienen 96 pocillos con 11 reactivos deshidratado (ver figura 1), puestos en paralelo en un total de ocho filas y que permiten un alto nivel de discriminación bioquímico entre diversas cepas ⁽⁴⁸⁾.

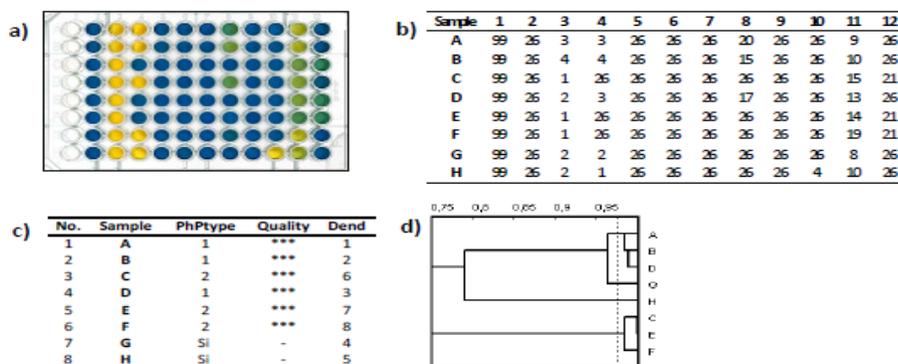


Figura 1. Ejemplo de la identificación con el sistema PhP, de las reacciones e imágenes al análisis: **a)** Reacciones de ocho aislados de bacterias ante once reactivos en microplacas PhP-RE; **b)** Cuantificación de las reacciones que representan el patrón bioquímico de cada aislado ensayado. Contenido de los pocillos (columnas 1-12): pocillo de inoculación, Celobiosa, Lactosa, Rhamnosa, Deoxyribosa, Sucrosa, Sorbosa, Tagarosa, D-Arabitol, Raffinosa, Gal-Lactona, Ornithina; **c)** Lista de fenotipos (PhPs) obtenidos; **d)** Representación gráfica (Dendrograma) de los aislados A-H. ⁽⁴⁸⁾

Una vez obtenidos los datos numéricos se analizó la base de datos con las lecturas del PhP-RE, con el fin de agrupar a los aislados de *E. coli* que presenten un coeficiente de similitud superior o igual a 0,975 dentro de grupos fenotípicos.⁽⁴⁸⁾ Esto nos permitió seleccionar los aislados representativos de cada grupo para el análisis de los mecanismos de resistencia.

7.3. Confirmación y caracterización de los mecanismos de resistencias

Los aislados representativos de cada fenotipo obtenido con el análisis de PhP-RE, fueron analizados por el método Kirby-Bauer para identificar tres tipos mecanismos de Resistencia: BLEE, Carbapenemasas y AmpC, así también fueron testados para identificación de patrones de resistencia a diferentes familias de antibióticos, siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y Laboratorio (CLSI)⁽⁴⁹⁾ (ver anexos procedimiento 3).

Los antibióticos fueron colocados de manera estratégicos para la identificación de mecanismos de resistencia. Amoxicilina con ácido clavulánico sólo fue utilizada para determinar sinergia de los aislados productores de BLEE. Los antibióticos utilizados para la susceptibilidad fueron:

Sim	Nombre	µg	Sim	Nombre	µg
CRO	Ceftriazona	30	SXT	Trimetoprim sulfametoxazol	25
CAZ	Ceftazidime	30	CN	Gentamicina	120
FEP	Cefepime	30	FOX	Cefoxcitina	30
C	Cloranfenicol	10	MEN	Meropenem	10
CIP	Ciprofloxazine	5	AK	Amikacina	30
NAL	Ácido Nalidixico	30	CT	Colistina	10
TE	Tetraciclina	30			

7.4. Confirmación de producción y clasificación de Carbapenemasas

Los aislados que fueron sospechosos de ser productores de Carbapenemasas, se le realizó el Test de Hodge modificado para confirmar la producción de estas enzimas siguiendo los estándares del CLSI⁽⁴⁹⁾ (ver anexos procedimiento 4)

A los aislados confirmados de ser productores de Carbapenemasas, se les realizó la prueba de discos combinados con inhibidores (EDTA y Ácido Borónico) para ubicar las carbapenemasas dentro de la clasificación de Ambler⁽⁴⁹⁾. Para la clase A, el inhibidor utilizado es el Ácido Borónico y para la clase B o Metalobetalactamasas el inhibidor es el EDTA. (ver anexos procedimiento 5)

7.5. Detección genotípica de β -lactamasas por PCR convencional

Todos los aislados analizados en Kirby-Bauer para la identificación fenotípica de β -lactamasas, fueron procesados por PCR para la identificación de *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}. Los pasos del análisis se describen en Anexos procedimiento 6

Extracción de ADN: Se tomó una cantidad de colonia del cultivo bacteriano en estudio y se suspendió en 500 μ l de PBS 1x. La suspensión bacteriana fue expuesta a 100°C por 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 13000 RPM por 3 minutos para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se trasegó a un tubo Eppendorf de 1ml, debidamente rotulado y posteriormente se guardó en refrigeración a 4 °C hasta su uso para PCR convencional.

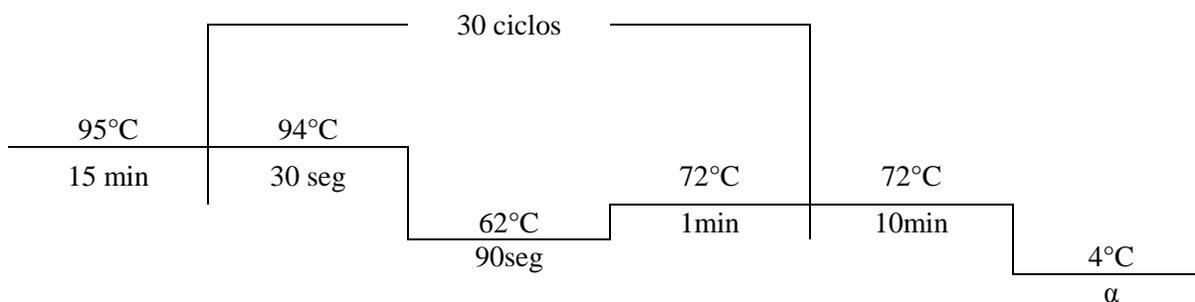
Multiplex PCR: El PCR para la detección de los genes que codifican para β -lactamasas se realizó utilizando cebadores universales los cuales se muestran en la Tabla 2. Para la amplificación del ADN por cada tubo de PCR se agregará las cantidades de la mezcla según tabla 3. Utilizando el programa de amplificación como se observa en la figura 2.

Tabla 2: Primers que se utilizarán para la detección de diferentes genes de β -lactamasas en multiplex PCR⁽⁴³⁾

Genes	Secuencia (5'-3')	Peso
<i>bla</i> _{SHV}	f: CTT TAT CGG CCC TCA CTC AA r: AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG	237 pb
<i>bla</i> _{TEM}	f: CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA r: ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT	445 pb
<i>bla</i> _{CTX-M}	f: ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC r: TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG	593 pb
<i>bla</i> _{oxa}	f: ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C r: AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC	813 pb

Tabla 3: Mezcla para multiplex PCR

Material	μ L por reacción	Concentración final
<i>bla</i> _{CTX-Mf} 10 μ M	0.5	0.2 μ M
<i>bla</i> _{CTX-Mr} 10 μ M	0.5	0.2 μ M
<i>bla</i> _{TEMf} 10 μ M	0.5	0.2 μ M
<i>bla</i> _{TEMr} 10 μ M	0.5	0.2 μ M
<i>bla</i> _{SHVf} 10 μ M	0.5	0.2 μ M
<i>bla</i> _{SHVr} 10 μ M	0.5	0.2 μ M
Agua MilliQ	20	
ADN molde	2	

Figura 2: Programa de amplificación para *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{oxa}

7.6. Operacionalización de las Variables.

Variable	Concepto	Indicador	Valor
Aguas Residuales	El término agua residual define un tipo de agua que está contaminada con material fecal y orina, procedentes de humanos y/o animales.	Volumen de agua utilizada para el aislamiento de <i>E. coli</i>	Sitio de obtención: Pilas de tratamiento Afluente hospitalario y aguas ambientales
<i>Escherichia coli</i>	Son bacilos gram-negativos móviles parte de la flora normal humana pero que pueden causar infecciones. No forman esporas.	Crecimiento bacteriano en medios selectivos de cultivos	Ausencia o Presencia
Sensibilidad	Incapacidad de un microorganismo de resistir concentraciones mínimas de un antibiótico <i>in vitro</i>	Inhibición del crecimiento del aislados ante la presencia del antibiótico	Sensible (S)
Resistencia	Capacidad de un microorganismo de vivir aún en presencia de los antibióticos	Crecimiento bacteriano en zonas cercanas al Antibiótico	Resistente (R)
Características Fenotípicas	Reacciones de fermentación. Son similares entre dos o más aislados ante los 11 substratos testados mostrando un patrón bioquímico.	Matriz de similitudes generadas por el programa de PhpWin.	Patrón bioquímico común o independiente

8. Resultados

Entre los meses de Marzo-Agosto 2015, se realizó un total de 6 muestreos en las distintas áreas de estudios, según se describe en el diseño metodológico.

Durante todo el periodo de estudio, de manera general, se realizó un recuento bacteriano el cual mostró un total de 1.29×10^8 UFC/100mL de *E. coli*, de los cuales 4.11×10^6 UFC/100mL (3.20%) y 1.67×10^4 UFC/100mL (0.01) fueron recuperadas en medios CHROMagar® BLEE y KPC respectivamente, estos recuentos se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuento totales de *E. coli* obtenidos según zonas de estudio

Ambientes Acuáticos	Lugar	Recuentos		
		Total ^a	% BLEE ^b	% KPC ^c
Aguas residuales	Hospital	5.13×10^6	31.4	0.20
	Cocal Entrada	2.19×10^7	3.95	0.00
	Cocal Salida	3.12×10^6	4.19	0.00
	Sutiaba Entrada	2.59×10^7	4.66	0.02
	Sutiaba Salida	1.61×10^6	1.86	0.01
	San Isidro Entrada	6.44×10^6	4.02	0.00
Aguas de Recreación	Rio Chiquito	1.79×10^5	2.84	0.00
	Rio Quezalhuaque	2.66×10^4	2.56	0.00
	Punto Inicio Rio Chiquito	2.54×10^7	3.11	0.00
	Zonas Costeras	6.43×10^7	0.00	0.00
Total		1.29×10^8	3.20	0.01

^a Recuento de *E. coli* obtenidas del medio CHROMagar® Orientation expresado en UFC/100mL

^b Porcentajes de *E. coli* recuperadas en CHROMagar® BLEE en relación al recuento total

^c Porcentajes de *E. coli* recuperadas en CHROMagar® KPC en relación al recuento total

8.1. Determinación patrones fenotípicos por PhP-RE

Un total de 746 aislados de *E. coli* provenientes del CHROMagar® BLEE y 25 de *E. coli* provenientes de CHROMagar® KPC fueron el número total de aislados puros obtenidos; de los cuales el 40% (n=309) fueron analizados por PhP-RE.

Todos los aislados de *E. coli* fueron seleccionados siguiendo los criterios establecidos en el acápite de procesamiento de las muestras, estas fueron caracterizadas para identificar patrones de fenotipos utilizando el sistema PhP-RE.

Este análisis permitió confirmar *E. coli* como agente de estudio, así también permitió identificar 27 fenotipos comunes los cuales representan el 90.6% de los aislados analizados, de los cuales el fenotipo 3, 7 y 10 resultaron ser grupos fenotípicos dominantes. Éstos tres grupos (juntos) representan en 37.9% del número de aislados estudiados y fueron detectados en casi todos los sitios de muestreos (ver dendogramas de los fenotipos dominantes en Anexos gráficos 6-8).

Patrones Fenotípicos identificados según áreas de estudio.

Las muestras de aguas recolectadas fueron procesadas por cada área de estudio: Aguas residuales del Hospital, Planta de sedimentación (Entrada y Salida de PT1, PT2 y PT3), Aguas de recreación (Rio 1, Rio 2, Punto Blanco y Zonas Costeras). En la Tabla 5 se detallan los resultados expuestos anteriormente, donde se observan los fenotipos comunes e individuales de las mismas.

Tabla 5. Fenotipos comunes e individuales según área de estudio

Zona de estudio	No. de aislados	Fenotipos*	
		Comunes	Individuales
Hospital	69 (22.4%)	8 (91.3%)	6
Plantas de Sedimentación	201 (65%)	18 (89.1%)	22
Aguas de Recreación	39 (12.6%)	6 (61.5%)	15

*Resultados en base a cada zona de estudio

En el Gráfico 1 se puede apreciar el dendograma de los aislados del Hospital (1a) y los aislados de las aguas de recreación (1b). El Gráfico 2 muestra el Dendograma de las Plantas de Sedimentación (representación del 49% de todos los aislados procesado en esta zona).

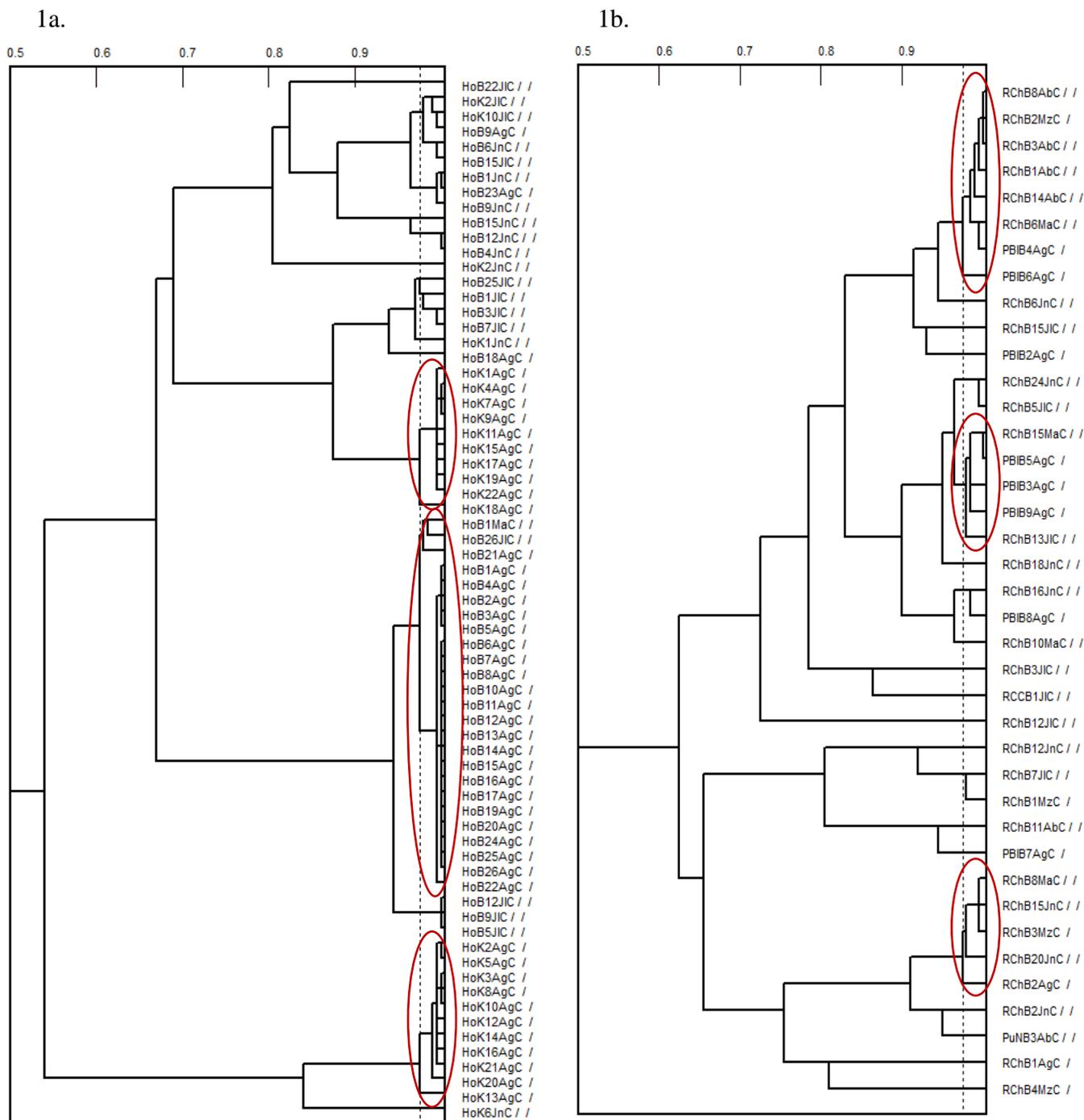


Gráfico 1. Fenotipos de los asilados de *E. coli* de Hospital y Aguas de Recreación 1a (Hospital) y 1b (Aguas de Recreación). Los círculos encierran fenotipos dominantes detectados en estas zonas de estudios.

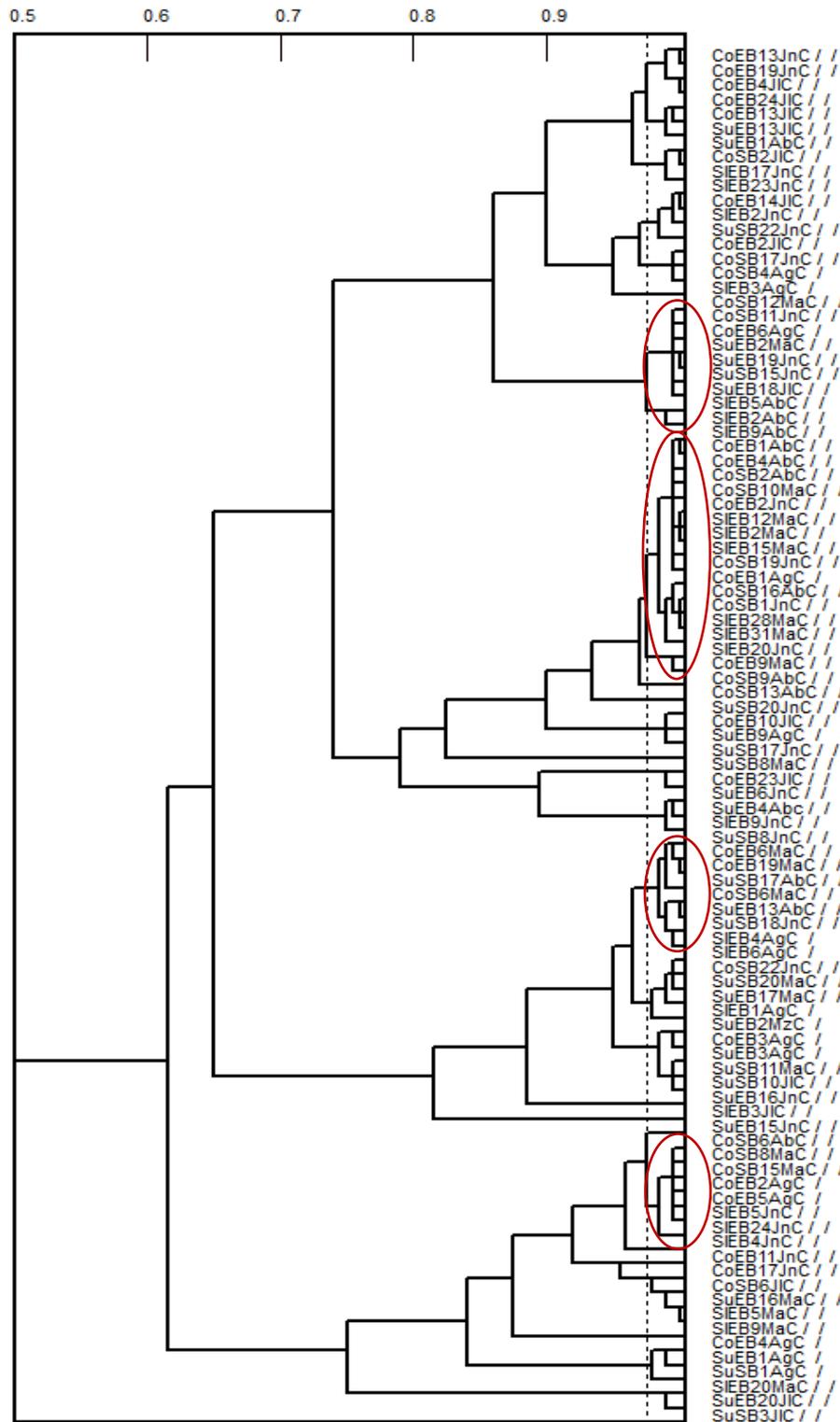


Gráfico 2. Fenotipos asilados de *E. coli* en las plantas de sedimentación. Los círculos encierran los fenotipos dominantes detectados en esta zona de estudio.

Confirmación de mecanismos de resistencia

De los 309 aislados analizados fenotípicamente por PhP-RE, se seleccionaron 86 (75 provenientes de CHROMagar® BLEE y 11 del CHROMagar® KPC para la confirmación de sus mecanismos de resistencia (BLEE, KPC y AmpC) mediante Kirby-Bauer, estos aislados fueron seleccionados de acuerdo a los criterios establecidos en el diseño metodológico.

De forma general 3 aislados resultaron negativos para la identificación fenotípica, los 83 aislados restantes de *E. coli* mostraron altos porcentajes de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftriazona ceftazidime y cefepime), así también a ciprofloxacine, ácido nalidíxico y tetraciclina (Ver Gráfica 3).

El resultado del Kirby-Bauer también demostró que 71/75 aislados recuperados del CHROMagar® BLEE fueron fenotípicamente positivas para la producción de BLEE, de los cuales dos de ellas también son fenotípicamente positivas para producción de AmpC. 3/75 resultaron negativas y 1/75 no mostró el patrón habitual de las cepas productoras de BLEE, pero mostró resistencia a Meropenem (positiva para la producción de Carbapenemasas por Test de Hodge modificado). También se encontró que 9/11 aislados recuperados del CHROMagar® KPC mostraron resistencia a 12 de 13 antibióticos probado (incluyendo meropenem), siendo Colistine el único antibiótico sensible (Ver anexos Imagen 2), 2/11 aislados recuperados del CHROMagar® KPC fueron fenotípicamente positivas para la producción de BLEE.

De forma paralela al Kirby-Bauer, todos los aislados que se recuperaron del CHROMagar® con suplemento KPC (25) más aislados resistentes a meropenem en Kirby-Bauer (1), se les realizó el Test de Hodge modificado para confirmarlas como productoras de carbapenemasas; de ellas, 24/26 resultaron positivas, 2/26 (ambas aisladas del CHROMagar® KPC) resultaron negativas al Test de Hodge; sin embargo, estos aislados son los mismos que habían sido identificados como productoras de BLEE en el Kirby-Bauer.

Los 24 aislados confirmados productores de Carbapenemasas mediante en el Test de Hodge modificado, fueron analizados por medio de discos con inhibidores EDTA y Ácido Borónico para detectar su ubicación en la Clasificación de Ambler tal y como se describe en el diseño metodológico (ver anexos imagen 3). Los resultados demostraron que 23/24 son carbapenemasas clase B o Metalobetalactamasa y tan solo 1/25 fue identificado como Carbapenemasas de Clase A. Todos los mecanismos identificados se muestran en el Gráfico 4.

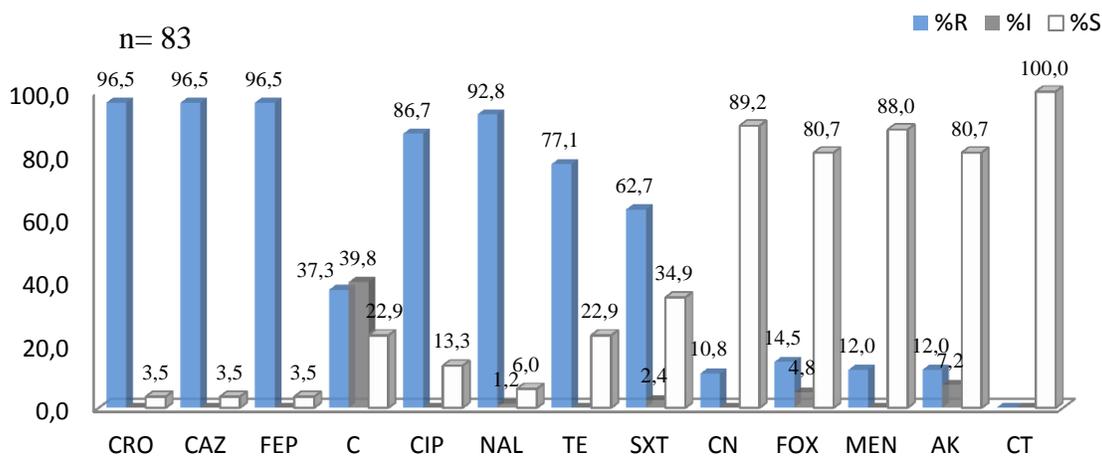


Gráfico 3. Distribución porcentual de la susceptibilidad antimicrobiana

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible. CRO: Ceftriazona (30), CAZ: Ceftazidime (30); CEF: Cefepime (30); C: Cloranfenicol (10); CIP Ciprofloxacina (5); NAL: Ácido Nalidixico (30); TE: Tetraciclina (30); SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol (25); CN: Gentamicina (120); FOX: Cefoxitina (30); MEM: Meropenem (10); AK: Amikacina (30); CT: Colistina (10)
Rango de Inhibición tomados del WHONET 5.6 (CLSI 2015)

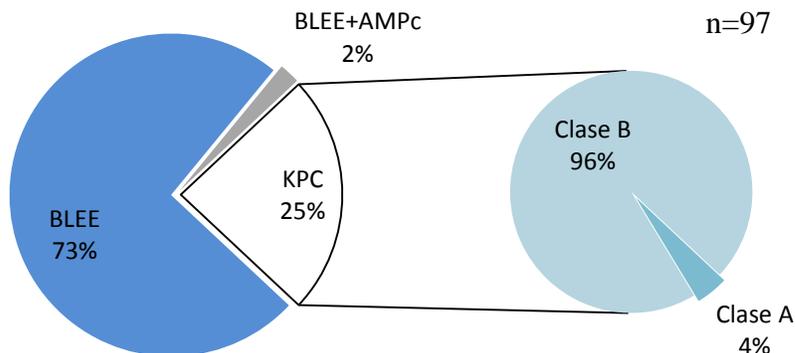


Gráfico 4. Mecanismos de resistencia identificados

Identificación de genes de β -lactamasas por PCR convencional

Los 75 aislados caracterizado por Kirby-Bauer para la producción de BLEE fueron procesados mediante PCR convencional para la detección de genes de resistencia (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* Y *bla_{OXA}*) y confirmar los resultados obtenidos fenotípicamente en el Kirby-Bauer. De estos aislados se logró identificar un total de 69 *bla_{CTX-M}*, 47 *bla_{OXA}* y 41 *bla_{TEM}*. Estos genes se encuentran distribuidos en patrones genotípicos diferentes donde el más prevalente fue la asociación de *bla_{CTX-M}* + *bla_{OXA}* (Ver Tabla 7). El gen *bla_{SHV}* no fue identificado en ninguno de los aislados testados. Estos genes no tienen predilección por fenotipos y las zonas estudiadas, sino que se encuentran diseminados en los diferentes ambientes y fenotipos (Ver Gráfico 5)

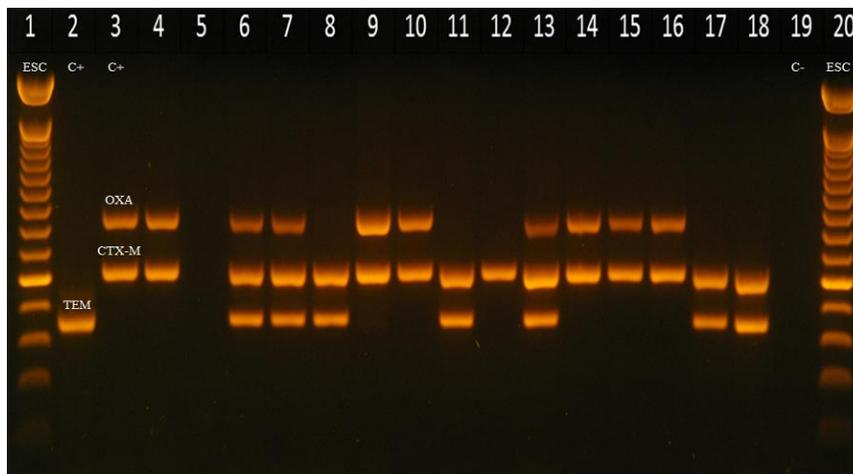
Aunque en el método de Kirby-Bauer resultaron 3 aislados negativos (fenotípicamente) el PCR convencional mostró de presencia genes que codifican para β -Lactamasas de Espectro Extendido en dos de los aislados, uno de ellos proveniente de la Planta 1 era portador de *bla_{OXA}* + *bla_{TEM}*, el otro aislado proveniente del Hospital fue positivo para los genes *bla_{CTX-M}* + *bla_{OXA}*. El último aislado fue negativo tanto por Kirby-Bauer como por PCR, este aislado era proveniente del Hospital (ver Imagen 2)

Tabla N°7 Patrones genotípico identificados por PCR (n=75)

ZONA	n(%)	Genotipos Individuales n (%)			Patrones Genotípico n (%)			
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{TEM}
Hospital	15(20,0)	-	-	-	1(6,7)	1(6,7)	8(53,3)	4(26,7)
PP	3(4,0)	-	-	-	-	2(66,7)	-	1(33,3)
PS 2 Entrada	6(8,0)	-	-	-	-	3(50)	2(33,3)	1(16,7)
PS 2 Salida	2(2,7)	-	-	-	-	-	1(50)	1(50)
PS 1 Entrada	24(32)	2(8,3)	2(8,3)	-	1(4,1)	7(29,1)	8(33,3)	4(16,7)
PS 1 Salida	14(18,7)	1(7,1)	2(14,2)	-	-	3(21,4)	4(28,6)	4(28,6)
PS 3 Entrada	4(5,3)	-	-	-	-	1(25)	2(50)	1(25)
Rio 1	7(9,3)	1(14,2)	-	-	-	2(28,6)	4(57,1)	-
TOTAL	75(100)	4(5,3)	4(5,3)	-	2(2,7)	19(25,3)	29(38,7)	16(21,3)

Un aislado proveniente del Hospital resultó NEGATIVO para el análisis genético. PP: Punto de Partida a seguimiento de Rio 1. PS1: Planta Sutiaba, PS2: Planta Cocal, PS3: Planta San Isidro, Rio 1: Rio Chiquito

Imagen 2. Ensayo del Multiplex PCR para *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{OXA}



1,20: Escalera de 100 pb. 2,3: Control positivo (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, y *bla*_{OXA}), 4,6-18: Aislados positivas para los genes buscados. 5: Aislado Negativo. 19: Control Negativo.

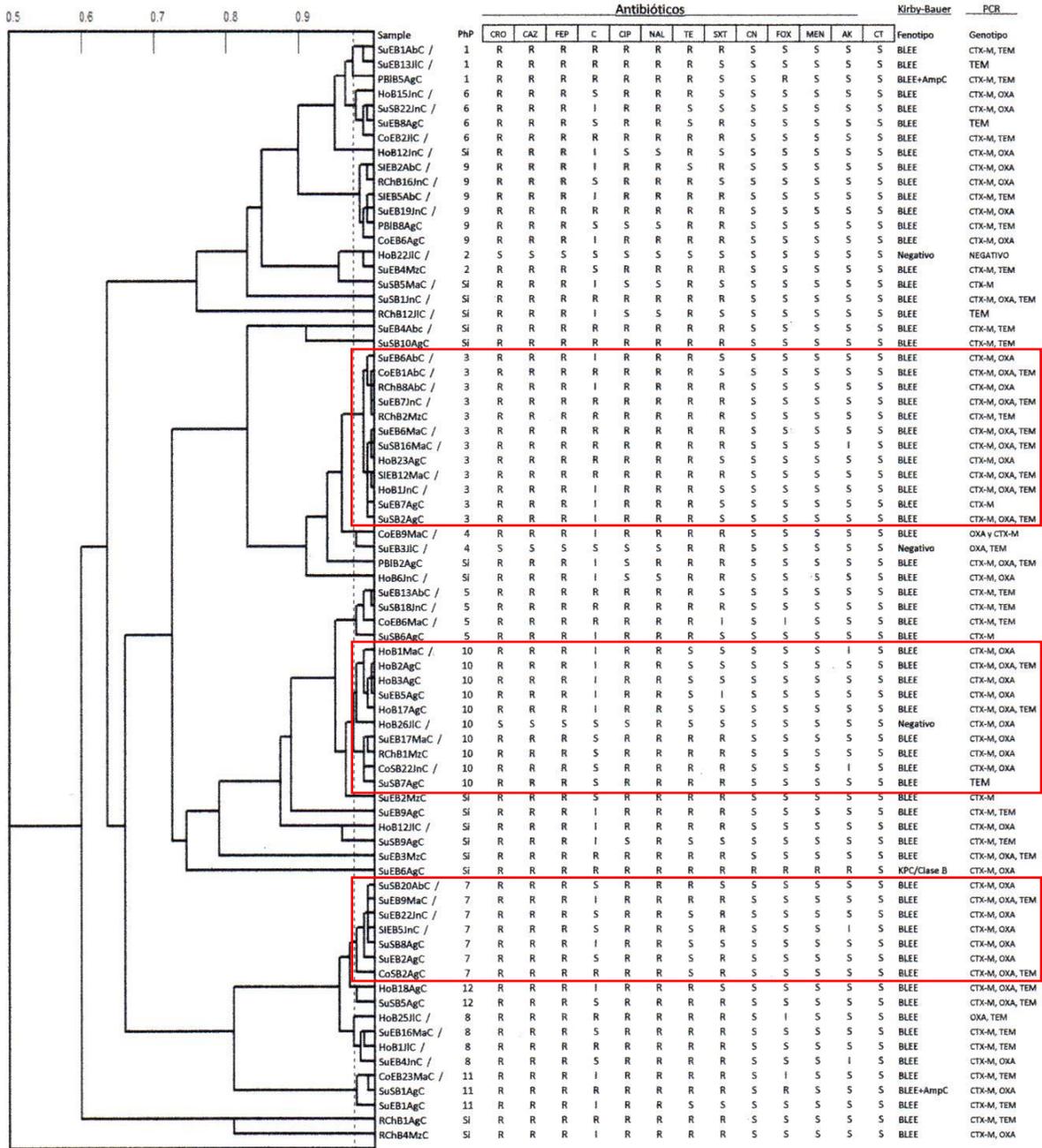


Gráfico 5. Dendograma representando grupos fenotípicos de 75 aislados procesados por PhP, Kirby-Bauer y PCR. Los recuadros agrupan los fenotipos dominantes a lo largo del estudio.

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible. CRO: Ceftriazona (30), CAZ: Ceftazidime (30), CEF: Cefepime (30), C: Cloranfenicol (10), CIP: Ciprofloxacina (5), NAL: Ácido Nalidixico (30), TE: Tetraciclina (30), SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol (25), CN: Gentamicina (120), FOX: Cefoxitina (30), MEM: Meropenem (10), AK: Amikacina (30), CT: Colistina (10) Rango de Inhibición tomados del WHONET 5.6 (CLSI 2015)

9. Análisis de Resultados

La amplia distribución de las cepas resistentes a los antibióticos está relacionada con la transmisión entre hospitales, medio ambiente, plantas de tratamientos y aguas residuales; en donde diferentes artículos han hecho énfasis en ello y relacionan a las aguas como el principal vehículo de unión entre ellos, lo que facilita su esparcimiento^(1, 3, 4, 11, 14, 15, 24, 50, 51).

En muchos países en vías de desarrollo, las ventas no regulada y dispensación de antibióticos es muy común, tanto que; hoy en día, los antibióticos no sólo son utilizados para la terapia clínica, sino también para la crianza de animales y la agricultura⁽²⁴⁾, por tal razón es importante no sólo tener en cuenta la contribución de los efluentes del hospital, sino también la contribución de la comunidad en la introducción de las bacterias resistentes a antibióticos en el medio acuático^(1, 6).

Haciendo uso del sistema PhenePlate-RE se logró identificar un total de 27 fenotipos comunes, de los cuales tres de ellos son fenotipos dominantes y representan el 37.9% del total de analizados, todos ellos fueron encontrados en 8 de los 10 ambientes acuáticos estudiados y se sabe que son fenotipos antibióticos resistentes. Estos datos nos corroboran que las aguas residuales y de recreación son el principal vehículo de diseminación de este tipo de bacterias.

En el presente estudio, se detectaron *E. coli* productoras de BLEE en el 31.4% de los aislados provenientes del hospital, 3.7% de los aislados provenientes de las plantas de sedimentación, 2.8% en aislados de los ríos y 0% de las zonas costeras. El porcentaje de BLEE obtenidas en el hospital concuerda con los resultados de Amaya E y cols., realizados en el 2010 en el mismo sitio, en el que encontraron un 36% de *E. coli* productoras de BLEE⁽⁴⁾, pero difieren con los valores publicados por Korzeniewska E. y cols., quienes encontraron un 76.5% de *E. coli* BLEE en el hospital de Olsztyn, Polonia en el 2013⁽¹¹⁾. Otro estudio realizado por Kwak Y y cols., encontraron 13.6% de *E. coli* productoras de BLEE en el hospital de Estocolmo, Suecia⁽¹⁷⁾. Estos datos podrían indicar que las aguas

residuales de los hospitales son uno de los principales aportadores de bacterias resistentes al entorno ambiental.

El análisis genotípico de los aislados del hospital detectó 13/14 *bla*_{CTX-M}, 13/14 *bla*_{OXA}, 6/14 *bla*_{TEM} y 0/14 *bla*_{SHV}, siendo la asociación *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA} (8/14) y *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA}+*bla*_{TEM} (4/14) las más prevalentes; estos resultados se asemejan a los encontrados por Amaya y cols., quienes detectaron predominio de *bla*_{CTX-M} (65%); sin embargo, difieren en la prevalencia de *bla*_{SHV} (53%) y *bla*_{OXA} (0%)⁽⁴⁾. Chagas y cols., encontraron que la asociación de genes prevalente en el Hospital de Rio de Janeiro fue *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} (36%) seguida por *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA}+*bla*_{TEM} con un 23%⁽²⁵⁾

En relación a las plantas de sedimentación de aguas residuales, se encontró 3.7% de *E. coli* productoras de BLEE, lo que difiere totalmente del estudio de Amaya E. y cols., en el cual no detectaron *E. coli* productoras de BLEE en estos mismos sitios⁽⁴⁾. Sin embargo otros estudios han publicado presencia de *E. coli* BLEE en las aguas residuales de plantas de tratamiento reportando 17.7% y 2.3% en Polonia y Suecia respectivamente^(11, 17). El análisis genético de 50 aislados provenientes de las plantas, demostró predominio de *bla*_{CTX-M} (46/50), también se detectaron *bla*_{OXA} y *bla*_{TEM} (ambos 29/50) lo que se relaciona con lo encontrado por Korzeniewska E. y cols., donde el principal gen asociado a la resistencia fue que *bla*_{CTX-M} (60.6%)⁽¹¹⁾.

De los aislados de agua de ríos se detectó 2.8% de *E. coli* productoras de BLEE; sin embargo, este resultado es bajo en comparación al estudio realizado por Korzeniewska E. y cols., quienes detectaron 44.2% de *E. coli* productoras de BLEE en muestras provenientes de ríos de Polonia⁽¹¹⁾. El estudio genético de 10 aislados de esta zona detectó 9/10 *bla*_{CTX-M}, 5/10 *bla*_{OXA}, 6/10 *bla*_{TEM} y 0/10 *bla*_{SHV} los que se asemejan con los encontrados por Zhang y cols., en China, quienes encontraron mayor prevalencia de *bla*_{TEM} (51.3%) y *bla*_{CTX-M} (17.4%) pero difieren con los genes *bla*_{OXA} (14.9%) y *bla*_{SHV} (8.7%)⁽²⁶⁾

Mediante Kirby-Bauer se observó que los aislados mostraron altos porcentajes de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftriazona ceftazidime y

cefepime), así también a ciprofloxacina, ácido nalidíxico y tetraciclina. 9 aislados confirmados como productores de KPC, mostraron resistencia a 12 de 13 antibióticos probados (incluyendo meropenem), siendo Colistine el único antibiótico sensible. Artículos han publicado que Colistine uno de los antibióticos de elección para este tipo de bacteria; sin embargo, debido a su alta toxicidad es poco recomendado en la terapia clínica y su uso debe ser racional⁽⁵²⁾.

Aunque los porcentajes de *E. coli* productoras de BLEE varían dependiendo de la zona estudiada, las *E. coli* productoras de KPC son bajas en todos los sitios de muestro (0.01%), siendo el hospital el principal aportador con tan solo 0.2 %. Los estudios de *E. coli* productoras de KPC son escasos, y raramente son identificadas en muestras ambientales; Aun así, se logró detectar aislados productores de KPC en el Hospital y plantas de sedimentación, donde predominan las Metalobetalactamasas en 23 de 24 aislados.

E. coli se ha encontrado ser responsable de la producción de *betalactamasas* CTX-M y parece ser una verdadera patógeno-BLEE de la comunidad. Además, los genes que codifican BLEE están a menudo presentes junto con otros genes de resistencia en los plásmidos, confiriendo patrones multi-resistentes que, en consecuencia alteran el entorno clínico y disminuyen las opciones de tratamiento. Diferentes estudios han detectado altas prevalencia del gen *bla*_{CTX-M}^(11, 14, 17, 32). El presente estudio no es la excepción ante la proliferación de este gen, el cual se detectó en 92% de los aislados procesados por PCR y se observó mayor asociación con *bla*_{OXA}.

10. Conclusiones

Existe una gran diversidad de *E. coli* que circulan por el entorno ambiental de la ciudad de León, muchas de ellas están agrupadas en patrones fenotípicos comunes y su vez, son antibióticos resistentes productoras de BLEE y KPC.

La mayoría de las *E. coli* antibiótico resistente presentes en estas aguas, son productoras de β -lactamasa de Espectro Extendido, siendo el HEODRA la principal aportador de estas bacterias (31.4% de los aislados de este punto), y una a su vez, contienen diversos patrones genotípicos para producción de *Betalactamasas*, siendo el más común las BLEE codificadas en el gen *bla*_{CTX-M}. Estos aislados también fueron identificados en las diferentes plantas de sedimentación y aguas de recreación

Aunque los aislados de *E. coli* productoras de KPC representaron un mínimo porcentaje, es necesario mantener una vigilancia activa de ella, ya que representan una amenaza para la salud pública. Además, este trabajo es el primero en identificar este tipo de grupo bacteriano, identificando mayormente metalobetalactamasas o Clase B en la clasificación de Ambler⁽⁴⁹⁾.

En general, 27 patrones fenotípicos fueron identificados a lo largo de este estudio, se logró caracterizar 75 aislados productores de BLEE de los cuales el gen predominante es *bla*_{CTX-M} (92%) y se encuentra comúnmente asociado *bla*_{OXA} en el 38.6%. Los aislados *E. coli* productores de KPC son escasos; sin embargo, están presentes principalmente en las aguas residuales del HEODRA. Los principales puntos donde se encuentran mayor concentración de aislados antibióticos resistentes son provenientes de las aguas residuales de las plantas de sedimentación y del HEODRA

11. Recomendaciones

Nuestro estudio representa una alternativa a la búsqueda de un gran número de microorganismos antibiótico-resistentes en las aguas residuales y ambientales, este estudio es factible para que autoridades responsables implemente este diseño para dar mayor seguimiento de estas bacterias aumentando el área de estudio y período de tiempo; y de esa manera, conocer la situación poblacional de la distribución bacteriana antibiótico-resistentes y tomar las medidas de prevención necesarias ante un posible esparcimiento de este tipo de bacteria.

12. Referencias

1. Baquero F, Martinez JL, et al. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*. 2008 Jun;19(3):260-5. PubMed PMID: 18534838.
2. Estapé JV, Zboromyrska Y. Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarregénicas. *Gastroenterología y hepatología*. 2012;35:89-93. Elsevier España, S.L.
3. Moreno E, Prats G, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates derived from phylogenetic groups A and B1 causing extraintestinal infection. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2006;24:483-9.
4. Amaya E, Reyes D, et al. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in Leon, Nicaragua. *Clinic Microbiol Infect*. 2012;18:E347-E54. PubMed PMID: 22738232.
5. Narato JP, Mai V, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* Infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinic Infect Dis*. 2006;43:402-7.
6. Collignon P, Powers JH, et al. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clinical Infect Dis*. 2009;49:132-41. PubMed PMID: 19489713.
7. Sehgal R, Gaiind R, et al. Extended-spectrum B lactamase-producing gram-negative bacteria: Clinical profile and outcome in neonatal intensive care unit. *Annals of Tropical Paediatrics*. 2007 (27, 45-54).
8. Calvo J, Cantón R, et al. Detección Fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011.
9. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA, et al. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *International journal of antimicrobial agents*. 2010 Sep;36(3):205-10. PubMed PMID: 20598859.

10. Gérvas J. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Atencion primaria / Sociedad Espanola de Medicina de Familia y Comunitaria*. 2000;25(8):589-96.
11. Korzeniewska E, Korzeniewska A, et al. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2013 May;91:96-102. PubMed PMID: 23433837.
12. Sussmann P, Mattos L, et al. Resistencia Bacteriana. Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá- Colombia.
13. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
14. Kamruzzaman M. Genetic diversity and antibiotic resistance in *Escherichia coli* from environmental surface water in Dhaka City, Bangladesh. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;76:222-6.
15. Kim S, Aga DS. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews*. 2007 Dec;10(8):559-73. PubMed PMID: 18049923.
16. Green AD, Young KK, et al. Influence of genotype, dose and sex on pruritogen-induced scratching behavior in the mouse. *Pain*. 2006 Sep;124(1-2):50-8. PubMed PMID: 16697529.
17. Kwak YK, Colque P, et al. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *International journal of antimicrobial agents*. 2015 Jan;45(1):25-32. PubMed PMID: 25465520.
18. Kong KF, Schneper L, et al. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Journal Copilation APMIS*. 2009;118:1-36.
19. Steffee CH. Alexander Fleming and penicillin. The chance of a lifetime? *North Carolina medical journal*. 1992;53:308-10.

20. García A, García E, et al. Bacteraemia due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL): clinical relevance and today's insights. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*. 2011;24:57-66.
21. Young KK, Edlin G. Physical and genetical analysis of bacteriophage T4 generalized transduction. *Molecular & general genetics : MGG*. 1983;192(1-2):241-6. PubMed PMID: 6358795.
22. Sehgal R, Gaiind R, et al. Extended-spectrum B lactamase-producing gram-negative bacteria: Clinical profile and outcome in neonatal intensive care unit. *Ann Trop Paediatr*. 2007;27:45-54.
23. Amos GC, Hawkey PM, et al. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014 Jul;69(7):1785-91. PubMed PMID: 24797064. Pubmed Central PMCID: 4054988.
24. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*. 2009;75:435–41.
25. Chagas TP, Seki LM, et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of applied microbiology*. 2011 Sep;111(3):572-81. PubMed PMID: 21672095.
26. Zhang SH, Lv X, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes in antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates in surface water of Taihu Lake Basin, China. *Environmental science and pollution research international*. 2015 Aug;22(15):11412-21. PubMed PMID: 25813640.
27. Farmer J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. *Manual of clinical microbiology*. 6 ed: American Society for Microbiology; 1995. p. 440.
28. Palacios E, Rodríguez J, et al. Utilidad del medio cromogénico MPO en el procesamiento habitual del urocultivo. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2002;20:388-90.

29. Knirel Y, Kochetkov N. The structure of lipopolysaccharides of gram negative. I. General characterization of the lipopolysaccharides and the structure of lipid A (A review). N D Zelinskii Institute of Organic Chemistry. 1993;58:166-81.
30. Koneman. Enterobacteriaceae. Diagnóstico microbiológico Texto y atlas en color. 6 ed: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 215-25.
31. Leboffe M, Pierce B. Identification System for Enterobacteriaceae and Other Gram-negative Rods. A Photographic Atlas of the Microbiology Laboratory. 4 ed: Morton Publishing; 2011. p. 57-94.
32. Amaya E. Antibiotic resistance in Gram-Negative bacteria affecting children from León, Nicaragua. Journal of medical microbiology. 2010.
33. Moller N, Rosdahl N. Microbiological resistance promoted by misuse of antibiotics: a public health concern. Eur J Public Health. 1998;8:193-4.
34. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs. 2004;64(2):159-204. PubMed PMID: 14717618.
35. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004 Jan;10(1):12-26. PubMed PMID: 14706082.
36. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochimica et biophysica acta. 2009 May;1794(5):808-16. PubMed PMID: 19100346. Pubmed Central PMCID: 2696358.
37. Torres JA, Villegas MV, et al. Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria. Expert review of anti-infective therapy. 2007 Oct;5(5):833-43. PubMed PMID: 17914917.
38. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. American journal of infection control. 2006 Jun;34(5 Suppl 1):S20-8; S64-73. PubMed PMID: 16813978.

39. Hernandez W, Ramos A, et al. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). *Rev Cub Med Int Emerg.* 2006;5(1) 256-64.
40. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews.* 2001 Oct;14(4):933-51, table of contents. PubMed PMID: 11585791. Pubmed Central PMCID: 89009.
41. Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1990 May;34(5):858-62. PubMed PMID: 2193623. Pubmed Central PMCID: 171706.
42. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2004 Jan;48(1):1-14. PubMed PMID: 14693512. Pubmed Central PMCID: 310187.
43. Fang H, Ataker F, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *Journal of clinical microbiology.* 2008 Feb;46(2):707-12. PubMed PMID: 18094139. Pubmed Central PMCID: 2238137.
44. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews.* 2009 Jan;22(1):161-82, Table of Contents. PubMed PMID: 19136439. Pubmed Central PMCID: 2620637.
45. Pasteran F, Mendez T, et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology.* 2009 Jun;47(6):1631-9. PubMed PMID: 19386850. Pubmed Central PMCID: 2691115.
46. Alonso A, Sanchez P, et al. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology.* 2001 Jan;3(1):1-9. PubMed PMID: 11225718.

47. Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*. 2006 Jul;8(7):1137-44. PubMed PMID: 16817922.
48. Landgren M, Odén H, et al. Biochemical Phenotyping with the PhenePlate™ System. The Swedish External Reference Laboratory for Susceptibility Testing, Karolinska Institute, Stockholm. <http://www.phplate.se>.
49. Patel BR, Cockerill FR, 3rd, et al. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth informational supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
50. Amaya E, Reyes D, et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. *Journal of medical microbiology*. 2011 Feb;60(Pt 2):216-22. PubMed PMID: 20965916.
51. Bizzarro MJ, Gallagher PG. Antibiotic-resistant organisms in the neonatal intensive care unit. *Seminars in perinatology*. 2007 Feb;31(1):26-32. PubMed PMID: 17317424.
52. Salinas C, Hernández A, et al. Colistin en el tratamiento de infección por *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente. *revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y terapia intensiva*. 2010;24(4):173-7.

13.Anexos

Cronograma de Actividades

Actividades	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
Elaboración del Protocolo							
Revisión de protocolo							
Recolección, transporte y procesamiento							
análisis de los resultados							
Escritura del informe final							

Imagen A. Posible ruta de transmisión de bacterias antibiótico resistentes por medio de las aguas residuales hacia las aguas de recreación.

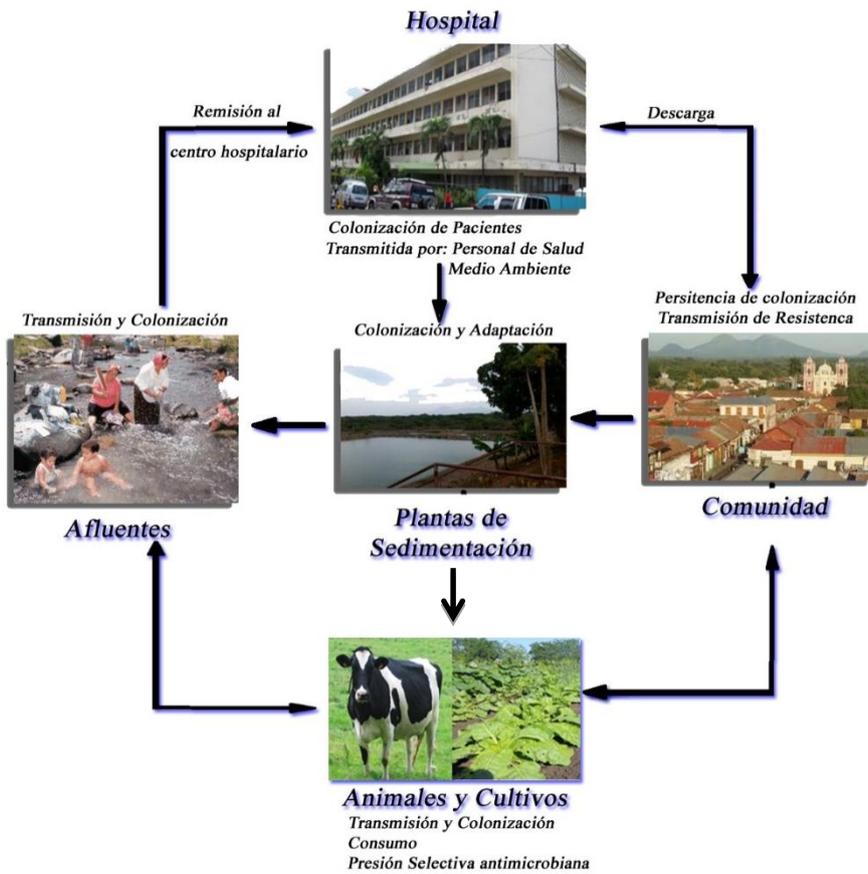


Imagen 1. Diseño metodológico utilizado en el estudio

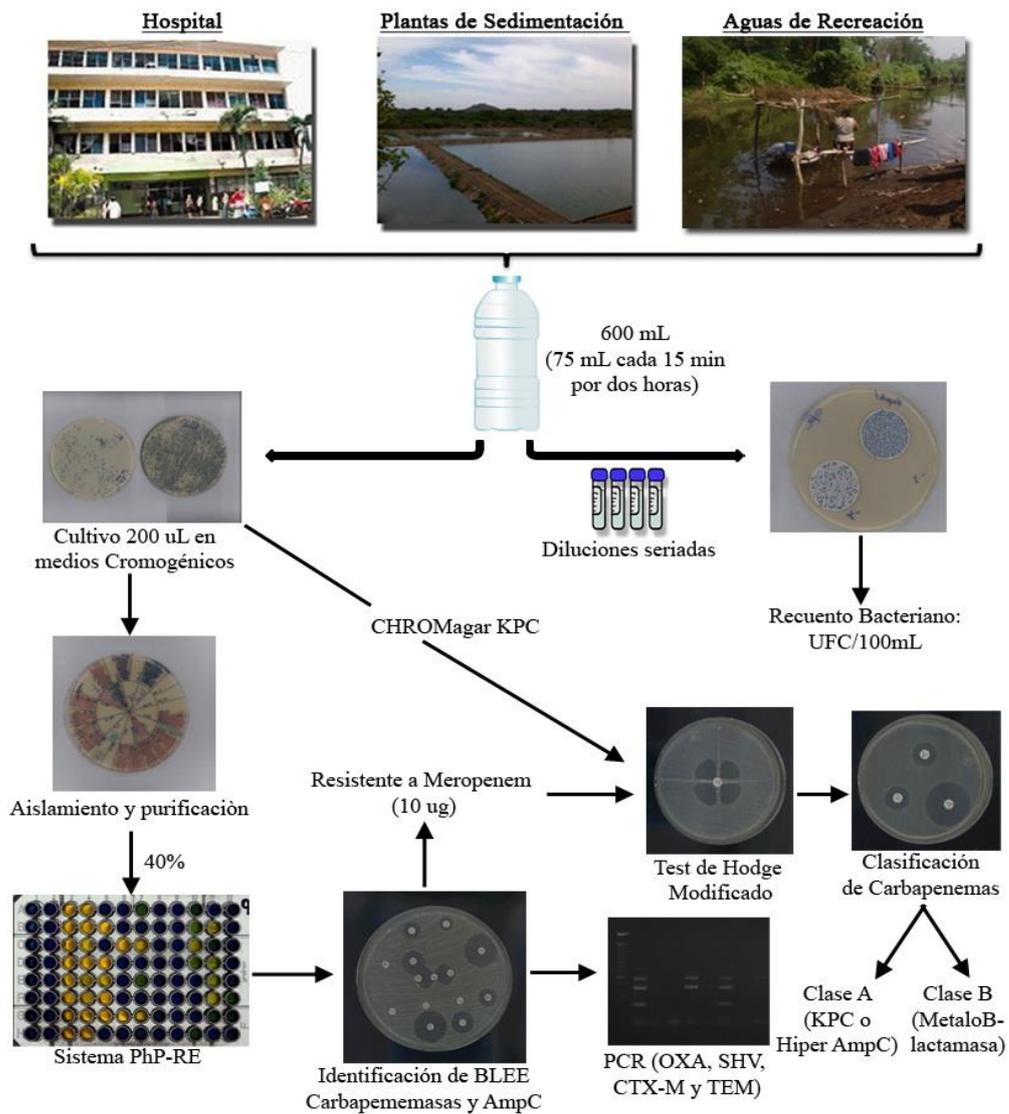
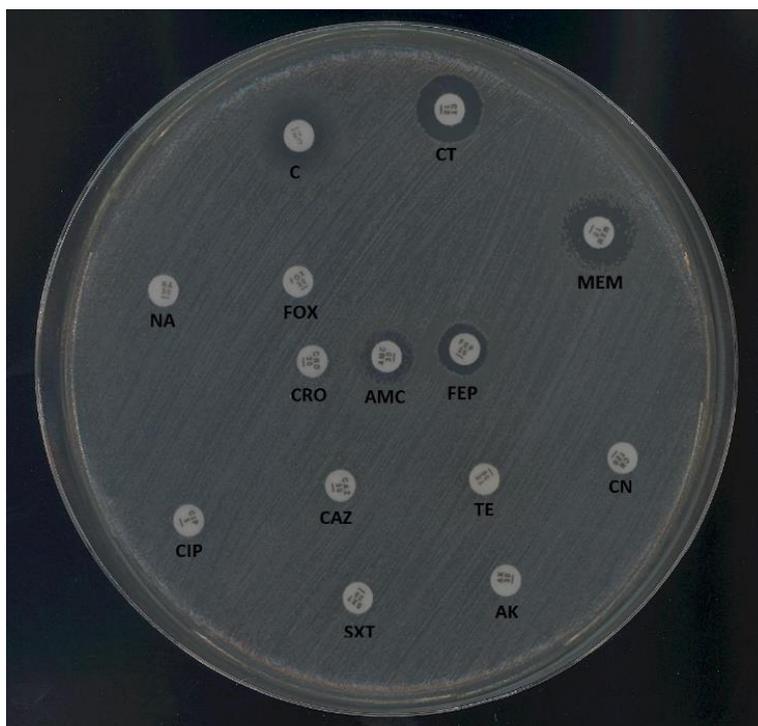
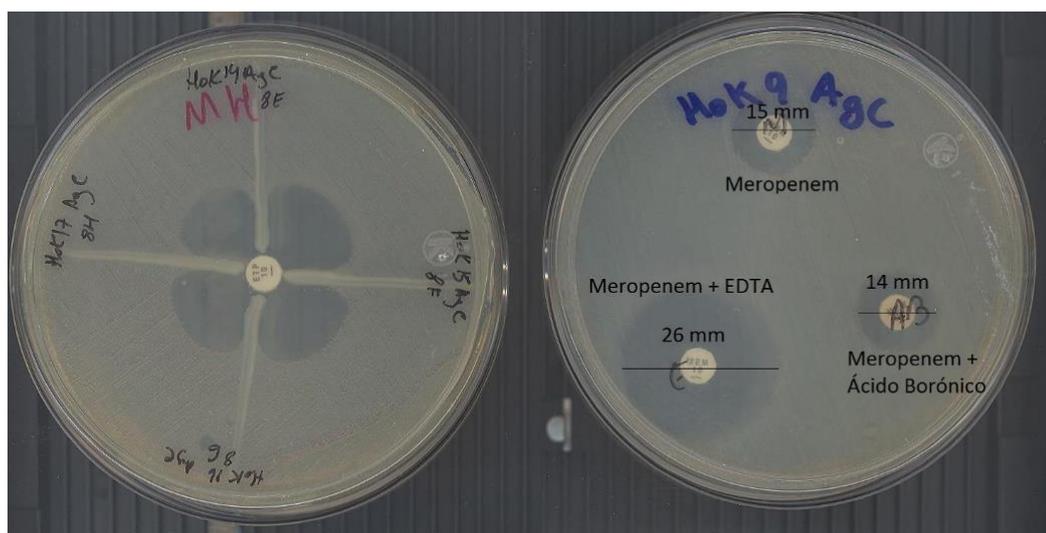


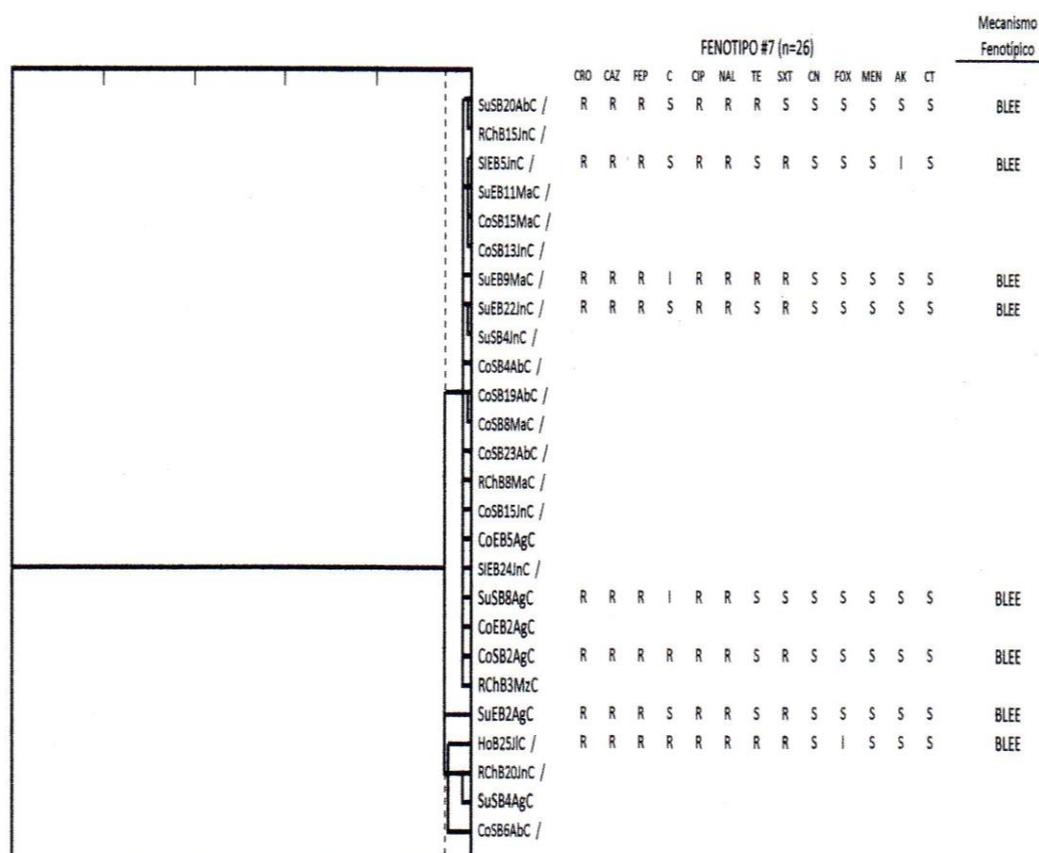
Imagen 2. Patrón fenotípico de resistencia de las *E. coli* productoras de KPC

El aislado muestra resistencia a todos los antibióticos probados, excepto Colistine

Imagen 3. Identificación de Carbapenemasas mediante el Test de Hodge modificado (Izquierda) y Clasificación de Ambler por medio de Discos con inhibidores (Derecha)

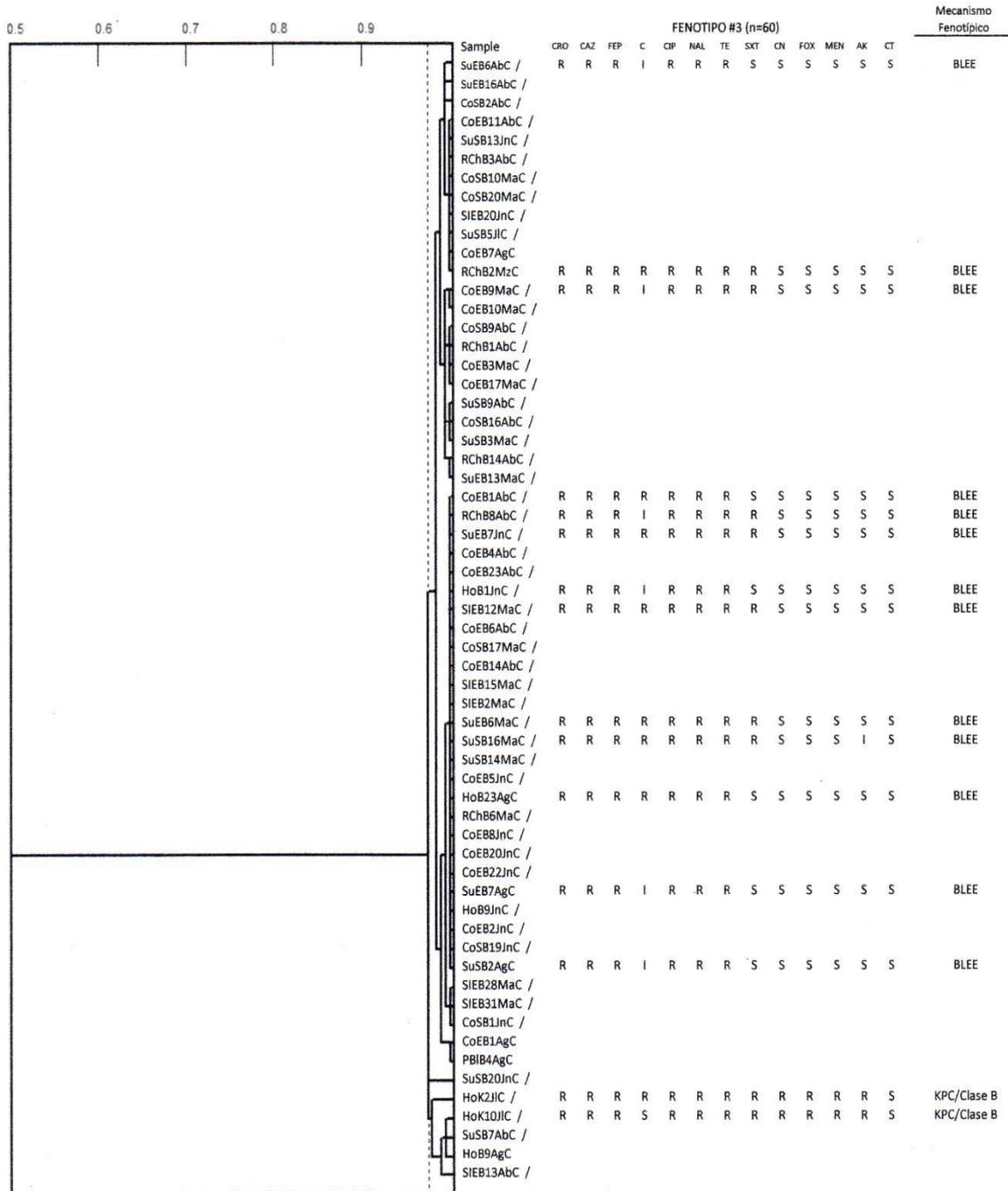
Izquierda: 4 aislados con Test de Hodge positivos. Derecha: Aislado identificado como Metalobetalactamasa o Clase B de Ambler

Gráfico 6: Dendograma fenotipo 7 (n=26). En este fenotipo de observan aislados de las tres plantas estudiadas, Hospital y Rio Chiquito.



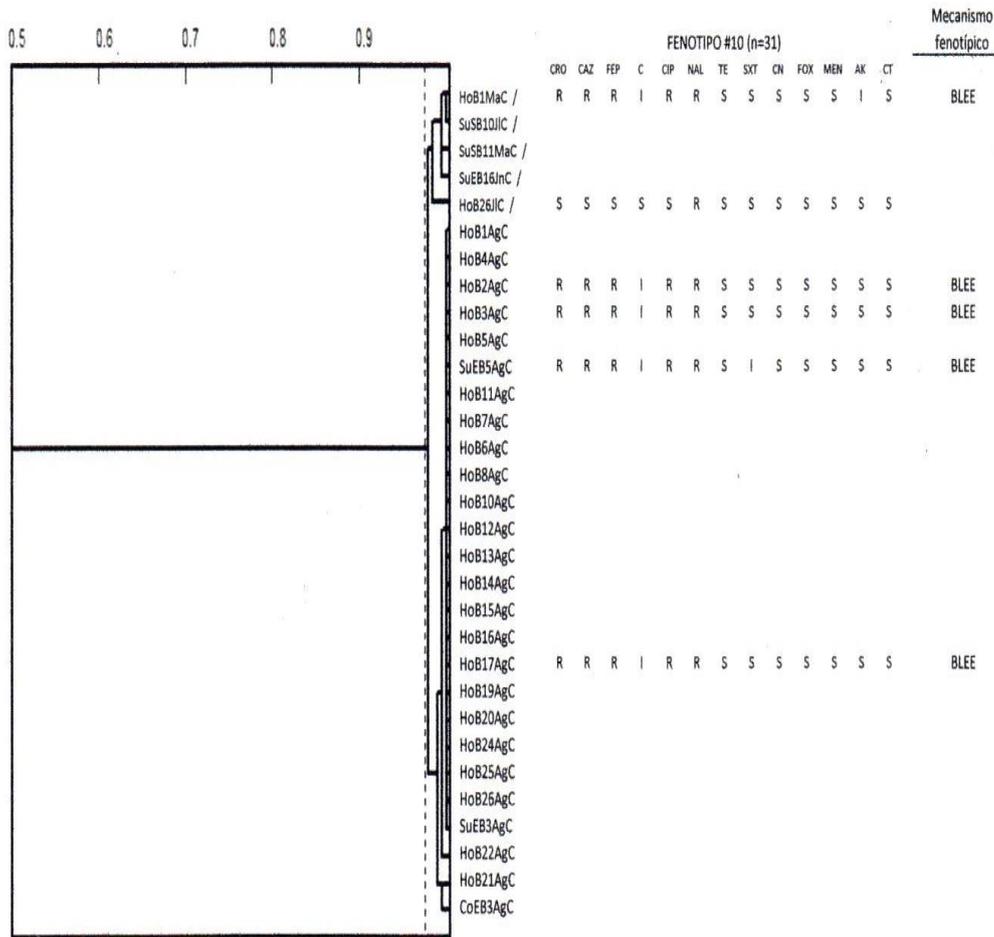
R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible. CRO: Ceftriazona (30), CAZ: Ceftazidime (30); CEF: Cefepime (30); C: Cloranfenicol (10); CIP Ciprofloxacina (5); NAL: Ácido Nalidixico (30); TE: Tetraciclina (30); SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol (25); CN: Gentamicina (120); FOX: Cefoxitina (30); MEM: Meropenem (10); AK: Amikacina (30); CT: Colistina (10). Rango de Inhibición tomados del WHONET 5.6 (CLSI 2015)

Gráfico 7: Dendograma fenotipo 3 (n=60). En este fenotipo de observan aislados de las tres plantas estudiadas, Hospital, Punto Blanco y Rio Chiquito. Se observan 13 de los aislados identificados fenotípicamente BLEE y 2 identificados como KPC Clase B.



Cloranfenicol (10); CIP Ciprofloxazina (5); NAL: Ácido Nalidixico (30); TE: Tetraciclina (30); SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol (25); CN: Gentamicina (120); FOX: Cefoxitina (30); MEM: Meropenem (10); AK: Amikacina (30); CT: Colistina (10) Rango de Inhibición tomados del WHONET 5.6 (CLSI 2015)

Grafico 8: Dendograma fenotipo 10 (n=31). En este fenotipo se observan aislados de las dos plantas estudiadas y Hospital. Se observan 5 de los aislados identificados como BLEE.



R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible. CRO: Ceftriazona (30), CAZ: Ceftazidime (30); CEF: Cefepime (30); C: Cloranfenicol (10); CIP Ciprofloxazina (5); NAL: Ácido Nalidixico (30); TE: Tetraciclina (30); SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol (25); CN: Gentamicina (120); FOX: Cefoxitina (30); MEM: Meropenem (10); AK: Amikacina (30); CT: Colistina (10) Rango de Inhibición tomados del WHONET 5.6 (CLSI 2015)

Procedimiento 1: Soluciones del sistema PhenePlate (PhP)

Para la realización del PhP-RE se preparó el medio de suspensión, el cual se obtiene a partir de la solución madre de azul de Bromotimol (0.11%) y el Búffer Fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$)

a) Solución Madre Azul de Bromotimol (0.11%)

- Pesar 1.1 gr de azul de bromotimol
- Disolver en 900 ml de agua destilada.
- Añadir 10 ml 1M de NaOH y disolver cuidadosamente
- Aforar a 1000 ml

Nota: NaOH 1 M se prepara pesando 40 gr de NaOH y diluirlo en 1000 ml. Esta solución es suficiente para preparar 10 litro del medio de suspensión de PhP

b) Preparar Buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$) 7.5 pH al 0.2 M

El NaH_2PO_4 tiene un peso molecular de 120 g/mol, para preparar 1 lt al 0.2 M se hace la siguiente forma:

$$\frac{0.2 \text{ M}}{1 \text{ lt}} \times 1 \text{ lt} = 0.2 \text{ mol} \qquad 0.2 \text{ mol} \times \frac{120 \text{ gr}}{1 \text{ mol}} = 24 \text{ gramos}$$

El Na_2HPO_4 tiene un peso molecular de 141.99. Por tanto, preparar un 1 lt de solución 0.2 Molar se realiza de la siguiente manera:

$$\frac{0.2 \text{ M}}{1 \text{ lt}} \times 1 \text{ lt} = 0.2 \text{ mol} \qquad 0.2 \text{ mol} \times \frac{141.99 \text{ gr}}{1 \text{ mol}} = 28.4 \text{ gramos}$$

Pesar los gramos respectivos expresados anteriormente y aforar a 1 litro para obtener el buffer fosfato al 0.2 molar. Ajustar pH a 7.5

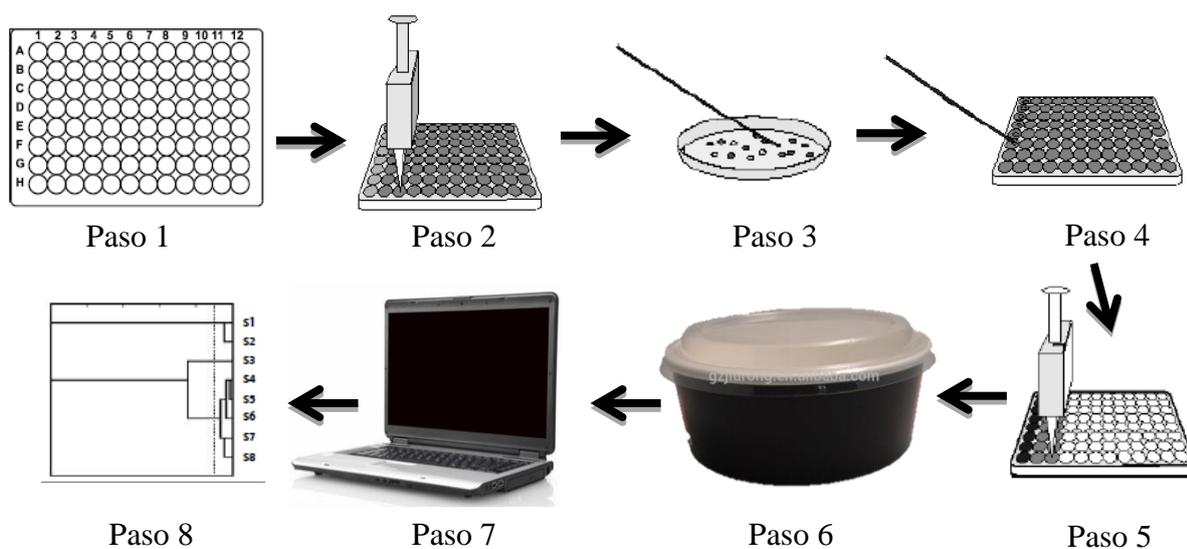
Nota: De no contar con Na_2HPO_4 , se puede utilizar $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM: 177.99), en este caso se requiere pesar 36 gr.

Para obtener el medio de suspensión para el PhP-RE, debemos de prepararlo de la siguiente manera:

- Pesar un gramo de proteasa peptona
- Agregar 8 ml de buffer fosfato 0.2 M (descrito anteriormente)
- Agregar 100 ml de la solución madre de Azul de Bromotimol (0.11%)
- Aforar a 1000 ml y Ajustar PhP 7.8-8.0 (con HCL y NaOH a 1M)

Procedimiento 2: Pasos para el análisis de PhPlate-RE

- 1) Preparar materiales
- 2) Dispensar 350 μL del medio de suspensión PhP en la primera columna de la placa (Pocillo de inoculación) y 150 μL en el resto de los pocillos
- 3) Inocular la muestra a procesar (Colonia bacteriana) con ayuda de un palillo estéril, homogenizar
- 4) dejar reposar 5 minutos
- 5) Transferir 12.5 μL del pocillo de inoculación a cada uno del resto de los pocillos (columna 2-12)
- 6) Colocar la placa en cámaras húmedas e incubar a 37°C
- 7) Realizar lectura colorimétrica utilizando un ordenador y un Scanner HP Scanjet 4890 a las 16, 40 y 64 horas.
- 8) Procesar lecturas utilizando PhPWin Software 6.0



Procedimiento 3: Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia

El método de Kirby-Bauer es el indicado para realizar las pruebas de susceptibilidad por el CLSI, este método es realizado en Agar Mueller Hinton, debido a que éste tiene una alta reproducibilidad debido a que contiene bajo contenido de sustancias inhibitoras, por lo que el crecimiento es satisfactorio para la mayoría de los patógenos no fastidiosos.

Procedimiento:

- Prepara platos de Mueller Hinton según fabricante
- Preparar la suspensión del inóculo de la escala de MacFarland
- Tomar una colonia de los medio cromogénico y disolverla en 2 ml de solución salina hasta alcanzar la turbidez al 0.5 MacFarland
- Con un hisopo estéril, introducirlo en el tubo con la suspensión e inocularlo en la placa con Mueller Hinton.
- Realizar un rayado de estrías completo en todo el plato.
- Dejar reposar por 5 minutos y colocar los antibióticos cuidadosamente.
- Meter a incubar el plato a 37°C por 24 horas.

Procedimiento 4: Identificación de Carbapenemasas por el Test de Hodge Modificado

El test de Hodge modificado es utilizado para la detección fenotípica de carbapenemasa. La inactivación de los carbapenémicos para la cepa productora de carbapenemasa permite el crecimiento del microorganismo indicador sensible a los lados de la estría efectuada con la cepa productora en una placa con un disco de carbapenémico. Esta prueba no permite identificar la clases de Carbapenemasa, para ello es necesario usar discos con inhibidores.

Procedimiento:

- Preparar platos con Agar Mueller Hinton según indicaciones del fabricante
- Preparar suspensión a 0.5 McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922, y posteriormente diluya 1:10 con solución salina.
- Inocular en platos con Agar Mueller Hinton realizando un estriado similar a la difusión en disco para Kirby-Bauer
- Dejar reposar la Cepa ATCC de 3-10 minutos y colocar disco de Ertapenem 10 µg en el centro del plato.
- Utilizando un asa de 10 µL o hisopo estéril, tome de 3-5 colonias crecida (24 horas después) en Agar Sangre y realizar una estría del borde del disco al borde del plato.
- Incubar por 24 horas a 37°C

Procedimiento 5: Prueba de Discos combinados para clasificación de Carbapenemasas

Esta técnica se basa en la actividad de los inhibidores junto al carbapenémico, la medición de los halos son comparados con la medición del carbapenémico (sin inhibidor), si la diferencia del halo es mayor de 5 mm, el resultado es positivo para la clase en dependencia del inhibidores. Para la clase A, el inhibidor utilizado es el Ácido Borónico y para la clase B es el EDTA.

Procedimiento

- Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina equivalente a un 0,5 de la escala McFarland
- Colocar un Disco de Meropenem, Meropenem+Ácido Borónico, Meropenem+EDTA Incubar a 35±2°C durante 16-20 horas

- Medir en mm los diámetros de las zonas de inhibición completa

Preparación Disco Meropenem+EDTA (10/1500 µg)

Para tener EDTA 1500 µg/10 µl se realiza de la siguiente manera:

El EDTA tiene un peso molecular de 372.22 gr/mol; Por tanto:

$$\frac{0.1 \text{ mol EDTA}}{1 \text{ L sol}} \times \frac{372.22 \text{ gr}}{1 \text{ mol EDTA}} = 37.22 \text{ gr/Lt}$$

$$\frac{0.1 \text{ mol EDTA}}{1 \times 10^6 \mu\text{l}} \times \frac{372.22 \text{ gr}}{1 \text{ mol EDTA}} \times 10 \mu\text{l EDTA} = 0.0003722 \text{ gr} = 372.2 \mu\text{g}$$

$$X = \frac{0.4 \text{ mol}}{1 \text{ lt}} = 0.4 \text{ M}$$

$$\frac{0.4 \text{ mol EDTA}}{1 \text{ lt sol}} \times \frac{372.22 \text{ gr}}{1 \text{ mol EDTA}} = 148.89 \text{ gr/L}$$

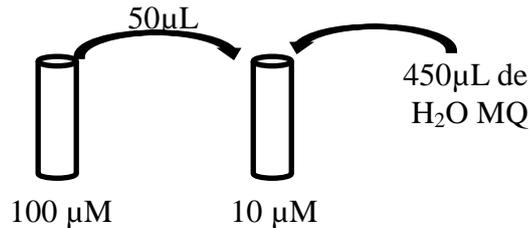
Para preparar EDTA 0.4 M, se debe pesar 148.89 gr de EDTA y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento 6: Detección de *E. coli* productoras de β -lactamasas tipo SHV, TEM, CTX-M y OXA; en técnica de PCR convencional

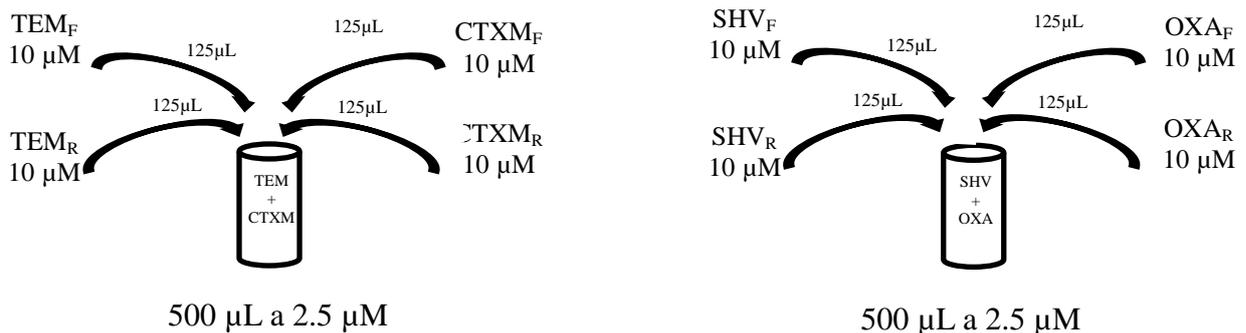
Pasos para preparar MasterMix a una concentración Final de 0.2 μ M:

- 1) Utilizando los primers de 100 μ M diluiremos F y R hasta 10 μ M de la siguiente manera: Tomamos 50 μ L de cada Primer de 100 μ M y lo diluimos en 450 μ L de Agua MQ.

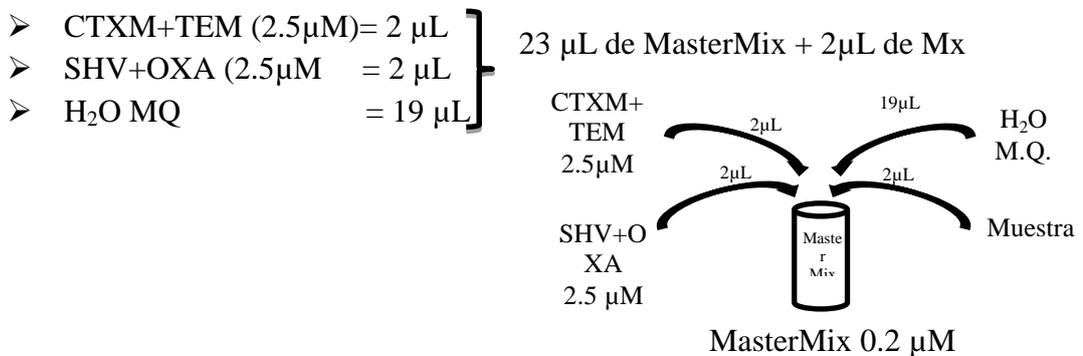
Nota: Se prepara F y R de cada gen ESBL (CTXM, SHV, OXA y TEM)



- 2) Utilizando los Primer a concentración de 10 μ M (Paso 1), se prepara una solución a una concentración de 2.5 μ M. Para mayor facilidad en la preparación se puede realizar de la siguiente manera:



- 3) Preparar el MasterMix a 0.2 μ M de los tubos de 2.5 μ M. Por cada muestra a procesar se necesitan 23 μ L del MasterMix el cual estará distribuido de la siguiente forma:



Preparación del gel de agarosa al 1.5%

Pesar 1.5 gramos de agarosa; agregar 100ml de TBE 1X y disolver por calentamiento sin ebullición, agregar 4 μ l de Bromuro de etidio cuando la solución no esté evaporando; para evitar la inhalación de gases, verter la solución aún líquida en la cámara electroforética; que previamente ha sido nivelada y se le ha colocado el peine.

Carga del gel

Mezclar 8 μ l del amplicón con 2 μ l de buffer de corrida y cargar cada pozo; el primer y último pozo se carga con la escalera de peso molecular.

La corrida electroforética del producto en el gel se hará pasar 100 voltios por 45 min. Transcurrido este tiempo se observará en el transiluminador UV.