

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



Tesis para optar al título de licenciatura en Bioanálisis Clínico.

Título

Caracterización fenotípica y genotípicas de bacterias antibiótico resistente aisladas del tubo gastrointestinal de aves *Columba livia* que circulan por el centro de la ciudad de León; en período de agosto 2016-agosto 2017.

Autora: Br. Mariam José Sánchez Velásquez.

Tutores: Dr. Erick Amaya, PhD.

Profesor Titular Departamento de Microbiología y Parasitología. UNAN, León.

Lic. Lester Gutiérrez.

Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas. UNAN, León

León. 2019

“A la libertad por la Universidad”

Caracterización fenotípica y genotípicas de bacterias antibiótico resistente aisladas del tubo gastrointestinal de aves *C. livia* que circulan por el centro de la ciudad de León.

Br. Sánchez M, Lic. Gutiérrez L, Dr. Amaya E PhD. Carrera de Bioanálisis Clínico, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-LEÓN.

Resumen

Las bacterias antibiótico-resistentes son una preocupación importante en la asistencia sanitaria, especialmente por el incremento de enfermedades causadas por bacterias Gram-negativas productoras de BLEE y KPC al poner en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento farmacológico. Según múltiples estudios realizados en Latino América, las aves *C. livia*, funcionan como reservorio de bacterias ARB de origen humano y son una fuente de esparcimiento de las mismas en el medio ambiente; el presente estudio caracteriza tanto fenotípica como genotípicamente bacterias ARB aisladas del tubo gastrointestinal de aves *C. livia* que circulan por el centro de la ciudad de León. Como método de tamizaje se realizó un ensayo previa captura de las aves; para el aislamiento presuntivo de bacterias productoras de BLEE y KPC, se utilizó CHROMAgar® con suplementos para BLEE y KPC, todos los aislados obtenidos fueron analizados para la identificación fenotípica del género bacteriano mediante pruebas bioquímicas. Los aislados sospechosos de ser productores de BLEE y KPC, fueron confirmados fenotípicamente por medio de Kirby Bauer (Sinergia de triple disco para BLEE) según las recomendaciones de CLSI 2012; test de Hodge modificado y Blue-Carba según protocolo Pires y cols (para aislados resistente a Carbapenémicos) y analizados genotípicamente por PCR -Convencional para la detección de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}. Se muestrearon un total de 80 aves *C. livia*, encontrándose que la tasa de transporte de bacterias antibiótico resistente fue del 31%, siendo *E. coli* (64%), *Klebsiella spp* (14%) *Enterobacter spp* (9%), *Serratia spp* (9%), y *Proteus spp* (4%) los géneros bacterianos identificados. Los mecanismo de resistencia fenotípicos identificados fueron: producción de BLEE 59%, resistencia a los carbapenémicos 18% e hiperproducción de AmpC 23%; siendo *E. coli* el productor de BLEE el fenotipo más frecuente (8/13). Del total de aislados productores de BLEE (n: 13), 6 codificaban genes de resistencia, *bla*_{CTX-M} (5) y *bla*_{TEM} (1), confirmados por ensayo PCR-Convencional. El 73% de los aislados que expresaron resistencia fenotípica y que no codifican los genes de resistencia, pueden expresar otros mecanismos como la hiperproducción de AmpC, cambios en las proteínas de la membrana externa, pérdida de porinas, modificación en la permeabilidad de sus membrana así como la expresión de bombas de eflujo inespecíficas.

Dedicatoria

A Dios por darme la inteligencia necesaria para finalizar con éxito este trabajo.

A mi mamá, por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

A mis tutores por guiarme en cada momento de este largo trayecto.

Br. Mariam Sánchez.

Agradecimiento

Agradezco en primer lugar al ser supremo, único dueño de todo saber y verdad por iluminarme y permitirme finalizar con éxito este trabajo.

A mis tutores, Dr. Erick Amaya y Lic. Lester Gutiérrez por su tiempo, paciencia y conocimiento brindado.

Br. Sindy Ruiz y Br. Ramón Delgado por su apoyo en la recolección de muestras.

A todo el personal del laboratorio de Microbiología y Parasitología que me brindó ayuda en la realización de este arduo trabajo.

Muchas gracias...

Abreviaturas

ARB:	Bacterias antibiótico -resistente
BLEE:	β -lactamasas de espectro extendido (por sus inglés en inglés).
CLSI:	Instituto de Estandarización de Laboratorio Clínico (por sus siglas en inglés)
Cols.,	Colaboradores.
<i>C. livia:</i>	<i>Columba livia.</i>
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli.</i>
HEODRA:	Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello.
H:	Horas
ICC:	Infusión cerebro- corazón (por sus siglas en inglés)
Km:	Kilómetro.
KPC:	Carbapenemasas.
LIA:	Lisina Hierro Agar (por sus siglas en inglés).
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
PBP	Proteína ligadora de penicilina (por sus siglas en inglés).
POE	Protocolo Operativo Estándar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto.
SS	Solución salina
SIM	Movilidad Sulfuro-Indol (por sus siglas en inglés).
<i>Spp</i>	Especies.

TSI: Triple Azúcar Hierro (por sus siglas en inglés)

VT: Volumen total

Índice

Resumen	I
Dedicatoria.....	II
Agradecimiento.....	III
Abreviaturas.....	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación.	5
4. Planteamiento del problema.....	7
5. Objetivos.....	8
5.1 Objetivo general	8
5.2 Objetivos específicos.	8
6. Marco teórico.	9
6.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana frente a antibióticos.	10
6.3 Biología molecular de bacterias productoras de BLEE.....	16
6.4 Biología molecular de bacterias productoras de AmpC.....	18
6.5 Biología molecular de bacterias productoras de KPC	19
6.6 Características biológicas de las aves <i>C. livia</i>	20
6.7 Resistencia bacteriana en aves <i>C. livia</i>	22
7. Materiales y métodos.....	23
7.1 Recolección de las muestras.....	24
7.2 Identificación inicial de bacterias sospechosas de ser productoras de BLEE y KPC.....	27
7.3 Identificación del mecanismo de resistencia fenotípica.....	28
7.4 Confirmación de resistencia fenotípica en aislados sospechosos de KPC.....	29
7.5 Identificación de los genes <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , y <i>bla</i> _{OXA} que codifican para BLEE ..	31
8. Operacionalización de las variables.	33
9. Resultados.....	34
10. Discusión.	39
11. Conclusiones	42
12. Recomendaciones.....	43
13. Referencias bibliográficas.....	44
14. Anexos	51



1. Introducción

La antibiótico-resistencia constituye un problema de salud pública de carácter mundial.⁽¹⁾ Importantes patógenos han adquirido resistencia al menos a un tipo de antibiótico y en muchos casos se han convertido en bacterias multirresistentes.⁽²⁾ Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede evadir la acción de los fármacos antimicrobianos,⁽³⁾ y que se produce cuando un microorganismo muta o cuando éste logra adquirir de genes de resistencia (que puede o no expresar) de forma que la farmacoterapia que se utilice para tratar la infección deja de ser eficaz.^(2, 3,4)

Latino América se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias antibiótico-resistente.^(1,4) En numerosos estudios realizados en Latino América se han aislado bacterias antibiótico-resistente en las excretas de las aves *Columba livia* (*C. livia*), incluso se considera que estas son potenciales reservorios de bacterias que presentan antibiótico-resistencia como *Chlamydia* spp, *Salmonella* spp y *Escherichia coli*.^(5,6,7,8) En Nicaragua, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en conjunto con los programas de vigilancia antimicrobiana han recomendado realizar estudios donde se pretenda identificar las posibles rutas de diseminación de bacterias antibiótico resistente con el fin de crear planes de intervención que minimicen su esparcimiento.⁽⁹⁾

Tomando en cuenta que existe de una considerable población de aves *C. livia* circulando en el centro de la ciudad de León y que depositan sus excretas en lugares públicos con acceso a la población general, así como la circulación de estas por el HEODRA, en las habitaciones de pacientes inmunológicamente comprometidos y por ende, propensos a contraer fácilmente infecciones causada por bacterias antibiótico-resistente, se debe considerar el riesgo potencial que implica *C. livia* en la transmisión de éstos patógeno. Además, según datos preliminares de este estudio, se aisló bacterias Gram negativas antibiótico-resistentes en excretas de las aves *C. livia*; que circulan en el HEODRA.



Por ello surge el interés de conocer si estas aves también acarrean bacterias antibiótico resistente en su tubo gastrointestinal funcionando así como posibles portadoras biológicas y por ello como vectores de dichas bacterias, y si estas aves también circulan fuera del hospital, otro dato que resultaría interesante, es conocer si la expresión de la antibiótico- resistencia en los aislados de interés se debe a la codificación de genes de resistencia o bien si éstos utilizan otro mecanismo frente a los antibióticos testados.

Por lo anteriormente expuesto, se plantea el siguiente estudio que pretende conocer las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias antibiótico- resistentes aisladas del tubo gastrointestinal de las aves *C.livia* que circulan por el centro de la ciudad de León. Éste estudio nos permitirá conocer el papel que juegan éstas aves en el esparcimiento de bacterias antibiótico resistente en el medio ambiente.



2. Antecedentes

Un estudio realizado en 2007 por Gonzales D y cols., en Chile, sobre la detección de agentes zoonóticos en las aves *C. livia*, demostró una tasa de transporte del 23% (n: 100); se identificó *Salmonella* (4%), *Chlamydiae psittaci* (11%) y *Staphylococcus aureus* (8%), en este estudio se considera a las aves *C. livia* como posible reservorios y transmisoras de agentes patógenos. ⁽⁶⁾

La OMS en una de sus publicaciones del año 2008, dedicó el capítulo octavo de su artículo “Significancia de las pestes urbanas en la salud pública” a la ave doméstica, refiriéndola como una peste por poseer microorganismos patógenos como parte de su flora normal atribuyéndole su papel como transmisora de agentes causales de numerosas enfermedades zoonóticas. ⁽¹⁰⁾

Un estudio realizado en Brasil por Da Silva y cols., en el 2009, sobre la ocurrencia de *E. coli* entero invasiva, *E. coli* productora de toxina Shiga, *E. coli* enteropatogénica y *E. coli* enterotoxigénica en excretas de aves *C. livia*, demostró que el 38% fue multiresistente a los antimicrobianos testado, siendo Amikacina el menos efectivo. ⁽⁷⁾

Otro estudio realizado por Da Silva y cols., en el 2012 por sobre la ocurrencia de *Enterococcus* en heces de las aves *C. livia*, y su susceptibilidad frente antibióticos, encontró que el 78% de los aislados fueron resistente frente al menos un tipo de antimicrobianos (cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacina y rifampicina). Además 18% presentó un índice de resistencia a múltiples antibióticos. ⁽¹¹⁾

En el 2012, en Bangladesh, Hasan y cols., realizaron un estudios en aves silvestres y aves de corral, la tasa de transporte de antibiótico resistencia en las aves muestreadas fue de 30% (27/90), identificaron resistencia a múltiples fármacos en el 22,7% en los aislados de *E. coli*; encontraron que la prevalencia de BLEE en aislados de *E. coli* fue de 54.5% (36/66) incluyendo clones de genes CTX-M entre aves silvestres y domésticas. ⁽⁸⁾



Hasan B, Laurell K y cols., realizaron otro estudio en León-Nicaragua el año 2012, en busca el gen *bla*_{CTX-M} compartido entre cepas *de E. coli* productora de BLEE en excretas de aves, seres humano sanos y animales salvajes; encontraron *E. coli* en los tres grupos en estudio con una prevalencia del gen *bla*_{CTX-M} en 27% en humanos, 13% en pollos y 8% en aves salvajes.⁽¹²⁾

En el 2015, en la Universidad de Pretoria, Sudáfrica, Chidamba L, y Korsten L, realizaron un estudio, sobre *E. coli* multirresistente en excretas frescas de aves *C. livia*, provenientes de tanques de recolección de agua de lluvia; encontraron resistencia a ampicilina (22.9%), gentamicina (23.6%), amikacina (24%), tetraciclina (17.4%) y amoxicilina (16.9%). Siendo éstas las frecuencias más altas encontradas.⁽¹³⁾

Según datos preliminares de este estudio, se aisló de bacterias Gram negativas antibiótico-resistente en excretas de aves *C. livia* que circulan por el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA).



3. Justificación.

Las bacterias antibiótico-resistentes son una preocupación importante en la asistencia sanitaria,⁽²⁾ especialmente el creciente número de bacterias Gram-negativas que producen BLEE y KPC, por ser causantes de numerosas enfermedades que pueden ser transmitidas fácilmente a personas internadas en los hospitales con inmunodeficiencias o que cursan con quimioterapia poniendo en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento farmacológico.⁽¹⁴⁾ Actualmente no solo se ha estudiado la relación de *Cryptococcus neoformans* con las aves del género *C. livia*, sino también la relación de bacterias productoras de BLEE y KPC en humanos y aves de diferentes especies.^(12,15,16) Según múltiples estudios realizados en Latino América, las aves *C. livia*, funcionan como reservorio de bacterias antibiótico-resistente de origen humano y como una fuente de esparcimiento de las mismas a través del contacto directo de las excretas de éstas aves con el aire, agua y fómites.^(5, 6, 7, 8,10, 16)

En Nicaragua, la OPS en conjunto con los programas de vigilancia de la resistencia antimicrobiana han recomendado realizar estudios donde se pretenda identificar las posibles rutas de diseminación de bacterias antibiótico resistente con el fin de crear planes de intervención que minimicen su esparcimiento.^(1, 9) Tomando en cuenta que existe de una considerable población de aves *C. livia* circulando en el centro de la ciudad de León y que depositan sus excretas en lugares públicos con acceso a la población general, así como la circulación de estas aves por el HEODRA, en las habitaciones de pacientes inmunológicamente comprometidos y por ende, propensos a contraer fácilmente infecciones causada por bacterias antibiótico-resistente, se debe considerar el riesgo potencial que implica la *C. livia* en la transmisión de éstos patógeno.

Según datos preliminares de este estudio, se aisló bacterias Gram negativas antibiótico-resistente en excretas de palomas *C. livia* que circulan por el HEODRA, por ello surge el interés de conocer si estas aves también acarrean bacterias antibiótico resistencia en su tubo gastrointestinal funcionando así como posibles portadoras biológicas y por ello como vectores de dichas bacterias, y si estas aves también circulan fuera del hospital.



Además es necesaria la identificación de las características fenotípicas de los aislados en estudio; otro dato que resultaría interesante, es conocer si la expresión de la antibiótico- resistencia en los aislados de interés se debe a la codificación de genes de resistencia o bien si éstos utilizan otro mecanismo frente a los antibióticos testados, esto nos permitirá conocer la circulación de los genes que codifican la antibiótico- resistencia en nuestro medio.

Por lo antes expuesto, se propone el presente estudio que pretende conocer las características fenotípicas y genotípicas de bacterias antibiótico resistentes aisladas del tubo gastrointestinal en la población de aves *C. livia* que circula por centro de la ciudad de León, éste estudio nos permitirá un mejor monitoreo del esparcimiento de bacterias antibiótico-resistente con el fin de conocer el papel que juega la ave *C. livia* en el medio ambiente como transmisora de bacterias antibiótico-resistente. Éste estudio generará nuevos conocimientos que permitirán proceder a planes de intervención en pro de la salubridad hospitalaria.



4. Planteamiento del problema.

¿Cuáles son las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias antibiótico resistente aisladas del tubo gastrointestinal de la población de aves *C. livia* que circula por el centro de la ciudad de León?

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias antibiótico resistente aislados del tubo gastrointestinal de la población de aves *C. livia* que circulan en el centro de la ciudad de León.

5.2 Objetivos específicos.

1. Identificar bacterias antibiótico resistente aisladas del tubo gastrointestinal de la población de aves *C. livia* que circulan por el centro de la ciudad de León.
2. Determinar las características fenotípicas de los aislados que expresen antibiótico- resistencia.
3. Identificar los genes que codifican para la producción β -lactamasas de espectro extendido en los aislados que expresen resistencia fenotípica a los β -lactámicos.



6. Marco teórico.

En países Latino-Americanos, las infecciones son la principal causa de consulta médica a nivel de atención primaria y representan la indicación más frecuente de antibióticos en pacientes ambulatorios, (14,17,18) estas infecciones pueden presentar serias complicaciones si son tratadas de manera inefectiva.⁽¹⁸⁾ La presencia y desarrollo de microorganismos sin expresión clínica en un huésped se denomina colonización.⁽¹⁹⁾ Las bacterias pueden producir infección cuando el sistema inmune de huésped está deprimido. ⁽²⁾

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 además de la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico.^(20,21) Estudios demuestran que, en los últimos años la antibiótico-resistencia ha aumentado en múltiples bacterias,^(1,3,9) constituyendo un importante problema para la elección de un antibiótico debido a que estos microorganismos han desarrollado sistemas de resistencia a diversos agentes antimicrobianos.^(2,3,4) Como resultado de un proceso evolutivo, las bacterias han desarrollado su capacidad de sobrevivencia en el huésped, utilizando diferentes mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmunitaria del hospedadero y consiguio la acción de fármacos para su tratamiento.⁽²¹⁾

Zoonosis, se refiere a enfermedades infecciosas de animales que se pueden transmitir a los humanos cuyos agentes etiológicos pueden ser: protozoarios, hongos, bacterias, clamidias o virus.^(22,23) La seriedad de estas infecciones y la susceptibilidad individual del huésped varían con la edad, estado de salud y estado inmunitario, aun cuando la intervención de terapia temprana es solicitada.⁽²⁴⁾ La habilidad de los microorganismos para hacer que una persona se enferme varía de acuerdo a la virulencia del agente patógeno, las dosis a la cual la persona es expuesta, así como la ruta de infección.^(24, 25)



Estudios realizados en Latinoamérica demuestran que las bacterias más comunes aisladas en las excretas de las aves *C. livia* son: *E. Coli*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Pseudomonas ssp*, *Estafilococos aureus*, *Shiguella ssp* y otras *Enterobacterias* ^(5, 6, 7, 8)

Los microorganismos patógenos poseen genes de virulencia que les da la capacidad de producir daño a un huésped susceptible ^(25,26) Es relevante conocer los mecanismos principales de resistencia antimicrobiana y las opciones terapéuticas en el caso de los principales patógenos que adquieren resistencia a diferentes fármacos. ^(21,25)

6.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana frente a antibióticos.

La resistencia antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. ^(1,2) Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especies. ⁽²⁶⁾

La terapia antimicrobiana, se realiza de manera empírica en la práctica clínica, ^(1,2) sin embargo el fracaso a los tratamientos obliga a identificar las cepas bacterianas y su patrón de resistencia antibiótica. ^(26,27) Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados, destacándose cuatro mecanismo principales. ^(25, 26,27)

➤ Producción de enzimas hidrolíticas

Las bacterias sintetizan enzimas periplásmicas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo así su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo. ^(28, 29) (Ver fig. 1). Actualmente se utilizan dos esquemas de clasificación para estas enzimas, uno se basa en la secuencia de aminoácidos (clasificación de Ambler), dando como resultado cuatro clases (A, B, C, y D) y el otro es una clasificación funcional propuesta por Bush y cols en 1995, basada en los perfiles inhibitorios e hidrolíticos de las enzimas y se designan con numerales grupo 1, 2, 3 y 4. Sin embargo, en el año 2010 se postula una clasificación funcional actualizada, basada en características específicas de cada enzima. ⁽³⁰⁾



B-lactamasas: son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo betalactámico. La producción de β -*lactamasas* es el mecanismo más frecuente de antibiótico- resistencia. ⁽²⁹⁾ Existen continuas mutaciones que producen expresión de β -*lactamasas* de espectro extendido (BLEE), manifestándose como resistencia a cefalosporinas de tercera generación. ⁽²⁸⁾ Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad a la enzima e impide la destrucción del antimicrobiano y de esta manera permite su acción (ácido clavulánico y sulbactam), (ver fig.1). ⁽²⁵⁾

El mecanismo de acción de los antibióticos que presentan un anillo β -lactámico, se basa en la inhibición de las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) impidiendo la polimerización y entrecruzamiento de cadenas de peptidoglicano, ⁽²⁹⁾ que aportan rigidez a la pared celular y dan protección a la membrana citoplasmática frente a desequilibrios osmóticos. ⁽²⁵⁾ Esta inhibición da lugar a una pared celular débil, que no es capaz de soportar el medio interno bacteriano y se rompe durante el proceso de división celular, llevando a una bacteriólisis. ⁽²⁹⁾ El fenotipo de resistencia a la penicilina mediado por β -*lactamasas* implica resistencia a todas las penicilinas excepto las semisintéticas, como la oxacilina y la cloxacilina. ^(25,29)

Para su detección se pueden utilizar discos impregnados con una cefalosporina cromogénica (nitrocefín) que al hidrolizarse en presencia de la β -*lactamasas* experimenta un cambio en su estructura, lo que resulta en un producto coloreado (naranja-rojo). ⁽²⁵⁾ Una prueba de β -*lactamasas* positiva indica resistencia a todas las penicilinas que mantienen su actividad antimicrobiana. ⁽²⁷⁾

La resistencia adquirida frente a tetraciclinas se relaciona con la alteración del sistema de transporte activo del fármaco al citoplasma, y el bombeo de éste hacia el exterior. ^(25,31) También puede deberse a la protección del ribosoma por medio de una proteína citoplasmática que impide la acción del antibiótico sobre la subunidad 30S ribosomal. ^(25,32)

En el caso de los carbapenémicos, las dos β -*lactamasas* que con mayor frecuencia se asocian a resistencia son las AmpC y las carbapenemasas. ⁽³⁰⁾



Las β -lactamasas tipo AmpC o cefalosporinas: están involucradas en la resistencia a las cefalosporinas más que a las bencilpenicilinas y cefemicidas. ^(30,32) No se inhiben ante la presencia del ácido clavulánico, tazobactam ni EDTA. ⁽³⁰⁾ Se encuentran codificadas en el gen AmpC que puede estar presente tanto en el cromosoma como en plásmidos. ⁽²⁹⁾ Con respecto a los carbapenémicos, AmpC presenta baja afinidad, sin embargo cuando hay sobreproducción de la enzima asociada con alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa, como puede ser pérdida de porinas o expresión aumentada de bombas de eflujo, es suficiente como para producir fenotipos de resistencia. ^(27,30,32)

Carbapenemasas: estas enzimas representan la familia más versátil de las β -lactamasas. ⁽³⁰⁾ Tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros β -lactámicos. ⁽²⁷⁾ Además presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles. ^(27,29) Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles. ⁽³⁰⁾ Se ha propuesto una clasificación en dos grupos:

a) Serin carbapenemasas, pertenecen a la clase molecular A o D de Ambler, hidrolizan penicilinas, cefalosporinas (en menor grado cefalosporinas de tercera y cuarta generación), monobactámicos y carbapenémicos. ⁽³⁰⁾ Su actividad hidrolítica depende del sustrato sobre el que actúan, por ejemplo, SME-3 y KPC-2 hidrolizan mejor el Imipenem que el Doripenem y son levemente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. ⁽³²⁾ Las carbapenemasas clase A pueden dividirse fenotípicamente en seis diferentes grupos, de los cuales cuatro grupos están formados por miembros de las enzimas SME, IMI/NMC-A, KPC y GES/IBC, que se caracterizan por tener en común tres motivos altamente conservados esenciales para su actividad, mientras que SHV-38 y SFC-1 constituyen cada una un grupo diferente. ⁽³⁰⁾ Estas enzimas usualmente se encuentran presentes en Enterobacterias, sin embargo han sido reportadas en aislamientos de *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella spp.* ^(26,27,30)



Por otra parte, las carbapenemasas llamadas **Oxacilinasas** se ubican dentro del grupo 2df de Bush (clase D de Ambler) descritas en 1980. ⁽³⁰⁾ Se caracterizan por su capacidad de hidrolizar cloxacilina y oxacilina (de ahí su nombre “oxacillinhidrolizing”), no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam (a excepción de OXA-27) y en general son inhibidas por el ácido clavulánico (menos OXA-23 que es resistente). ^(27,30)

b) Metallo- β -lactamasas (MBLs) que corresponden a la clase B de Ambler y 3a y 3b en la clasificación de Bush denominadas así por la dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento; este es quizá el grupo más relevante de carbapenemasas debido tanto a su diversificación estructural como a su diseminación prácticamente mundial y en diferentes especies bacterianas. ^(25,26,30) Son enzimas que típicamente hidrolizan todos los β -lactámicos excepto monobactámicos y son inhibidas por quelantes de iones metálicos tales como EDTA, ácido dipicolínico o 1,10- σ -phenantrolina. ⁽³⁰⁾

Estos grupos difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores. ⁽²⁷⁾

➤ **Modificación del sitio activo**

La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. ⁽²⁵⁾ (Ver fig. 1)

Modificación de PBP: El PBP (penicillinbinding- protein) es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular de bacterias principalmente en Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los β -lactámicos, éstos fármacos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos. ^(25,33)

Modificación ribosomal: los genes *erm A* y *erm B* producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. ⁽²⁵⁾ Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en (grupo de antibióticos, Incluyen a la eritromicina y a la troleandomicina; los macrólidos se suelen emplear frente a bacterias Gram positivas y en pacientes alérgicos a las penicilinas), *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. ⁽³³⁾

➤ **Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano.**

Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria, es característico en bacterias Gram negativa; su membrana externa les confiere la capacidad de disminuir la afinidad del antimicrobiano por la pared celular. ⁽³²⁾ (Ver fig. 1)

➤ **Bombas de eflujo**

Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de drogas como fármacos ^(3, 4, 25) (Ver fig. 1)

Los genes involucrados son MefA (*Streptococcus pneumoniae*), NorA (*Staphylococcus aureus*) y Mex (*Pseudomona aeruginosa*). Estos genes explican la resistencia a antibióticos en estos patógenos. ⁽²⁵⁾ Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidores de bombas de eflujo. ^(25, 33, 34)

La diseminación de virulencia entre especies bacterianas se realiza mediante la transferencia horizontal de genes entre las bacterias, de ésta manera aseguran perpetuar la evolución de patógenos emergentes. ⁽²⁵⁾ (Ver fig. 2).

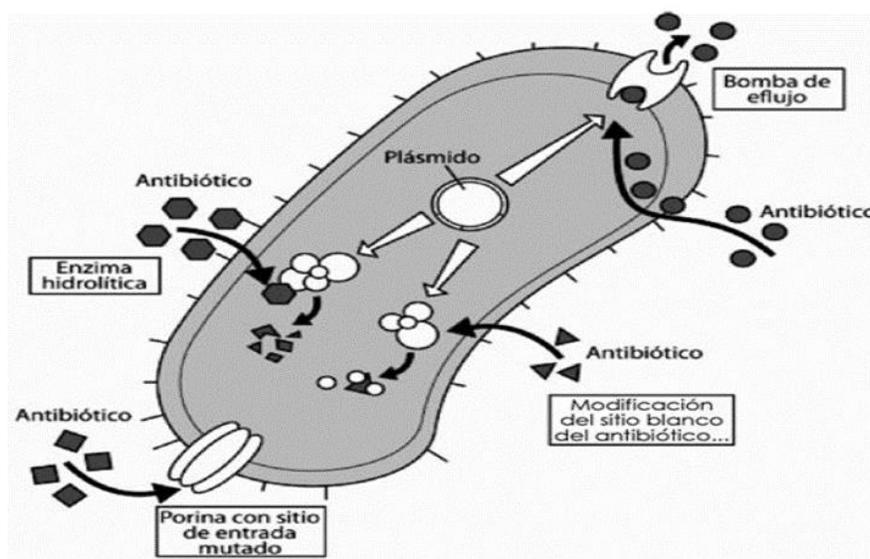


Fig. 1 Mecanismos de Resistencia antimicrobiana

6.2 Transferencia horizontal de genes.

La transferencia horizontal de genes es el traspaso de información genética entre bacterias, proceso diferente a la replicación. ^(25, 34, 35)

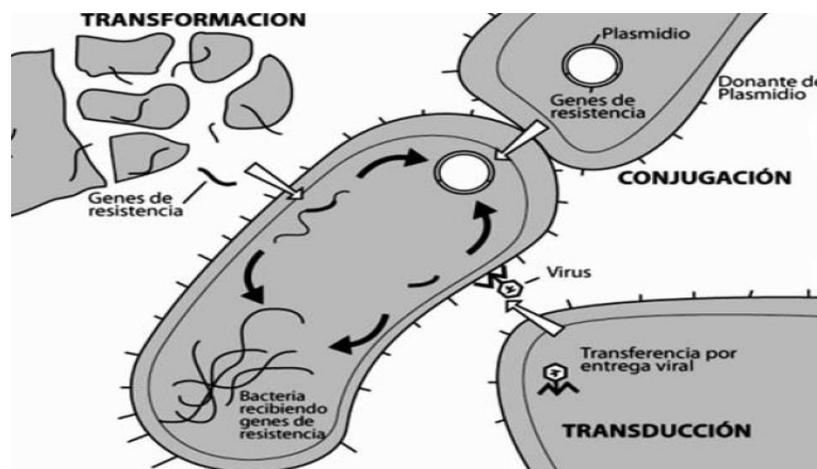
Permite la variabilidad genética y evolución bacteriana, generando la capacidad de adaptarse a las variaciones del medio. ⁽³⁵⁾ Las bacterias utilizan diversas vías para transferir información genética, éstas pueden ser: conjugación, transducción y transformación (Ver fig. 2). ^(25,36) Estos mecanismos son el mayor determinante en la evolución bacteriana, diseminando genes de virulencia. ⁽³⁵⁾ Es una transmisión dinámica que genera propiedades patogénicas a muchos agentes infecciosos. ⁽²⁵⁾

➤ **Conjugación**

Proceso mediado por plásmidos, que tienen la propiedad de transferirse de una célula a otra gracias a un contacto cercano entre ambas células mediante un poro de conjugación o pili sexual. ⁽²⁵⁾ Los plásmidos son elementos genéticos móviles, de forma circular, poseen replicación propia, es decir, independiente de la duplicación bacteriana. Dentro de su información poseen cassetes génicos que codifican para resistencia bacteriana. ^(4, 25) (Ver fig. 2)

➤ **Transducción**

Es la transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante un virus que infecta bacterias (bacteriófago). ⁽³⁵⁾ Este virus puede integrarse en el genoma bacteriano y al transferirse a otra célula puede llevar parte del genoma de esta bacteria y así transferir genes, entre ellos genes de resistencia antimicrobiana. ^(25, 35, 26)



➤ **Transformación.**

Es la captura de ADN extracelular del medio, que puede integrarse en el genoma y expresarse. ⁽²⁵⁾

Fig.2 Transferencia horizontal de genes. Se adquiere material genético por conjugación, traducción, y transformación.



El control de la prescripción de antimicrobianos permite cambiar patrones de resistencia, es fundamental mantener indicaciones correctas de acuerdo al diagnóstico planteado, seleccionando un tratamiento adecuado. ^(3, 4)

Esta estrategia puede disminuir el problema de resistencia. ⁽⁴⁾ Conocer los mecanismos de resistencia permite investigar nuevos blancos de acción para bloquear estos mecanismos, y así permitir la acción antimicrobiana deseada, como sucede con inhibidores de β -lactamasas. ^(3,4, 25)

6.3 Biología molecular de bacterias productoras de BLEE

Las BLEE, son una familia de enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, fundamentalmente Enterobacterias especialmente frecuentes en *E. coli*. ⁽³⁷⁾ Son capaces de inactivar, además de a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximinocefalosporinas y al aztreonam. ⁽³⁸⁾ Las cepas productoras de BLEE son multirresistentes, presentando resistencia a todos los betalactámico, excepto, a cefamicinas y a los carbapenémicos. ^(37,38)

Además, los plásmidos que codifican esta resistencia portan genes de resistencia a otros antibióticos, como cotrimoxazol, aminoglucósidos y tetraciclinas. ⁽²⁵⁾ La resistencia de las β -lactamasas plasmídica 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. ⁽³⁸⁾

El principal mecanismo de resistencia de las Enterobacterias es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), codificadas por los genes *bla* (TEM, SHV, CTX-M, entre otros), frecuentemente asociadas a plásmidos. ⁽³⁹⁾ Estos elementos extracromosómico suelen ser portadores de genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos, generando bacterias multirresistentes. ^(25, 37,38, 39)

Hasta los años noventa, la mayoría de BLEE eran principalmente los tipos TEM y SHV, se aislaban en *Klebsiella pneumoniae* implicadas en brotes hospitalarios en unidades de cuidados intensivos; posteriormente fueron desplazadas por las CTX-M que en la actualidad son las BLEE más frecuentemente aisladas. ^(26, 39)



E. coli está desplazando en forma paulatina, aunque con menor carácter epidémico a *Klebsiella pneumoniae*, siendo cada vez más frecuente el aislamiento de estas bacterias fuera del ámbito hospitalario. ^(26, 38)

En 1989 se detectó un aislado clínico de *Escherichia coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima, hasta la década de 2000, la mayoría de las BLEE eran estructuralmente relacionadas con el TEM de espectro reducido y de tipo SHV. ⁽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 monobactam (por ejemplo, aztreonam). ⁽³⁹⁾ 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*. ^(39,40)

Las β -lactamasas tipo OXA; la mayoría de OXA-10, se han descrito 11 variedades hasta la fecha, y aunque principalmente afectan a *Pseudomonas spp*, también se han descrito en Enterobacterias. ⁽⁴¹⁾ Hoy se conocen más de 160 variantes de TEM, la mayoría de ellas BLEE, pero también aquí se incluyen las enzimas IRT (inhibidor resisten TEM) y CMT (complex mutant TEM), más de 115 para SHV y más de 80 de CTX-M (clasificadas en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25), se han estudiado varias CTX-Ms, incluyendo CTX-M-15, que ahora es la enzima más extendida en todo el mundo, también hidrolizan CAZ eficiente y la cifra sigue creciendo. Además, aparecen nuevas BLEE como PER, VEB, GES, SFO, TLA, BEL, BES e IBC5. ^(39, 40, 41)

Las BLEE más frecuentes en la actualidad son TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTXM-32. ⁽³⁹⁾

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. ⁽⁴¹⁾



La técnica de PCR-Múltiplex para la detección de los genes que codifican para la producción de BLEE tipo TEM, SHV, OXA y CTX-M es un método fácil de realizar que garantiza alta sensibilidad y especificidad. ⁽⁴²⁾

6.4 Biología molecular de bacterias productoras de AmpC.

Las β -lactamasas tipo AmpC son cefalosporinas clínicamente importantes codificada en el cromosoma de muchos Enterobacterias y algunos otros organismos en los que median la resistencia a la cefalotina, cefazolina, cefoxitina, la mayoría de las penicilinas, y β -lactamasas combinadas con inhibidor β -lactámicos. ⁽⁴³⁾ En muchas bacterias, las enzimas AmpC son inducible y se pueden expresar en alto los niveles de mutación. ⁽⁴⁴⁾

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. ⁽⁴³⁾

Los plásmidos transferibles han adquirido genes de enzimas AmpC, por lo que ahora puede aparecer bacterias que carecen o mal expresa un gen *blaAmpC* cromosómica, tal como *E. coli*. ⁽⁴³⁾ 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 de detectar y más amplio en el espectro. ⁽⁴⁴⁾ La Enzima tipo AmpC es codificada por ambos genes cromosómicos y plásmidos, también están evolucionando para hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro más eficiente. ⁽⁴¹⁾ 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 (pérdida de porinas de membrana) o mejorar eflujo (activación bomba de eflujo). ⁽⁴⁵⁾



6.5 Biología molecular de bacterias productoras de KPC

La rápida emergencia y diseminación de Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos como Imipenem y Meropenem son una considerable amenaza para la terapia clínica del paciente y para la salud pública. ⁽⁴⁵⁾

Las cepas productoras de carbapenemasas son resistente a todos antibióticos β -lactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenems, así también a las fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cotrimazoles. ⁽⁴⁶⁾

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). ^(45,46) Dentro de estas clases, se hacen más divisiones y se encuentran con frecuencia nuevas variantes. ⁽⁴⁷⁾ La rápida aparición y propagación de cepas productoras de carbapenemasas es causada principalmente por las epidemias de bacterias que llevan enzimas KPC (clase A), VIM-1 y NDM (clase B) y OXA-48 (clase D). Los genes que codifican por las enzimas SME, IMI, NCM, SHV-8 y SFC- 1 se localizan principalmente en el cromosoma pero existen reportes de aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* que poseen enzimas SME, IMI y NCM presentes en plásmidos. ⁽³⁰⁾ Los genes *bla*GES residen en Cassettes genéticos principalmente dentro de integrones de clase 1, mientras que los genes *bla*KPC y *bla*IMI-2 están flanqueados por transposones ubicados dentro de plásmidos. ^(45,46, 47)

Las β -lactamasas tipo OXA se detectan principalmente en *A. baumannii*, habitualmente dentro de integrones situados en plásmidos o transposones, aunque ciertos casos se han asociado a secuencias de inserción. Sin embargo, también se han hallado más raramente en *K. pneumoniae*, *E coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y otras especies próximas como *Aeromonas spp.* ⁽³⁰⁾ En el caso de *P. mirabilis* las cepas aisladas en Francia describen la producción de OXA-23 a partir de un gen cromosómico. ^(30, 39,45)

Los genes MBLs pueden ser transportados en cassettes dentro de integrones, transposones, plásmidos, elementos denominados regiones comunes (CRs) que pueden o no ser transferibles, o estar insertos en el cromosoma, lo que le confiere a especies como *Stenotrophomonas maltophilia* resistencia intrínseca a los carbapenémicos. ⁽³⁰⁾ La adquisición de estos genes puede conferir resistencia a un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos y en algunas ocasiones pueden estar asociados con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, por lo que se pueden identificar bacterias con un fenotipo de resistencia a β -lactámicos y aminoglucósidos. ^(30,47) Dentro de las MBLs se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM. ⁽⁴⁷⁾ Las más importantes incluyen las familias VIM, IMP y SPM-1 las cuales han sido detectadas en cepas de *P. aeruginosa*, miembros de la familia Enterobacteriaceae y *A. baumannii*. ^(30, 45, 46,47)

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 carbapenemasa, las especies bacterianas y la presencia de otros mecanismos de resistencia tales como las BLEE, bombas de eflujo o las AmpC. ⁽⁴⁴⁾

6.6 Características biológicas de las aves *C. livia*



La paloma silvestre o mejor conocida como paloma doméstica, *Columba livia*, es una especie de ave columbiforme clasificada dentro de la familia Columbidae, nativa del sur de Europa y el norte de África, actualmente están distribuidas en casi todas las ciudades del mundo (ver Fig. 3). ⁽¹⁰⁾

La etimología de su nombre científico procede del latín *Columba*, que significa paloma, y su especie específica, *livia*, es la forma femenina del término *livor*, azulado. ^(6,16)

Fig. 3. Ave *Columba livia*

Las aves *C. livia* o palomas domésticas, a lo largo de la historia se han usado como mensajeras y como mascotas. ⁽⁴⁸⁾ En la antigua Roma se desarrolló la cría de palomas como complemento de



la agricultura, para consumo de carne y también con fines religiosos. ^(10, 48) En la edad media la cría de aves era un privilegio reservado a la nobleza. ^(6, 48)

Se caracterizan por anidar en las paredes rocosas, aunque habitan en infraestructura como parques, iglesias, plazas, mercados, plantas de procesamiento de granos y hospitales. Las aves adultas miden entre 29 y 37 cm de largo y tienen una envergadura alar de 62 a 72 cm; su peso oscila entre los 238 y 380 gramos. Presentan gran variedad de coloraciones, su plumaje es en general de color gris azulado, más oscuro en la cabeza, cuello y pecho; presentan matices verdes y violáceas. ⁽⁴⁹⁾

Las coberteras inferiores de sus alas son blanquecinas y la punta de las rémiges es negruzca. Su cola tiene una banda negra en el extremo rematada con un fino borde blanco. El iris de sus ojos es naranja, rojo o dorado, y tienen un fino anillo ocular desnudo gris azulado. Su pico es negruzco y presenta en su parte superior una llamativa cera blanquecina, y sus patas son de color rojo purpúreo. La hembra es muy similar al macho pero la iridiscencia de su cuello es menos intensa y más restringida a los lados y zona posterior, su pecho es menos voluminoso y oscuro. ^(48,49)

Suelen encontrarse en parejas en la época de reproducción, el resto del tiempo suelen vivir en manadas; se alimentan en el suelo en bandadas o individualmente de semillas, cereales, leguminosas, plantas herbáceas, frutos, insectos y gusanos. Son capaces de tragar agua de manera continua con la cabeza agachada y el pico sumergido. ^(10, 48)

La esperanza de vida de una paloma en la naturaleza oscila entre los tres y los cinco años. Por su viveza, su vuelo especial, su plumaje y su anatomía es considerada un auténtico atleta del aire, posee un esqueleto capaz de resistir el enorme trabajo que desarrollan sus músculos. Están dotadas de una gran rapidez de vuelo, equilibrio armónico de musculatura, plumaje abundante y suave con mínima resistencia al vuelo. Todo esto las hace capaz de volver al palomar desde una distancia superior a los 800 kilómetros a una velocidad promedio de 90 kilómetros por hora. ^(10,48, 49)



6.7 Resistencia bacteriana en aves *C. livia*

Se ha documentado que las aves *C. livia* son consideradas como plaga al actuar como una especie zoonótica, al ser un vector o transmisor de enfermedades. ^(10, 16, 50) Se han catalogado hasta 30 enfermedades transmisibles por estas aves al ser humano. ⁽⁵¹⁾ La mayoría de las personas que visitan parques u hospitales, suelen presentar algún grado de interacción con estas aves, desconociendo que el contacto con las mismas podría llegar a ocasionarles algún problema de salud; a pesar de ello existe una gran controversia respecto a las enfermedades que las aves pueden transmitir. ⁽⁵²⁾ De las enfermedades documentadas destacan la salmonelosis, aspergilosis, estafilocócicas, Cryptococosis, histoplasmosis entre otras. ^(6, 10)

Las bacterias resistentes a múltiples antibióticos son capaces de difundir su resistencia a través de diferentes vías, se ha propuesto que *C. livia* adquiera las bacterias antibiótico resistente por contacto directo con las mismas a través de aguas contaminadas; muchos antibióticos de origen industrial circulan en las aguas ambientales, lo que podría contribuir al esparcimiento del antibiótico resistencia; de igual manera, éstas bacterias pueden contener genes que codifican su resistencia de ésta manera pueden transferir dichos genes a otras bacterias por mecanismos antes mencionadas. ^(6, 10, 50) En el ambiente intrahospitalario la probabilidad de adquirir bacterias multirresistente aumenta considerablemente debido a las condiciones higiénico-sanitario. ^(1, 2, 6)

Sin embargo, esto no significa que la población de aves *C. livia* criadas en cautiverio no ejerzan un rol importante en el esparcimientos de éstas bacterias. ^(50, 51) Estudios realizados en Latino-América han identificados bacterias productoras de *B-lactamasas* y carbapenemasas de grupos de aves *C. livia* en ambas condiciones lo que sugiere que, éste especie de aves puede servir como un reservorio de bacterias antibiótico resistencia. ^(5, 6, 7, 8)

7. Materiales y métodos.

Tipo y área de estudio.

El estudio es descriptivo de corte transversal, realizado en el centro de la ciudad de León, durante el periodo de agosto de 2016 a agosto de 2017.

Muestreo

Se realizó un muestreo por conveniencia, analizando excretas recién depositadas e hisopados cloacales de las aves de la especie *C. livia*; las muestras fueron recolectadas en diferentes sitios, donde se observó mayor cantidad de aves:

A) Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA)

- Áreas de esperas ubicadas entre el segundo y tercer piso del Hospital.
- Ventanas ubicadas entre el segundo y tercer piso del Hospital.
- Azoteas ubicadas entre el segundo y tercer piso del Hospital.

B) Plaza Juan José Quezada (parque central de la ciudad de León).

Criterios de inclusión.

- Únicamente se seleccionaron aves del género *C. livia*.
- Se tomaron hisopados cloacales de las aves *C. livia* que fueron capturadas dentro de las instalaciones del HEODRA y en Plaza Juan José Quezada (Parque central de la Ciudad de León) y que no estuvieran marcadas con tinta china.
- Se recolectaron excretas de aves del género *C. livia* inmediatamente después de ser depositadas únicamente en las instalaciones del HEODRA.

7.1 Recolección de las muestras.

Se recolectó un total de 80 muestras (70 hisopados cloacales y 10 excretas), de los 70 hisopados cloacales, 40 procedían de las aves muestreadas dentro de las instalaciones del HEODRA y 30 del parque central de León; las 10 excretas obtenidas fueron recolectadas dentro del HEODRA. El muestreo se realizó durante 5 meses, recolectando 4 muestras por semana; las muestras fueron tomadas simultáneamente en ambos lugares.

Captura de aves *C. livia*

Se realizó una trampa que consistía en colocar una caja de cartón de 40 cm de largo por 80 cm de ancho dispuesta de manera horizontal abierta de las dos aletas de uno de los lados y sellada de las dos aletas del lado opuesto; sobre una pieza de madera de 20 cm de largo, ésta estaba sujeta a un cordón de 4 metros de largo en el extremo inferior; la pieza de madera fue colocada verticalmente, de manera que la caja reposaba sobre ésta formando un ángulo de 45°, las trampas fueron colocadas en puntos estratégicos donde se observe mayor cantidad de aves, bajo cada trampa se colocó una pequeña porción de trigo (Ver fig. 4).



Fig. 4. Trampas para capturar aves.

Una vez colocadas las trampas en sus respectivos lugares, se procedió a esperar hasta que las palomas se aproximaron lo suficiente en busca del trigo, cuando esto sucedió, se haló el cordón rápidamente, de manera que, la caja caía cubriendo a las palomas; inmediatamente se procedió a colocarse los guantes y abrir una de las aletas superiores de la caja (aletas previamente selladas) y tomar una a una las palomas capturadas.



(Cerrar cuidadosamente la caja que encierra las palomas restantes evitando su fuga). También se hizo uso de redes entomológicas que permitió capturar a las aves en espacios abiertos (ver fig. 4).

Toma de muestra. Hisopados cloacales.

Antes de realizar el muestreo se estandarizó la recolección de las muestras, y materiales a utilizar (Ver POE. Toma y procesamiento de hisopados cloacales en aves *C. livia*. *Sánchez M, Gutiérrez L, Vílchez S.* Laboratorio de Microbiología y Parasitología UNAN- León -Centro de Enfermedades Infecciosas CEI: 2; 2017).

Procedimiento:

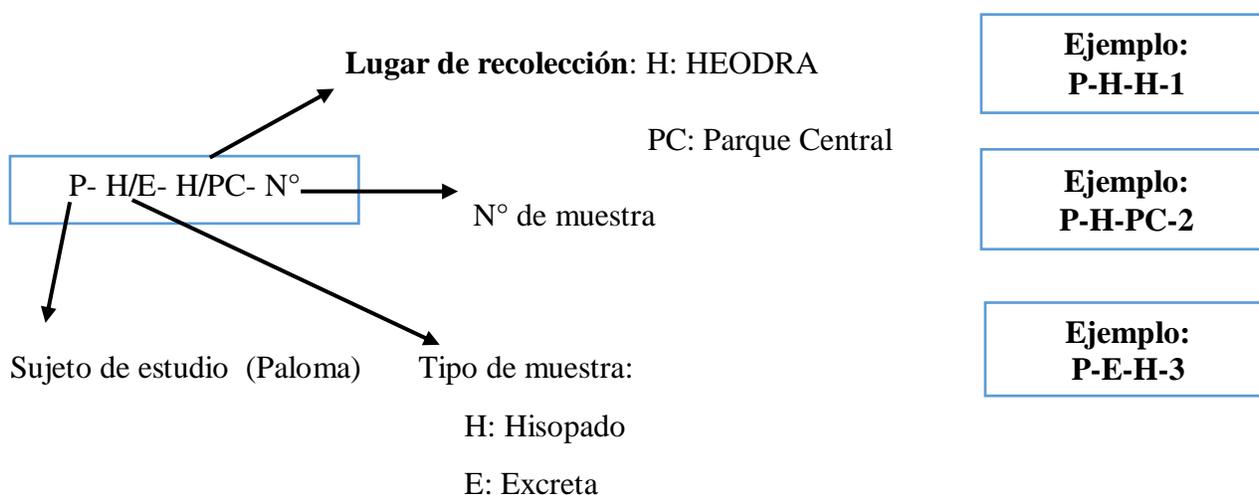
- ✓ Se realizó un hisopado del área perianal
- ✓ Se recolectó la muestra con un hisopo estéril, húmedo con solución salina al 0.87%, se localizó el área perianal, separando las plumas de la misma (no tocar el área donde se toma la muestra)
- ✓ Con el hisopo húmedo, se procedió a frotar el área, haciendo movimientos rotatorios; con sumo cuidado de no lastimar el área.
- ✓ Posteriormente, se introdujo el hisopo que contenía la muestra en un tubo (12 x 100)mm con 1 ml de SS al 0.87%,
- ✓ Usando un marcador permanente se rotularon los tubos con su código correspondiente.
- ✓ Los tubos previamente codificados, fueron sellados herméticamente y colocados en una gradilla en el interior de un termo, para ser transportadas al laboratorio del Centro de Enfermedades Infecciosas UNAN-LÉON
- ✓ Se procedió a marcar una de las extremidades inferiores de las aves muestreadas para evitar sesgo en el estudio; utilizando un gotero que contenía tinta china, se dejó caer tres gotas de la misma sobre el área. (Asegurarse que quede bien distribuido).
- ✓ Una vez terminado el muestreo, se dejó en libertad a las aves.
- ✓ Se repitió el procedimiento en el resto de la población de aves capturadas

Toma de muestra de excretas

Las muestras de excretas frescas fueron recolectadas inmediatamente después de ser depositadas, para ello se utilizó hisopos estériles y se depositaron en tubos con tapones estériles (22 x 75 mm) con 1 ml de solución salina 0.87%. Los tubos que contenían las muestras fueron debidamente etiquetados según el piso donde se recolectaron, posteriormente fueron transportadas al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León para su inmediato procesamiento.

Nota: Al momento de recolectar la muestra se tuvo la precaución de no tocar la superficie del suelo

Codificación de las muestras.



Transporte de las muestras.

Una vez se terminó de realizar la recolección de las muestras, se procedió a realizar el transporte, siguiendo el procedimiento:

- ✓ Las muestras colocadas en tubos (12 x 100)mm cerrados debidamente rotulados, fueron colocados en gradillas metálicas dentro de un termo para transportarlos hacia el laboratorio del Centro de Enfermedades Infecciosas UNAN-LÉON
- ✓ Las muestras fueron transportadas a 4°C en un tiempo no mayor de dos horas.
- ✓ Una vez las muestras estaban en el laboratorio, fueron procesadas inmediatamente.

Nota: En caso de no se realizar el procesamiento, guardar a 4°C no por más de 24 horas.

7.2 Identificación inicial de bacterias sospechosas de ser productoras de BLEE y KPC

Para la identificación fenotípica de bacterias productoras de BLEE y KPC, se hizo uso de agar cromogénico suplementados con antibiótico para BLEE y KPC. El medio cromogénico contiene moléculas incoloras solubles, compuestas de un sustrato, dirigida a una actividad enzimática específica, y un cromóforo. Cuando el conjugado incoloro cromogénico es escindido por el organismo objetivo, se libera el cromóforo y en su forma no conjugada el cromógeno exhibe un color distinto, formando un precipitado debido a la reducida solubilidad, mostrando un viraje de color característico al género bacteriano. Elaboración de agar cromogénico según fabricante CHROMAgar[®] (ver anexos, Procedimiento 1).

Nota: tanto hisopados como excretas se procesaron bajo las mismas condiciones.

Se procedió a centrifugar las muestras a 1000 rpm por 5 minutos, se sembraron 20 ul del sedimento puro y en dilución 1:2 con solución salina (SS) en medios de cultivo CHROMAgar[®] Orientation con suplementos para BLEE y KPC respectivamente, se hizo un rayado de agotamiento por estrías (ver fig. 5) se incubaron a 37⁰C durante 24 horas. De los aislados que se observó crecimiento en los medios CHROMAgar[®] con suplementos para BLEE y KPC se procedió a realizar la tinción de Gram (ver anexos, procedimiento 2). De los aislados sospechosos de ser productoras de BLEE y KPC, se purificaron las colonias en agar McConkey elaborado según fabricante (ver anexo, procedimiento 3). Para identificar fenotípicamente el género bacteriano, se inoculó de tres a cinco colonias características de los aislados purificados en agar McConkey en la batería de pruebas bioquímicas los cuales constaron de TSI, LIA, MIO, CITRATO (ver anexos, procedimiento 4).

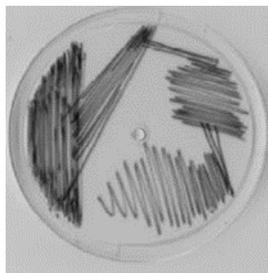


Fig. 5. Rayado agotamiento por estrías.

7.3 Identificación del mecanismo de resistencia fenotípica.

Los aislados positivos en CHROMAgar® para BLEE y KPC, se analizaron mediante el método de Kirby Bauer o método de difusión de discos, para identificar tres tipos de mecanismos de resistencia: producción de β -lactamasas de Espectro Extendido, Carbapenemasas e hiperproducción de AmpC, los aislados fueron testados con diferentes antibióticos siguiendo las recomendaciones del Instituto de estandarización del Laboratorio Clínico CLSI (ver anexos, procedimiento 5).

Los antibióticos se colocaron de manera estratégicos para la identificación de mecanismos de resistencia (ver figura 6). Amoxicilina con ácido clavulánico se usó para determinar sinergia de los aislados productores de BLEE. Se utilizó Imipenem y Meropenem para identificar la resistencia en los aislados productores de carbapenemasas, de igual manera, se utilizó Cefoxitin para identificar la resistencia antimicrobiana por hiperproducción de AmpC. Antibióticos utilizados (ver tabla 1)

Tabla 1. Antibióticos utilizados para identificación de resistencia fenotípica de β -lactamasas y carbapenemasas he hiperproducción de AmpC

SIM.	Nombre	μ g
CAZ	Ceftazidime	30
CRO	Ceftriazona	30
AMC	Amoxicilina + Á. Clavulánico.	10
IMP	Imipenem	10
MEM	Meropenem	10
FOX	Cefoxitin	30

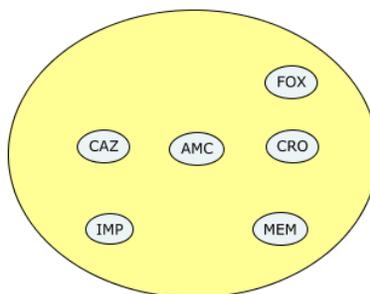


Figura 6. Posición de discos para la identificación de resistencia fenotípica de β -lactamasas, carbapenemasas y AmpC

Para su interpretación se tomaron los puntos de cortes estandarizados por CLSI para susceptibilidad antimicrobiana en Enterobacterias (ver anexos tabla 4).

7.4 Confirmación de resistencia fenotípica en aislados sospechosos de ser productores de carbapenemasas

Test de Hodge modificado.

Los aislados que mostraron resistencia fenotípica a los carbapenémicos mediante el test de Kirby Bauer, se confirmaron mediante el Test de Hodge modificado siguiendo los estándares del CLSI (ver anexos, procedimiento 6). El test de Hodge modificado es utilizado para la detección fenotípica de carbapenemasas. La inactivación de los carbapenémicos por el aislado productor de carbapenemasas permite el crecimiento del microorganismo indicador sensible (ATCC 25922) a los lados de la estría efectuada con la cepa productora en una placa con un disco de carbapenémico. Esta prueba no permite identificar las clases de Carbapenemasas (ver Fig. 7).

Un resultado positivo se pondrá de manifiesto por el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC en la parte de intersección entre el halo de inhibición que genera la difusión del antibiótico y la estría de la cepa que era objeto de nuestro estudio, formándose así una hendidura en la parte próxima al disco. Esto pone en evidencia la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que han sido liberadas al medio permitiendo así el crecimiento de *E. coli* ATCC



Fig. 7 Test de Hodge modificado. Todos los resultados en la imagen son positivos

Test de Blue-Carba

A los aislados que mostraron resistencia fenotípica a los carbapenémicos mediante el test de Kirby Bauer, y confirmados mediante el Test de Hodge modificado, se les realizó el test de Blue-carba, siguiendo las recomendaciones de Pires y cols. ⁽⁵³⁾ (ver anexos, procedimiento 7). Este método permite la detección rápida y específica de cepas productoras de carbapenemasas tipo Serin carbapenemasas y metalo betalactamasas en un tiempo menor de dos horas, sin embargo para la detección de carbapenemasas tipo OXA, esta prueba presenta menor sensibilidad, por tanto en escenarios con un aumento de la prevalencia de cepas productoras de OXAs-48 LIKE, un resultado negativo del test de Blue-Carba requerirá de pruebas adicionales para definir la presencia de este tipo de carbapenemasa.

El test de Blue-carba, es un método colorimétrico, que utiliza como indicador de pH el azul de bromotimol; cuando se produce la hidrólisis del Imipenem por la cepa productora de carbapenemasas, vira el color de azul a verde o amarillo. Un resultado positivo del Blue-carba indicará invariablemente una cepa productora de carbapenemasa.

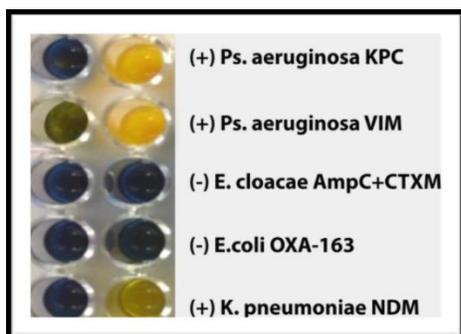


Fig. 8 Test Blue-carba. En la imagen, tres aislados son productores de carbapenemasas tipo KPC, VIM, y NDM; una cepa es productora de KPC tipo OXA-163 y una cepa que combina mecanismos de hiperproducción de AmpC con genes de resistencia tipo blaCTX-M confiriéndosele resistencia a los carbapenémicos sin producción de carbapenemasas.

7.5 Identificación de los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*-SHV, *bla*-TEM, y *bla*-OXA que codifican para la producción de BLEE en los aislados confirmados como resistente a los β -lactámicos

Todos los aislados confirmados como productores de BLEE (mediante pruebas de difusión en disco con sinergia de triple disco), y resistente a los Carbapenémicos fueron procesados mediante PCR Convencional para la identificación de genes *bla*_{CTX-M}, *bla*-SHV, *bla*-TEM, y *bla*-OXA (ver anexo, Procedimiento 8)

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN mediante el método de extracción en crudo por calentamiento a partir de los aislados de interés cultivados en agar Mueller Hilton. Con un asa estéril se tomó una asada del aislado bacteriano, se inoculó en tubos eppendorf con 500 μ l de agua libre de nucleasas (se homogenizó bien), posteriormente se sometió a lisis celular mediante calor durante 20 min a 100°C; luego se procedió a sedimentar los restos celulares mediante centrifugación durante 3 min a 13,000 rpm.

Se retiró el sobrenadante (que contenía el ADN) para transferirlo en un nuevo tubo eppendorf estéril de 1 ml debidamente rotulado con su código correspondiente.

PCR Convencional: El PCR para la detección de los genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido (*bla*_{CTX-M}, *bla*-SHV, *bla*-TEM, *bla*-OXA), se realizó utilizando cebadores universales (ver tabla 2). Para la amplificación del ADN por cada tubo de PCR se agregó las cantidades de mezcla (ver anexos, procedimiento 8) El programa de amplificación que se utilizó se observa en la figura 9. (ver POE Identificación de los genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido tipo *bla*_{CTX-M}, *bla*-SHV, *bla*-TEM Y *bla*-OXA por PCR convencional. Laboratorio de Microbiología Y parasitología UNAN-León).



Tabla 2. Primers para la detección de genes que codifican para BLEE, mediante por PCR multiplex.

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

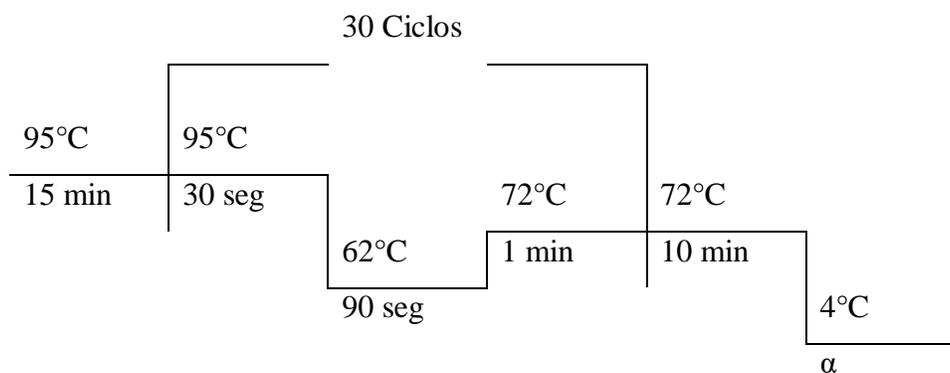


Figura 9. Condiciones de amplificación para genes bla_{CTX-M}, bla-_{SHV}, bla-_{TEM}, se utilizó un Termociclador ADN Thermal Cycler Applied Biosystems 2720. (Applied Biosystems, Foster, City, CA).



8. Tabla 3. Operacionalización de las variables.

Variable	Tipo de variable	Operacionalización		Indicador
		Escala	Descripción	
Tipo de muestra	Nominal	Hisopado Excreta	Espécimen de interés médico que se analizará mediante técnicas de laboratorio para determinar la presencia de un agente de interés	Frecuencia de ARB según tipo de muestra
Lugar de recolección	Nominal	HEODRA Parque Central de León	Localización geográfica donde se recolectan los datos y/o material biológico para la investigación.	Frecuencia de ARB según lugar de recolección
Susceptibilidad	Nominal Escalar	Sensible (S) Intermedio (I) Resistente (R)	Efecto detectable en el crecimiento bacteriano tras la exposición a un antimicrobiano; sinergismo, aumento o reducción de los diámetros en la formación de halos en una placa de cultivo.	Tasa de acarreo de ARB
Género bacteriano	Nominal	<i>E. coli spp</i> <i>Serratia spp</i> <i>Proteus spp</i> <i>Klebsiella spp</i> <i>Enterobacter spp</i>	Conjunto de cepas que comparten características metabólicas similares y que difieren de forma significativa de otros grupos. Se identifican en la batería de pruebas bioquímicas	Frecuencia de ARB según género bacteriano
Mecanismo de resistencia fenotípico	Nominal	BLEE Carbapenemasas AmpC	Capacidad intrínseca o extrínseca que puede o no expresar un microorganismo ante ciertas condiciones, ejemplos: la producción de enzimas bacterianas capaces de inactivar la acción de los fármacos. Las cepas productoras de BLEE hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos. Las productoras de Carbapenemasas hidrolizan β -lactámicos incluyendo cefalosporinas, y carbapenems; la sobreexpresión de AmpC confiere resistencia a cefalosporinas de amplio espectro. BLEE: Se observa sinergismo entre los antibióticos formando deformación de los halos de inhibición. Carbapenemasas: Reducción de los halos de inhibición AmpC: Reducción de los halos de inhibición.	Frecuencia del mecanismo de resistencia fenotípica según género bacteriano
Genes de resistencia	Nominal	bla _{CTX-M} bla _{-SHV} bla _{-TEM} bla _{-OXA}	Cassettes de ADN que pueden o no ser transmisibles, estos elementos de expresión genética natural o adquirido al incorporarse al genoma bacteriano se convierten en genes funcionales que pueden expresarse fenotípicamente.	Frecuencia de genes que codifican para la producción de BLEE

*ARB: bacterias antibiótico resistentes.



9. Resultados

Durante el período de agosto de 2016 a agosto de 2017, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, se procesaron un total de 80 muestras procedentes del tubo gastrointestinal de las aves *C. livia*, 70 de las muestras correspondían a hisopados cloacales y 10 a excretas frescas (Ver tabla 4).

De las 80 aves muestreadas; 50 de ellas fueron recolectadas en el HEODRA y 30 en el parque central de León. La tasa de transporte en las aves de estudio fue del 31% (25/80), es decir que el 31% de las aves muestreadas acarrean Bacterias Antibiótico-Resistente (ARB). Del 31% (25/80) de muestras positivas, 23 fueron recolectadas en el HEODRA y 2 en el parque central de León. La frecuencia de aves *C. livia* que acarrean ARB según el lugar de recolección, se muestra en la tabla 4.

Del 31% (25/80) de las muestras positivas, en 13 de ellas se obtuvo crecimiento de más de un género bacteriano; por tanto, se purificaron en total de 56 aislados. Se seleccionó el 40% (22/56) de los aislados purificados para realizar los análisis como se describen en materiales y métodos

El género bacteriano de mayor frecuencia identificado como antibiótico resistente, fue *E. coli*, la cual se identificó en 64% (14/22) de los aislados purificados (ver gráfico 1).

Tabla 4. Distribución del tipo de muestra con respecto al lugar de recolección.

Tipo de muestra	Lugar de recolección						Total
	HEODRA ¹ (n=20)		HEODRA ² (n:30)		Parque Central ² (n:30)		
	ARB	Negativa	ARB	Negativa	ARB	Negativa	
Hisopados	2	8	15	15	2	28	70
Excretas	6	4					10
Total	8	12	15	15	2	28	80

Bacterias Antibiótico-resistente (ARB); ¹ Mx recolectadas en 2016, ² Mx recolectadas en 2017.

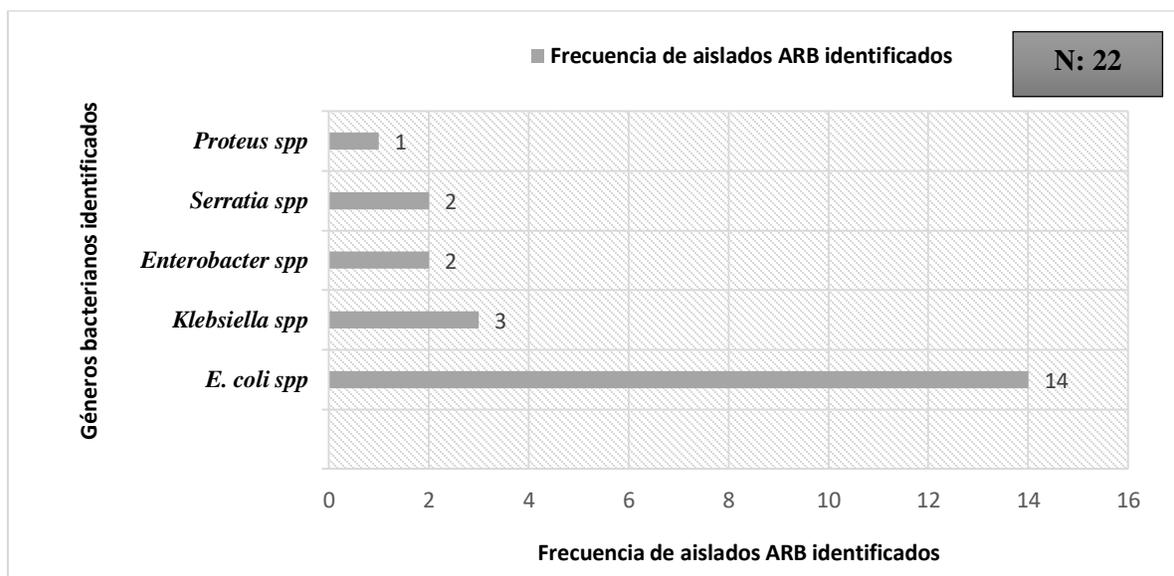


Gráfico 1. Frecuencia de aislados antibiótico- resistente (ARB) en relación al género bacteriano identificado.

Mediante el método de Kirby Bauer, se identificó mecanismos de resistencia expresados fenotípicamente, identificándose BLEE 59% (13/22), aislados resistente a carbapenémicos 18% (4/22) e hiperproducción de AmpC 23% (5/22). Los mecanismos de resistencia fenotípico identificado con mayor frecuencia fue la producción de BLEE en aislados de *E. coli* (8/14) de los aislados testados. Los mecanismos de resistencia fenotípicos mostrados por géneros bacterianos frente a los antibióticos testados se muestran en la tabla 5.

Los 22 aislados caracterizados fenotípicamente por Kirby-Bauer fueron procesados mediante PCR convencional para la detección de genes de resistencia (*bla*SHV, *bla*TEM, *bla*CTX-M Y *bla*OXA) y así contrastar con los resultados obtenidos fenotípicamente. (Ver fig. 10,11) La expresión de antibiótico- resistencia se debe a la codificación de genes *bla* testados en un 27% (6/22) de los aislados, identificándose *bla*CTX-M (5), *bla*TEM (1), *bla*SHV (0) Y *bla*OXA (0). El gen con mayor prevalencia fue de *bla*CTX-M el cual se identificó en 39% (5/13) de los aislados identificados como productores de BLEE, (Ver Tabla 5).



El 73% (16/22) de los aislados en estudio que expresaron resistencia fenotípica mediante el método de Kirby Bauer frente a los antibióticos testados no codifican genes de resistencia para la producción de BLEE, estos pueden utilizar otros mecanismos que les confiere resistencia antimicrobiana, como la hiperproducción de AmpC, modificación del sitio activo, pérdida de porinas y/o modificación en la permeabilidad de sus membrana. ⁽²⁵⁾ (ver tabla5)

Toda deformación de los halos contiguo a AMC fueron tomados como positivo para la confirmación de BLEE. La reducción de los halos de inhibición frente Cefoxitina, fue tomado como resistente a cefalosporina por hiperproducción de AmpC, la reducción de los halos de inhibición frente a los carbapenémicos fue tomado como sospecha de ser productores de carbapenemasas; para confirmar éste último, se realizó el test de Hodge modificado y test de Blue-Carba, resultando negativos en este último (ver tabla 5).

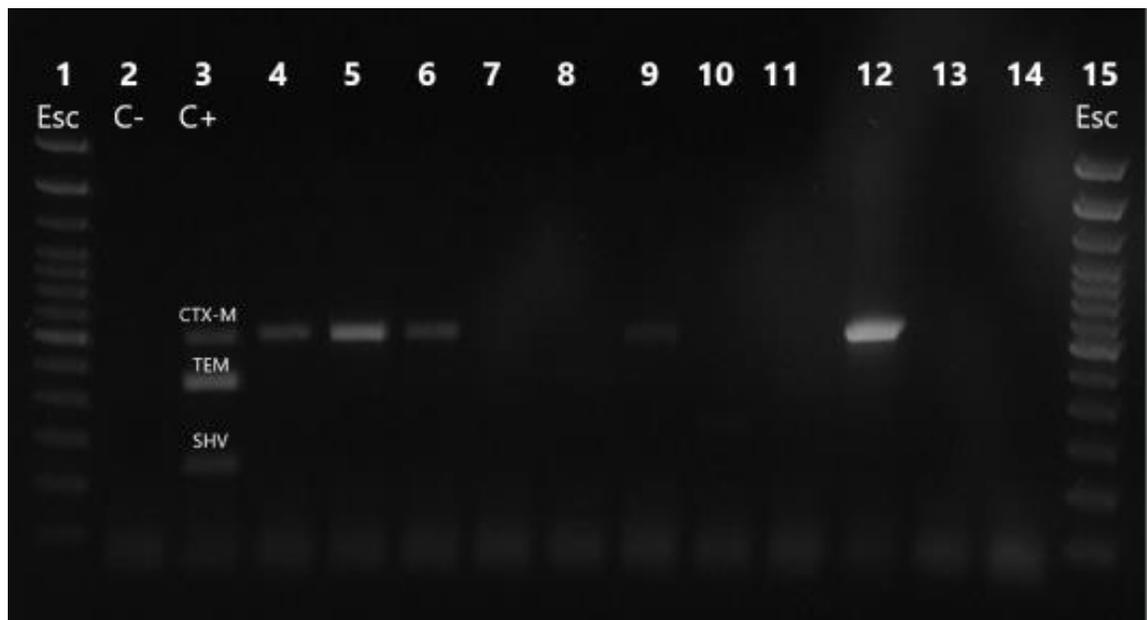


Tabla 5. Caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de interés según género bacteriano.

Código	Género bacteriano	Longitud de los halos de inhibición (mm)						Patrón fenotípica	Test de Hodge Modificado	Test de Blue-Carba	Expresión genotípica
		CRO	AMC	CAZ	IMP	MEM	FOX				
*P-E-H-41.1	<i>Serratia spp</i>	R	I	R	S	R	R	AmpC			-
*P-E-H-7	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	KPC	+	-	-
*P-E-H-41	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	R	S	BLEE			<i>bla</i> TEM
P-H-H-32	<i>E. coli</i>	R	I	R	R	R	I	KPC	-	-	-
P-H-H-21	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	R	S	BLEE			-
P-H-H-22	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	I	S	BLEE			-
P-H-H-24	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	R	S	BLEE			-
P-H-H-28	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	R	S	BLEE			-
P-H-H-30	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	KPC	-	-	-
P-H-H-31.1	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	KPC	+	-	<i>bla</i> CTXM
P-H-H-32.1	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	S	R	BLEE			-
P-H-H-33	<i>Klebsiella spp</i>	R	S	R	S	S	S	BLEE			-
P-H-H-34	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	S	S	BLEE			-
P-H-H-35	<i>Enterobacter spp</i>	R	S	R	S	I	R	BLEE			-
P-H-H-37.1	<i>Klebsiella spp</i>	R	S	R	S	S	R	BLEE			-
P-H-H-38	<i>Proteus spp</i>	R	I	R	S	I	R	AmpC			<i>bla</i> CTXM
P-H-H-38.1	<i>Enterobacter spp</i>	R	S	R	S	R	R	BLEE			<i>bla</i> CTXM
P-H-H-39	<i>Serratia spp</i>	R	R	R	S	I	R	AmpC			-
P-H-H-40	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	S	S	BLEE			<i>bla</i> CTXM
P-H-H-41.2	<i>E. coli</i>	R	I	R	S	S	R	AmpC			-
P-H-PC-51.1	<i>E. coli</i>	R	S	R	S	S	R	AmpC			-
*P-H-PC-51	<i>Klebsiella spp</i>	R	S	R	S	R	S	BLEE			<i>bla</i> CTXM

*Muestras recolectadas en el 2016

Fig. 10. Ensayo del PCR-Convencional para *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M*. Muestras



1, 15: Escalera de 100 pb; 2: Control negativo; 3: Control positivo (*blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*); 4, 5,6, 9,12: aislados positivos para el gen *blaCTX-M*, 8: aislado positivo para el gen *blaTEM*; 7, 10,11, 13,14: aislados negativos



Fig. 11. Ensayo del PCR-Convencional para genes *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaOXA* Muestras.

1,20: Escalera de 100 pb; 2: Control negativo; 3: control positivo (*blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*), 4: control positivo (*blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaTEM*), 5,7,9: aislados positivos para el gen *blaCTX-M*; 6,8,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19: aislados negativos



10. Discusión.

Las aves *C. livia* se consideran bioindicadores de diseminación ambiental de resistencia antimicrobiana, convirtiéndose en un grave problema de salud pública. ^(7,10, 16, 50) Se ha informado que estas aves son portadoras de bacterias productoras de BLEE, KPC y AmpC en muchos países, a menudo en altas tasas de transporte. ^(5, 6, 7, 8)

En este estudio, la tasa de transporte de bacterias antibiótico resistente fue del 31% (n: 80), es comparable a estudios previos realizados en Chile 23% (n: 100) y Blangladesh 30% (n: 90) ^(6, 8); la tasa de transporte de bacterias antibiótico-resistente en aves *C. livia* que circulan por el centro de la ciudad de León, está en una magnitud similar a los estudios antes mencionados, aunque nuestro número de muestras analizadas es menor en comparación a los estudios antes mencionados para realizar conclusiones definitivas.

En este estudio se identificó *E. coli* 64% (14/22), *Klebsiella spp* 14% (3/22), *Enterobacter spp* 9% (2/22), *Serratia spp* 9% (2/22), y *Proteus spp* 4% (1/22), siendo *E. coli* el aislado antibiótico-resistente con mayor frecuencia (64%), lo cual concuerda con el estudio realizado por Da Silva y cols., en Brasil sobre la ocurrencia de *E. coli* en excretas de palomas *C. livia*, obteniendo que el 38% fue multirresistentes. ⁽¹¹⁾ El presente estudio también concuerda con otros estudios realizados en Latinoamérica en el cuales se demuestra que la bacteria más común aislada en las excretas de las aves *C. livia* es *E. coli*. ^(6, 7, 12, 13)

La prevalencia de la producción de BLEE en Enterobacterias identificadas en el presente estudio fue del 59%, resistencia a los carbapenémicos 18% e hiperproducción de AmpC 23%; éste dato concuerda con estudios previos realizados en países de Latinoamérica cuya prevalencia oscila entre 37% -54.5% para BLEE. ^(6, 7, 8, 11)



Un dato interesante son los resultados del estudio de Hasan B, Laurell K y cols., realizado en León-Nicaragua durante el año 2012, ⁽¹²⁾ en busca el gen *bla*_{CTX-M} compartido entre *E. coli* productora de BLEE en excretas de palomas, seres humano sanos y animales salvajes, se encontró *E. coli* en los tres grupos en estudio encontrando una prevalencia del gen *bla*_{CTX-M} en 27% en humanos, 13% en pollos y 8% en aves salvajes; en este estudio se identificó el gen *bla*_{CTX-M} en los aislados productores de BLEE (5/13); se identificó un aislado de *E. coli* portador del gen (*bla*_{TEM}), además se encontró que el 27% de los aislados productores de BLEE corresponden a géneros bacterianos diferentes a *E. coli*, este dato hace pensar en el aumento de la antibiótico-resistencia en los últimos años, así como en el posible cambio de la flora gastrointestinal de éstas aves con la adquisición de nuevas cepas multirresistentes.

Por otro lado, la presencia de bacterias antibiótico-resistente en el HEODRA, es de suma importancia epidemiológica debido a que constituyen un riesgo potencial para adquisición de patógeno causando enfermedades en aquellas con depresión de su sistema inmune o en estado crítico. Las condiciones del HEODRA son moderadamente propicias para el desarrollo de microorganismo al estar protegidas de radiaciones y humedad además, estas bacterias tienen la capacidad de adaptarse a las variaciones del medio utilizando diversas vías para transferir información genética como el traspaso de plásmidos de una bacteria a otra, de ésta manera se abre paso a una ruta de esparcimiento de bacterias multirresistente dentro y fuera del hospital donde las Aves *C. livia* funcionan como portadoras y/o fuente de esparcimiento jugando un rol importante en la diseminación de estas bacterias en el medio ambiente.^(9, 10, 16, 25)

Las bacterias utilizan diferentes mecanismos que les permiten crear resistencia a los antibióticos, ^(25, 26, 32). La expresión de antibiótico- resistencia en 27% (6/22) de los aislados de interés se debe a la codificación de los genes *bla*_{CTX-M} (5), y *bla*_{TEM} (1). El 73% de los aislados en estudio que expresaron resistencia fenotípica mediante el método de Kirby Bauer frente a los antibióticos testados incluyendo los carbapenémicos y que no codifican los genes de resistencia, pueden utilizar otros mecanismos que al expresarlos les confieren resistencia fenotípicas a la acción de los antimicrobianos, como la hiperproducción de AmpC, cambios en las proteínas de la membrana externa, pérdida de porinas, modificación en la permeabilidad de sus membrana así como la expresión de bombas de eflujo inespecíficas. ^(25,26, 27, 30)



La evidencia científica demuestra que las aves *C. livia* tienen un papel importante en la transmisión y el mantenimiento de agentes patógenos de enfermedades de tipo zoonóticos, ^(5, 6, 7, 8, 10) incluso se ha llegado a considerar su presencia un peligro potencial para la salud de la comunidad. ^(10, 50) La propagación de Enterobacterias productoras de BLEE parece ser multifactorial, pero los países de bajos ingresos como Nicaragua pueden ser más afectados. ⁽¹²⁾ Posibles factores contribuyentes visto en León incluyen el uso no regulado de antibióticos, la falta de higiene en el entorno hospitalario, mal tratamiento de residuos hospitalarios, y contacto cercano entre humanos y animales contribuyen de manera directa al esparcimiento de antibiótico- resistencia en el ambiente.



11. Conclusiones

1. Se encontró que la tasa de transporte de bacterias antibiótico-resistencia en aves *C. livia* fue de 31% (25/80), es decir, que el 31% de las aves muestreadas acarrean Bacterias Antibiótico-Resistente (ARB).
2. Los géneros bacterianos identificados fueron: *E. coli* 64% (14/22), *Klebsiella spp* 14% (3/22), *Enterobacter spp* 9% (2/22), *Serratia spp* 9% (2/22), y *Proteus spp* 4% (1/22), siendo *E. coli* el aislado antibiótico- resistente con mayor frecuencia (64%),
3. Los mecanismo de resistencia fenotípico identificados fueron: producción de BLEE 59%, aislados resistentes a los carbapenémicos 18% e hiperproducción de AmpC 23%; siendo el mecanismo de resistencia fenotípica identificado con mayor frecuencia fue la producción de BLEE en aislados de *E. coli* 8/13.
4. La expresión de antibiótico- resistencia en 27% (6/22) de los aislados de interés se debe a la codificación de genes de resistencia, se logró identificar los genes que codifican para la producción de BLEE, *blaCTX-M* (5), y *blaTEM* (1). El gen con mayor prevalencia fue de *blaCTX-M* el cual se identificó en 39% (5/13) de los aislados presuntivos de BLEE.



12. Recomendaciones.

- a) Se recomienda una ampliación del estudio con el cual se incremente el número de muestras y/o lugares muestreados para un mejor monitoreo de las posibles rutas de diseminación de bacterias antibiótico-resistente en la ciudad de León.
- b) Se recomienda que las autoridades de salud implementen planes de contención para evitar la diseminación de bacterias antibiótico-resistente; así como la implementación de estrategias biológicas que impidan que las aves *C. livia* continúen esparciendo bacterias antibiótico resistente en el hospital y la comunidad.
- c) Evitar el contacto directo y prolongado con aves *C. livia* o con fómites contaminadas con heces de las mismas.



13. Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos. 2014.
2. Serra Valdés, Miguel Ángel. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista habanera de Ciencias Médicas*. 2017; 16(3): 402-419.
3. Fernández Riverón F, López Hernández J, Ponce Martínez LM, Machado Betarte C. Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2003;32.
4. Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE. Resistance to bacterial antibiotics, antiseptics and disinfectants a manifestation of the survival and adaptation mechanisms. *Colombia Médica*. 2007;38(2):149-58.
5. Kumar A, Tiwary BK, Kachhap S, Nanda AK, Chakraborty R. An *Escherichia coli* strain, PGB01, isolated from feral pigeon faeces, thermally fit to survive in pigeon, shows high level resistance to trimethoprim. *PloS one*. 2015;10(3):e0119329.
6. González-Acuña D, Silva F, Moreno L, Cerda F, Donoso S, Cabello J, et al. Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. *Revista chilena de infectología*. 2007;24(3):199-203.
7. Da Silva V JN, T Nascimento, C Diniz. Pigeons (*Columba livia*) in Brazil and Their Antimicrobial Susceptibility Patterns. Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz. 2009;59:302–8.



8. Hasan B, Sandegren L, Melhus Å, Drobni M, Hernandez J, Waldenström J, et al. Antimicrobial Drug-Resistant *Escherichia coli* in Wild Birds and Free-range Poultry, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(12):2055-8.
9. Organización para la Salud (OPS). Ministerio de Salud implementa Plan Nacional de Acción sobre la resistencia a los antimicrobianos. Nicaragua. 2019.
10. Bonnefoy X, Kampen H, Sweeney K. Public. Health Significance of Urban Pests. Organización Mundial de la Salud (OMS). Cap. 8; 2015.
11. Da Silva VL, et al. Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant Enterococci in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil. *Microbes and Environments*. 2012;27(2):179-85.
12. Hasan B, Laurell K, et al. Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -lactamases in Healthy Humans, Poultry, and Wild Birds in Leon, Nicaragua-A Shared Pool of blaCTX-M Genes and Possible Interspecies Clonal Spread of Extended-Spectrum beta-Lactamases-Producing *Escherichia coli*. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2016;22(8):682-7.
13. Chidamba L, Korsten L. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from roof-harvested rainwater tanks and urban pigeon faeces as the likely source of contamination. *Environmental monitoring and assessment*. 2015;187(7):405.
14. Maguiña Vargas C. Infecciones nosocomiales. *Acta Médica Peruana*. 2016; 33:175-7.
15. Mendoza Y, Montes M. *Cryptococcus neoformans* aislados en excretas de palomas (*Columba livia*). [dissertation]. UNAN-LEÓN; 2013. 38p.
16. Mendizabal E, Córdova D, Falcón N. Plagas Urbanas: Las palomas y su impacto sobre el ambiente y la salud pública. *Revista de Ciencias Veterinarias*. Vol. 33, Nº 1, 2017 Lima-Perú.



17. Pérez Hera F, Camejo Darías L, Rojas Sifontes E. Comportamiento de la resistencia antimicrobiana de gérmenes aislados en heridas por quemaduras. *Revista Cubana de Cirugía*. 2009;48.
18. Valenzuela B, et al. Implementación de una red nacional para la vigilancia de resistencia de agentes patógenos a antimicrobianos según síndromes clínicos. *Revista chilena de infectología*. 2003;20:119-25.
19. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Centers for Disease Control and Prevention*. Atlanta. 1996 Jan; 17(1):47-52.
20. Ernesto L-JF. Nosocomial Infections, Problems in their control and the impact on public health. *Revista Experiencia en Medicina*. 2016; 2(1).
21. Calderón G, Agilar L. Resistencia Antimicrobiana: microorganismos mas resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centro América LXXIII* (621)757 - 763, 2016
22. OPS. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Organización Panamericana de la Salud. 3 vol. 2003.
23. Dabanch P J. Zoonosis. *Revista chilena de infectología*. 2003;20:47-51.
24. Zaldívar Ochoa M. El sistema inmunológico de las mucosas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2002; 18:352-4.



25. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. 2009;69:185-92.
26. García CS, de la Gándara MP, García FJC. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *E. coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010;28:12-8.
27. Viswanatha T, Marrone L, Goodfellow V, Dmitrienko GI. Assays for beta-lactamase activity and inhibition. *Methods in molecular medicine*. 2008;142:239-60.
28. Zhanel GG, Hoban DJ, Schurek K, Karlowsky JA. Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*. 2004;24(6):529-35.
29. Álvarez Almanza D. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2010;9(4):516-24.
30. Moreno KM. Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia antimicrobiana. *Revista Médica de Costa Rica y Centro América*. 2013; (608):599 – 60.
31. Wierzbowski AK, Hoban DJ, Hisanaga T, Decorby M, Zhanel GG. The Use of Macrolides in Treatment of Upper Respiratory Tract Infections. *Current infectious disease reports*. 2005;7(3):175-84.
32. N G. Antibiotic resistance caused by membrane impermeability and multidrug efflux systems. *Nippon Rinsho* 2009;59(4):712-8.
33. Fica A. Antibiotic resistance among gramnegative bacilli, gram-positive bacteria and anaerobes. Therapeutic implications. *Revista Médica Clínica de Condes*. 2014; 25(3): 432-433



34. Groisman EA, Casadesus J. The origin and evolution of human pathogens. *Molecular microbiology*. 2005;56(1):1-7.
35. Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2009;47(5):951-68.
36. Costa SIAD. Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamasas de espectro alargado em isolados de enterobacteriaceae de origem hospitalar: [sn]; 2013.
37. Morejón García M. Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*. 2013;52:272-80.
38. Miranda García M. *Escherichia coli* portadora de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*. 2013;69(4):244-8.
39. Gil ZA, Núñez JL, Benevidez EA, López EL. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo-Perú. *Rev cuerpo méd HNAAA*. 2014;7(3):27-30.
40. Galván F, Agapito J, Bravo N, Lagos J, Tamariz J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de B-Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*. 2016;27:22-9.
41. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 29(7):524-34.



42. Rivera-Jacinto M, y cols; β -lactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2015; 32:752-5.
43. Jacoby GA. AmpC β -lactamasas. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
44. Cercenado E. Cantón R. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativo. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
45. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(6):1631-9.
46. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36(3):205-10.
47. Castañeda J, Gómez K, Corrales L, Cortés S. A profile of resistance in bacteria and the mechanisms associated due to the presence of the enzyme NDM-1: a systematic review. *Nova*. 2016;14(25):95-111.
48. Paloma doméstica [Internet]. EcuRed. 2013; citado el febrero, 2019. Disponible en: https://www.ecured.cu/index.php?title=Paloma_dom%C3%A9stica&oldid=1994611.
49. Paloma doméstica. [Internet]. Cornell University. 2016. Citado en febrero, 2019. Disponible en: <https://celebrateurbanbirds.org/es/learn/birds/focal-species/rock-pigeon-2/>.
50. Mancera Méndez VMea. La paloma (*Columba livia*) en la transmisión de enfermedades de importancia en salud pública. *Revista Ciencia Animal*. 2011.



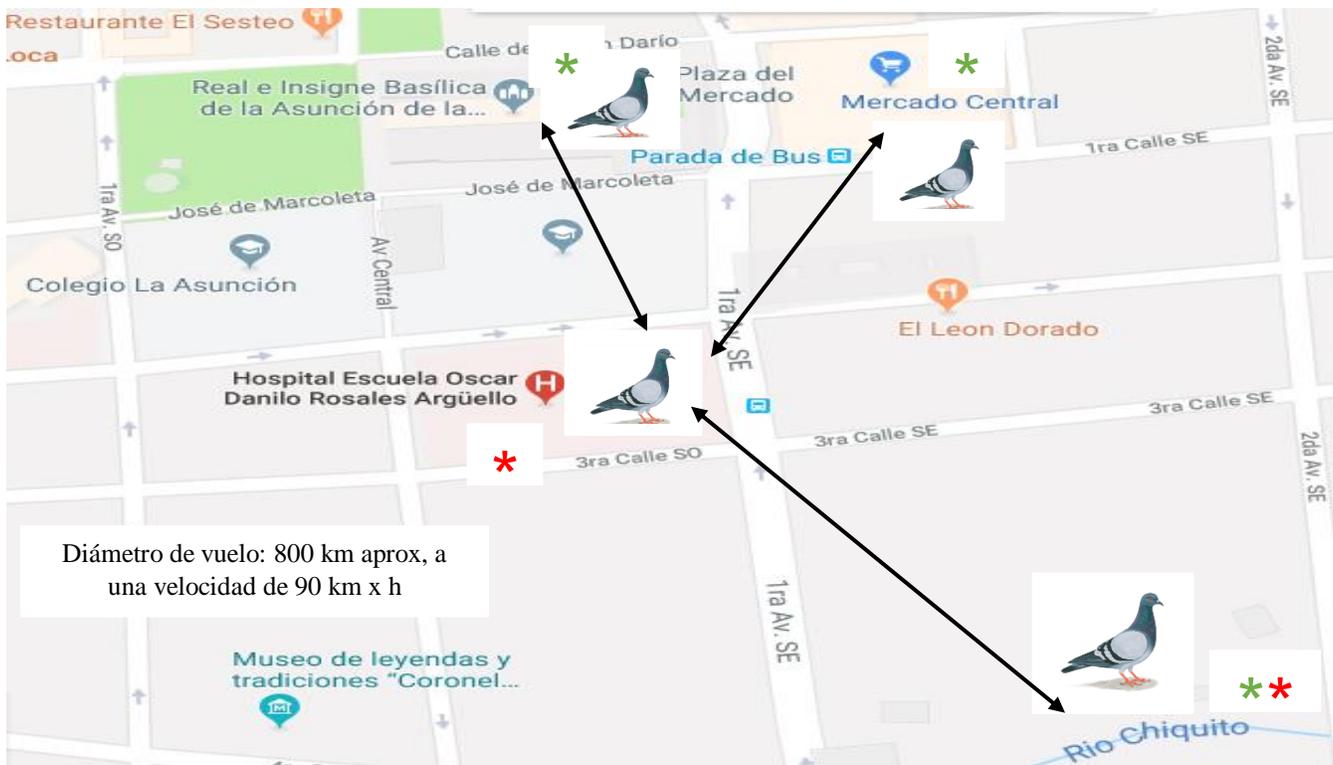
51. Jimenez A, Cooper-Mullin C, A Calhoon E, B Williams J. Jimenez et al. Physiological underpinnings associated with differences in pace of life and metabolic rate in north temperate and neotropical bird. Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, Ohio. 2014.
52. Ramírez O; et al. Conocimiento popular de la Paloma de Castilla (*Columba livia*) en el Parque Central de Alajuela. Escuela de Ciencias Biológicas Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 12:1. 2008.
53. Pires J, Novais Â, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51(12): 4281-3.



14. Anexos

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA – LEÓN	
CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO	
Ficha de recolección de datos	
Código: _____	
Hora de recolección: _____	Fecha de recolección: / /
Tipo de muestra: Hisopados _____ Excretas _____	
Lugar de recolección: HEODRA: _____ Parque Central: _____	
Observaciones _____	

Figura 12. Ficha de recolección de datos.



* Dissemination of ARB in the environment.

* Source of infection, dispersal and transmission of ARB in the center of the city of León

Fig. 13. Posible ruta de esparcimiento de bacterias antibiótico resistentes utilizando a la población de aves *C. livia* como vehículo para este fin.

HEODRA

Parque Central de León



Aislamiento inicial en medios cromogénicos con suplemento para BLEE y KPC



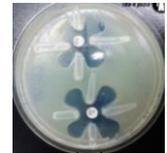
Transportadas en tubos con 1 ml de SS al 0.87% a 4°C

Purificación en agar McConkey



Sospechosas de ser productoras de KC

Test de Hodge modificado

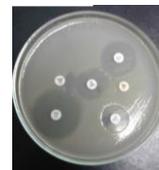


Positivo Negativo

Hiperproducción de AmpC



BLEE



Test de Blue-Carba



Positivo Negativo

Identificación bacteriana mediante pruebas Bioquímicas

TSI
LIA
MIO
CITRATO



Kirby Bauer



PCR-Convencional



Figura 14. Protocolo de trabajo para la identificación de bacterias productoras de BLEE y KPC.

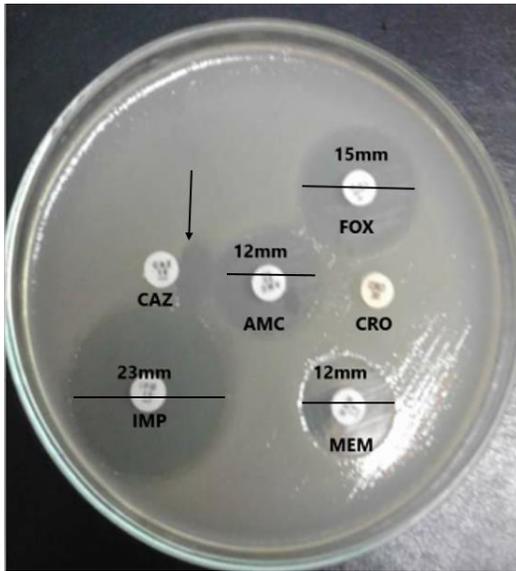


Fig. 15 Patrón fenotípico de resistencia por producción de BLEE

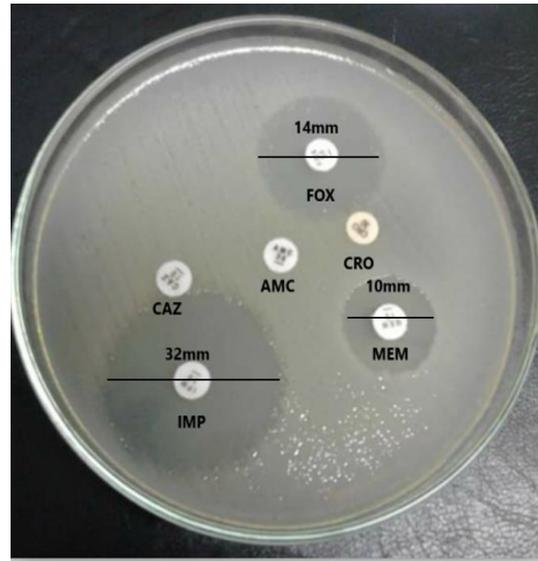


Fig.16.Patrón fenotípico de resistencia por hiperproducción de AmpC.

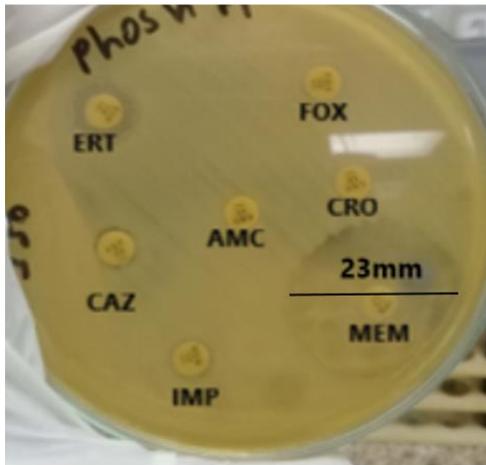
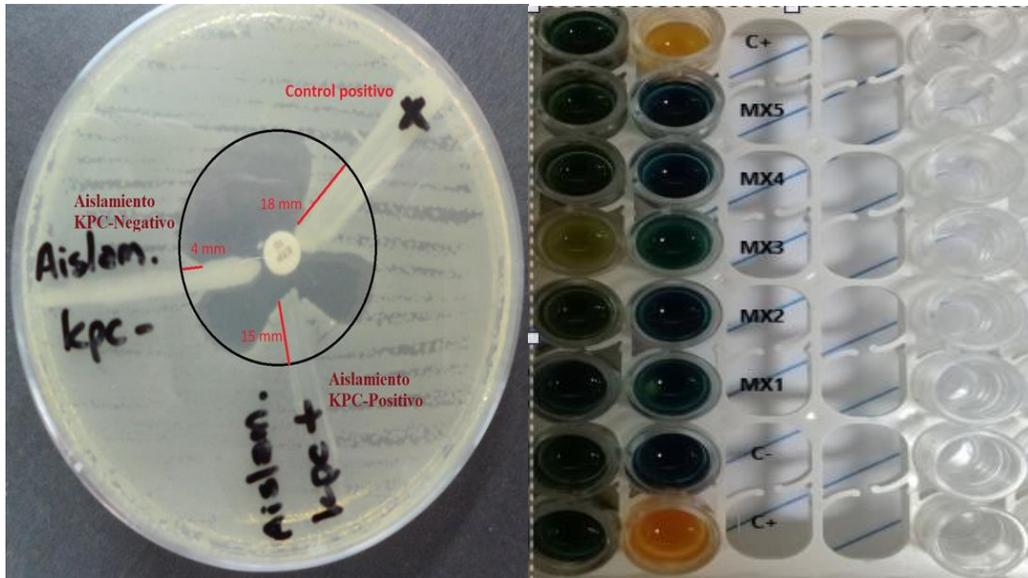


Fig. 17. Patrón fenotípico de resistencia de aislado sospechoso de KPC, el aislado muestra resistencia a todos los antibióticos testados excepto Meropenem

Fig. 18. Confirmación de KPC mediante el Test de Hodge modificado (Izquierda) y test de Blue-Carba (Derecha)



Izquierda: Un aislado con test de Hodge positivo. Derecha: Aislados negativos para KPC mediante test de Blue -Carba



Fig. 19. Ave *Columba livia*



Procedimientos 1. Preparación de medios de cultivo.

CHROMAgar® Orientation con suplemento para BLEE y KPC

1. Usando la balanza pesar la cantidad de 33 gr del polvo del medio.
2. Los disolvemos en 1000 ml de agua destilada purificada, mezclar.
3. Usando una plancha eléctrica se lleva a ebullición durante 5 minutos aproximadamente hasta lograr una disolución completa.
4. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (dejar enfriar y agregar suplemento para BLEE o KPC).
5. Chorrear en cada plato Petri, 25 ml de medio preparado.
6. Colocarlos platos en una superficie plana y dejar solidificar.
7. Guardar a 4°C.
8. Montar un control negativo y un control positivo para verificar la calidad y esterilidad del medio.
9. Su periodo de tiempo para poder ser usado después de preparados es de 60 días.

Procedimientos para elaboración del suplemento para BLEE

1. Pesar en la balanza 0.285 gr de suplemento para BLEE
2. Agregar 5ml de agua esterilizada
3. Homogeneizar la solución.
4. Enfriar el medio hasta 45°C y agregar suplemento.

Procedimientos para elaboración del suplemento para KPC

1. Pesar en la balanza 0.200 gr de suplemento
2. Agregar 5ml de agua esterilizada
3. Homogeneizar la solución.
4. Enfriar el medio hasta 45°C y agregar suplemento.



Tabla 6. Lectura de la placa en CHROMagar^{MT} suplementado para ESBL y KPC.

Aislados	Color de las colonias
<i>E. coli spp</i>	Rosa oscuro o rojo
<i>Klebsiella, Enterobacter y Serratia spp</i>	Azul metálico
<i>Citrobacter spp</i>	Azul metálico con halo rojo
<i>Proteus spp</i>	Halo marrón
<i>S. aureus</i>	Dorado, opacas, pequeñas
<i>Enterococcus spp</i>	Azul turquesa.
<i>Pseudomonas spp</i>	Crema traslúcida.

* ESBL: 100% sensibilidad/ 93.3% especificidad. *KPC: 100% sensibilidad/ 98.8 % especificidad.

Nota: Si se observa crecimiento en los medios de cultivo ESBL y KPC, el aislado será tomado como sospechoso de ser resistente a los betalactámico y/o carbapenémicos.

Procedimiento 2. Elaboración de agar McConkey

1. Usando la balanza pesar la cantidad de 51.5 gr del polvo del medio.
2. Los disolvemos en 1000 ml de agua destilada purificada.
3. Usando una plancha eléctrica lleva ebullición durante 5 minutos aproximadamente hasta lograr una disolución completa.
4. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada.
5. Enfriar el medio hasta 45°C.
6. Chorrear en cada plato Petri, 25 ml de medio preparado.
7. Colocar los platos en una superficie plana y dejar que se enfríe hasta temperatura ambiente y se solidifiquen.
8. Guardar a 4°C.
9. Montar un control negativo y un control positivo para verificar la calidad y esterilidad del medio.
10. Su periodo de tiempo para poder ser usado después de preparados es de 60 días.



Procedimiento 3. Tinción de Gram

1. Rotular la lámina con el código de la muestra correspondiente.
2. Colocar una pequeña gota de solución salina en el centro del porta objetos.
3. Tomar la muestra con asa recta (una UFC) mezclarla con la gota de solución salina. Al mismo tiempo que se hace la mezcla, se dispersa en un área de aproximadamente 1cm por lado. El grosor de la muestra deber ser tal que permita la lectura de letras pequeñas a través del frotis
4. Ponga la lámina sobre una superficie plana y espere a que se seque a temperatura ambiente.
5. Una vez que el frotis esté seco, fijar la muestra pasándola rápidamente dos veces por encima de la flama del mechero. Evite el sobrecalentamiento ya que la pared celular se destruye y las bacterias Grampositivos se observarían como Gramnegativos. Para saber la temperatura adecuada coloque inmediatamente la lámina flameada sobre el dorso de una mano. En estos casos, la temperatura se debe tolerar sin hacer ningún esfuerzo de resistencia al calor.

TINCIÓN:

1. Cubrir el frotis ya fijado con cristal violeta, dejar el colorante por un minuto
2. Enjuagar, dejando caer agua con un chorro suave. Escurrir muy bien.
3. Cubrir con lugol y dejar por un minuto.
4. Repita el paso número 2
5. Aplicar 2 o 3 gotas de alcohol acetona (1:1) o alcohol 70% y balancear la lámina de tal manera que se pueda observar la decoloración. El tiempo adecuado es aquel en que las partes más gruesas han dejado de decolorar al realizar el balanceo.
6. Inmediatamente repita el paso número 2
7. Cubrir el frotis con safranina o fucsina acuosa durante 30 segundos.
8. Repita el paso número 2
9. Dejar secar a temperatura ambiente.
10. Examinar en el microscopio con lente de inmersión.



Procedimiento 4. Identificación fenotípica del género bacteriano.

Una vez que se tienen colonias puras, se identifica el género bacteriano de las mismas utilizando una batería bioquímica (TSI, LIA, MIO, UREA, CITRATO).

Procedimiento:

- a) Atemperar pruebas bioquímicas a 37°C en incubadora 1.
- b) Limpiar el área de trabajo (campana de bioseguridad de flujo laminar) con papel adsorbente y lysol.
- c) Colocar cerca del área de trabajo caja de bioseguridad como depósito de material de descarte
- d) Rotular los tubos con el código de la muestra correspondiente.

Con un asa recta estéril (flamear para esterilizar por calor seco), tomar una colonia fresca y pura cultivada en agar McConkey e inocular en las pruebas bioquímicas antes mencionadas.

Una vez ha transcurrido el tiempo de incubación, se procederá a leer la batería bioquímica, según los indicadores de las reacciones correspondientes.

Tabla 7. Cuadro esquemático para el análisis Bioquímicos Bacterianos:

Bacteria	TSI	Gas	H2S	Lisina	Citrato	Urea	Indol	Movilidad	VP
<i>E. coli spp</i>	Ac/Ac	V	-	V	-	-	+	V	-
<i>Klebsiella spp</i>	Ac/Ac	+	-	+	+	V	V	-	+
<i>Enterobacter spp</i>	Ac/Ac	+	-	V	V	-	-	+	-
<i>Citrobacter spp</i>	Ac/Ac// AK	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>Shiguella spp</i>	Ak/Ac	V	-	-	-	-	V	-	-
<i>Salmonella spp</i>	Ak/Ac	V	+	+	V	-	-	+	-
<i>Proteus spp</i>	Ak/Ac	V	V	-	V	+	V	+	-
<i>Serratia spp</i>	Ak/Ac		+	V	+	-	-	+	V
<i>Pseudomona spp</i>	Ak/Ak	-	+	-	+	V	-	+	-
<i>Acinetobacter spp</i>	Ak/Ak	-	+	-	-	V	-	-	-

*Manual of Clinical Microbiology, Balows 5 th edition.



Clave

V: variable (+ ó -)

Ak: alcalino (rojo)

Ac: ácido (amarillo)

Lisina: + Lila (kalium)

-Amarillo (negro)

Procedimiento 5. Identificación fenotípica de los mecanismos de resistencia.

Se realizará mediante el método de Kirby-Bauer, éste es el método estándar que recomienda el CLSI para el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana, el medio de cultivo recomendado es el agar Mueller Hinton por permitir el crecimiento para la mayoría de los patógenos no fastidiosos.

Procedimiento:

1. Con ayuda de un asa bacteriológica, tomar una colonia pura aislada en agar McConkey e inocularla en un tubo con SS. Compara la turbidez igual a la escala McFarland 0.5%.
2. Sumergir un hisopo estéril a la suspensión, escurrir el hisopo en las paredes del tubo, rayar la placa de medio Mueller Hilton en tres direcciones.
3. Colocar discos con antibiótico para detectar mecanismo de resistencia: BLEE, AmpC, KPC. Dejar incubar durante 24h a 37°C.
4. Medir halos de inhibición, comparar según normas de CLSI.
5. Una vez identificada la especie bacteriana y el perfil de resistencia: usando un asa estéril, tomar el mayor número de colonias posibles aisladas en placas de agar McConkey y guardas en ICC+ 5% glicerol a -20°C para su posterior análisis.



Tabla 8. Puntos de corte por CLSI para susceptibilidad antimicrobiana en Enterobacterias.

SIM	Antibiótico	Carga	Sensible	Intermedio	Resistente
AMC	AMOXICILINA + A. CLAVULÁNICO	10 µg	≥18	14-17	≤13
CRO	CEFTRIAZONA	30µg	≥23	20-22	≤10
CAZ	CEFTAZIDIME	30µg	≥21	18 - 20	≤17
FOX	CEFOXITIN	30µg	≥18	15 - 17	≤14
IMP	IMIPENEM	10µg	≥23	20 - 22	≤19
MEM	MEROPENEM	10µg	≥23	20 - 22	≤19

Toda deformación de los halos contiguo a AMC será interpretado como positivo para la confirmación de BLEE. Las cepas fenotípicamente resistente a los carbapenémicos, serán interpretados como sospechosos de ser productores de carbapenemasas, para confirmar este mecanismo de resistencia se realizará Test de Hodge modificado seguido del test de Blue -carba

Procedimiento 6. Confirmación de resistencia fenotípica en aislados sospechosos de ser productores de Carbapenemasas mediante el Test de Hodge modificado.

Los aislados que mostraron resistencia fenotípica a los carbapenémicos mediante el test de Kirby Bauer, se confirmaron mediante el Test de Hodge modificado siguiendo los estándares del CLSI, de la siguiente manera:

Procedimiento:

- a) Utilizar guantes descartables, gabacha, zapatos cerrados y cabello recogido.
- b) Atemperar platos con Agar Mueller Hinton preparados previamente según indicaciones del fabricante.
- c) Limpiar el área de trabajo (campana de bioseguridad de flujo laminar) con papel adsorbente y lysol.
- d) Colocar cerca del área de trabajo caja de bioseguridad como depósito de material de descarte
- e) Preparar suspensión a 0.5 McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922.
- f) posteriormente diluya la suspensión 1:10 con solución salina.



- g) Inocular la suspensión obtenida en el paso f en platos con Agar Müeller Hinton realizando un estriado similar a la difusión en disco para Kirby-Bauer (3 direcciones)
- h) Dejar reposar la Cepa ATCC de 3-10 minutos y colocar disco de Ertapenem 10 µg en el centro del plato.
- i) Utilizando un asa de 10 µL, tome de 3-5 colonias crecida (cultivo fresco de 24 horas) en Agar MacConkey y realizar una estrías del borde del disco al borde del plato. **NOTA:** Se pueden colocar 4 aislados en un mismo plato (ver imagen 5)
- j) Incubar por 24 horas a 37°C en incubadora 1.

Interpretación: El test de Hodge modificado es utilizado para la detección fenotípica de carbapenemasas. La inactivación de los carbapenémicos por el aislado productor de carbapenemasas permite el crecimiento del microorganismo indicador sensible (ATCC 25922) a los lados de la estría efectuada con la cepa productora en una placa con un disco de carbapenémico. Esta prueba no permite identificar las clases de Carbapenemasas.

Positivo: Un resultado positivo se pondrá de manifiesto por el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC en la parte de intersección entre el halo de inhibición que genera la difusión del antibiótico y la estría de la cepa que era objeto de nuestro estudio, formándose así una hendidura en la parte próxima al disco. Esto pone en evidencia la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que han sido liberadas al medio permitiendo así el crecimiento de *E. coli* ATCC.

Negativo: No se presenta crecimiento de la cepa ATCC de *E. coli* en el punto de intersección con la estría de la cepa problema y el halo de inhibición del antimicrobiano, es decir, se aprecia un halo de inhibición perfecto alrededor del disco.



Imagen 20. Test de Hodge modificado. Todos los resultados en la imagen son positivos

Procedimiento 7. Confirmación de resistencia fenotípica en aislados sospechosos de ser productores de Carbapenemasas mediante el Test de Blue-carba.

A los aislados que mostraron resistencia fenotípica a los carbapenémicos mediante el test de Kirby Bauer, y confirmados mediante el Test de Hodge modificado, se les realizó el test de Blue-carba, siguiendo las recomendaciones de Pires y cols. ⁽⁵³⁾

Procedimiento:

A) Preparación y almacenamiento de Solución A:

- Utilizar guantes descartables, gabacha, zapatos cerrados y cabello recogido.
- Limpiar el área de trabajo (campana de bioseguridad de flujo laminar) con papel adsorbente y lysol.
- Colocar cerca del área de trabajo caja de bioseguridad como depósito de material de descarte.
- Disolver 40 mg de azul de bromotimol en 100 ml agua destilada (concentración final 0.04%). Se encuentra disponible comercialmente solución de esta concentración.
- Disolver en la solución anterior 2.87 mg de $\text{SO}_4\text{Zn} \times 7\text{H}_2\text{O}$ (concentración final 0.1 mmol/L)
- Ajustar pH de la solución a 7.0 CRÍTICO, con NaOH (0.1N) o con HCL (0.1N). Conservar entre 4-8°C protegido de la exposición al sol.



- Conservar en heladera. Vigile que no se produzca decoloración espontánea hacia el verde/amarillo durante conservación (generalmente ocurre luego de 4-6 semanas de uso diario)

B) Procedimiento:

- Por cada cepa a ensayar, utilice 2 pocillos de una policubeta de 96 pocillos o dos tubos eppendorf. En cada uno de ellos, agregue:

Pocillo/tubo control: 100 μ l de Solución A

Pocillo/tubo de reacción: 100 μ l Solución A + Imipenem 3 mg/ml

- Agregue en cada pocillo o tubo, una ansa de 5 μ l completa con colonias crecidas en placa de MH, TSA, BHI, CLDE, placa colorimétrica (MH+resazurina), Agar Sangre o ChromKPC® resuspéndala en el líquido de reacción
- Como control positivo se utilizó una cepa ATCC productora de carbapenemasas y como control negativo, una cepa ATCC sensible a los carbapenémicos.
- Tape la policubeta o los tubos eppendorf.
- Incube a 37°C por un máximo de 2 horas en agitación (si no cuenta con un agitador continuo, agite manualmente cada 15 minutos).
- Lectura a ojo desnudo del color de cada pocillo/tubo.

Nota: La Solución A + Imipenem (3 mg / ml) tiene que ser preparado en el momento del ensayo. Nunca utilice medios basados en la fermentación de hidratos de carbono como Levine o McConkey que podrían producir un test inválido.



Interpretación: El test de Blue-carba, es un método colorimétrico, que utiliza como indicador de pH el azul de bromotimol; cuando se produce la hidrólisis del Imipenem por la cepa productora de carbapenemasas, vira el color de azul a verde o amarillo.

Tabla 9. Criterios a considerar para la interpretación del test Blue-carba

Color pocillo/ tubo control (sin Imipenem)	Color pocillo/ tubo Rx (con Imipenem)	Interpretación	Criterio N°
Azul	Amarillo	Carbapenemasas positivo	I
Azul	Verde	Carbapenemasas positivo	II
Verde	Amarillo	Carbapenemasas positivo	III
Azul	Azul	Carbapenemasas negativo	IV
Verde	Verde	Carbapenemasas negativo	V
Amarillo	Azul o verde o amarillo	Test inválido	VI

El tiempo de reacción usualmente requerido por los distintos mecanismos es:

KPC: 2 a 30 minutos

MBLs: (VIM, IMP, SPM): 30 min a 1 hora

OXAs y NDM: 1 a 2 horas

Nota: la hemoglobina de los medios suplementados con sangre podría producir un viraje espontáneo del tubo control del azul a verde. En caso que ello ocurriera, utilice los criterios III y V para interpretar el ensayo como positivo o negativo, respectivamente.

Positivo: Un resultado positivo del Blue-carba indicará invariablemente una cepa productora de carbapenemasa, sin embargo para la detección de carbapenemasas tipo OXA, esta prueba presenta menor sensibilidad, por tanto en escenarios con un aumento de la prevalencia de cepas productoras de OXAs, un resultado negativo del test de Blue-Carba requerirá de pruebas adicionales para definir la presencia de este tipo de carbapenemasa.

Negativo: No se observa viraje de color dentro del tiempo de reacción establecido.

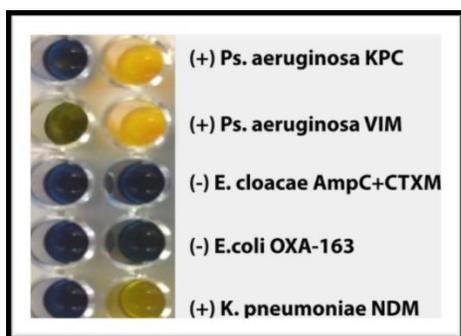


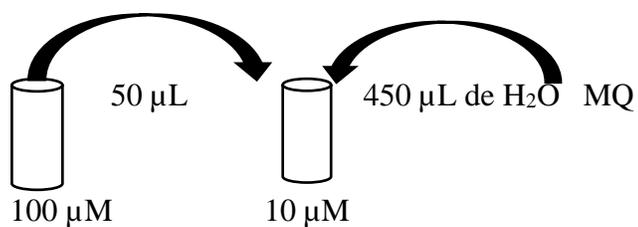
Fig. 21. Test Blue-carba. En la imagen, tres aislados son productores de carbapenemasas tipo KPC, VIM, y NDM; una cepa es productora de KPC tipo OXA.

Procedimiento 8. Identificación de genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, y *bla*_{OXA} mediante PCR Convencional

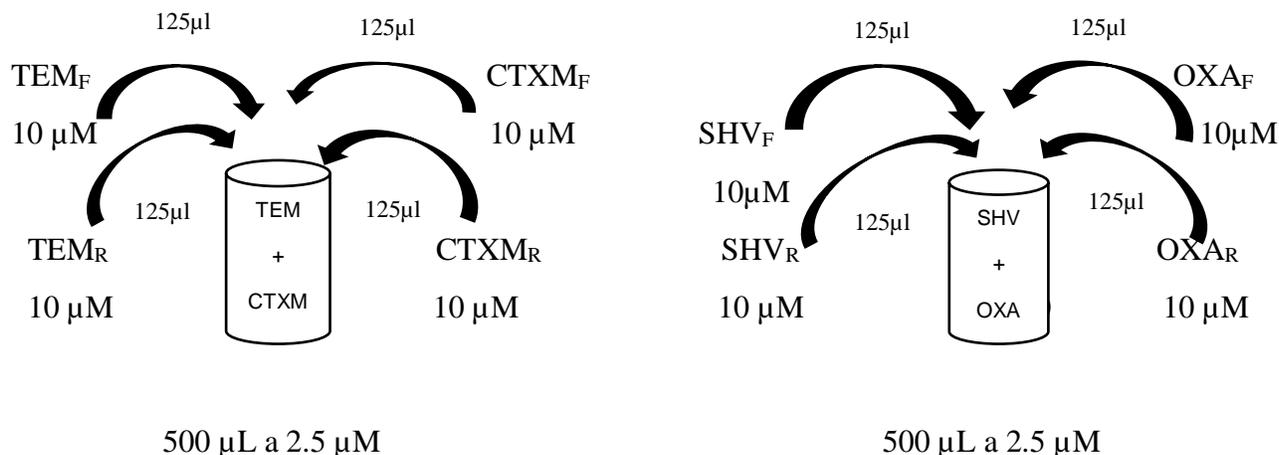
Pasos para preparar MasterMix a una concentración Final de 0.2 μ M:

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)

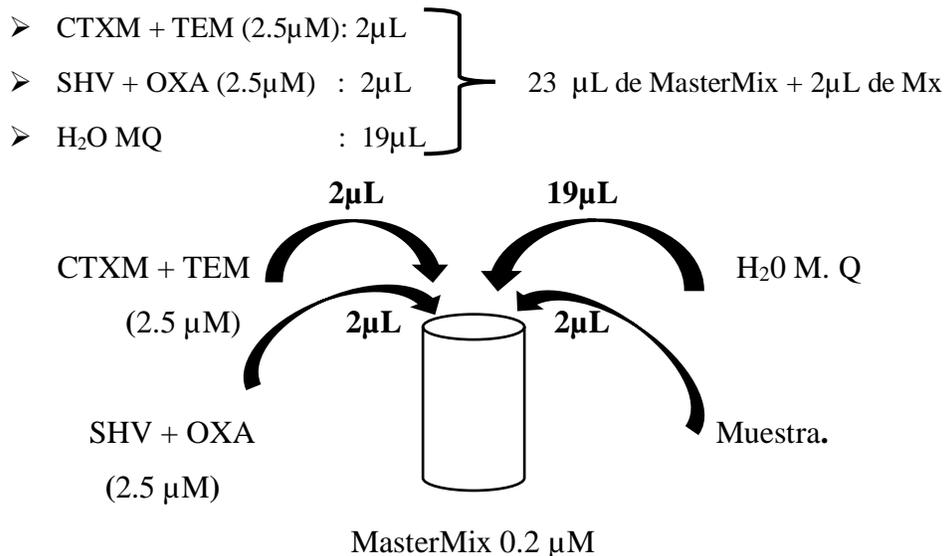


2). Utilizando los primers a concentración de 10 μ M (paso 1), se prepara una solución a una concentración de 2.5 μ M. Para mayor facilidad en la preparación, se puede realizar de la siguiente manera:



3). Para Preparar el MasterMix a una concentración final 0.2 µM, se tomaran 2 µL de la dilución de primers de cada tubo de 2.5 µM (cuatro en total) y se mezclará con 19 µL de H₂O MQ; de manera que por cada muestra a procesar se necesitan 23 µL del MasterMix el cual estará distribuido de la siguiente forma:

- a. Utilizando una Micropipeta, colocar 23 µL de la solución de trabajo, (19 µL del agua MQ, 2 µL de los primers (CTXM + TEM) y 2 µL de los primers (OXA+ SHV) ambos a una concentración de 0.25 µM) previamente preparado a cada pocito de reacción correspondiente.
- b. Para la amplificación del ADN molde, se utilizó puReTaq Ready-To-Go-PCR beads (GE Healthcare UK) por cada tubo de PCR beads se agregaron las cantidades de la mezcla de PCR como se detalla a continuación:



Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

Una vez terminado el programa de amplificación, se procedió a realizar la corrida del producto amplificado en gel de agarosa al 1.5 %, los productos amplificados migrarán a través del gel al ser expuestos a una corriente eléctrica, los fragmentos de ADN cargados fueron separados a través de los poros del gel en base a su relación e-/m, estos a su vez fueron comparados a un marcador molecular de 100 pb (Ladder Promega); el bromuro de etidio, como agente intercalante de ADN nos ayudó a observar las bandas al ser expuesto el gel a luz ultravioleta y fotografiado para su interpretación

A) 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 3 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.



B) Carga del gel

Una vez lista la cámara de corrida y las muestras atemperadas, se realizó un mapa de corrida de manera que se localicen las posiciones en la cámara de las muestras analizadas, los controles y la escalera de peso molecular. (Ver tabla 10)

Mezclar 8 µl del amplicón con 2µl 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 hizo pasar a 100 voltios por 45 min. Transcurrido este tiempo se observó en el transiluminado UV.

Tabla 10. Mapa de corrida de electroforesis en gel de agarosa al 2%

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Escalera 100 pb	Control Negativo	Control Positivo	Control positivo	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Muestra 4	Escalera 100 pb

La Visualización de las bandas específicas con los pesos moleculares correspondientes se realizó con filtro UV naranja Canon Power Shot AG40

- Control Negativo: No se visualizarán bandas de ADN.
- Control positivo: se visualizarán bandas de ADN correspondientes a los pesos moleculares de los genes bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, bla_{TEM} Y bla_{OXA}.
- Muestras: toda visualización de bandas en los diferentes tamaños (pb) de los genes será positiva para su gen correspondiente.

Después de la visualización bajo luz UV, se procedió a conocer el peso de las bandas amplificadas que se visualizaron para su debida interpretación.





UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA - LEÓN

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLÓGIA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

León 28 de marzo, 2016

Dr. Ricardo Cuadra

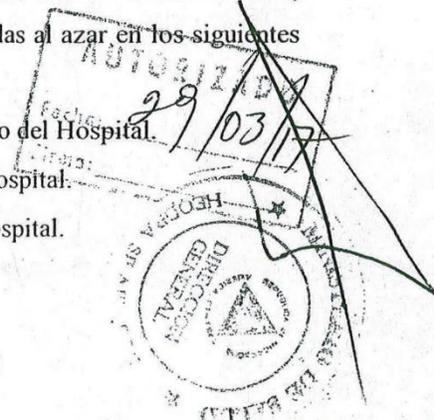
Director del Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello.

Respetable Dr. Cuadra, reciba un cordial saludo de nuestra parte.

Soy estudiante de cuarto año de la carrera de Bioanálisis Clínico de la UNAN-LEÓN; en concordancia con nuestro plan de estudio; recibimos el **Componente de Investigación 4**, en cual debemos realizar un proyecto de investigación cuyo enfoque sea tratar de aportar soluciones a problemas de salud que afectan a la población nicaragüense. En este sentido nuestro proyecto se enfoca en investigar la presencia de bacterias antibiótico resistente en muestras fecales de aves *Columbia Livia* que se encuentran en el HEODRA. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las bacterias antibiótico resistente representan un problema de salud pública a nivel mundial ya que aumentan los costos hospitalarios y en la mayoría de los casos los pacientes no responden al tratamiento antimicrobiano. La OMS ha recomendado realizar investigaciones que contribuyan a producir resultados que den aportes sobre las posibles fuentes de diseminación de éstas bacterias, nuestra investigación generará nuevos conocimientos que permitirán proceder a planes de intervención en pro de la salubridad hospitalaria.

Ante lo expuesto, le **solicitamos su autorización para llevar a cabo dicho estudio**; pretendemos recolectar 50 muestras de excretas frescas tomadas al azar en los siguientes lugares:

- ♦ Áreas de esperas ubicadas entre el segundo y tercer piso del Hospital.
- ♦ Ventanas ubicadas entre el segundo y tercer piso del Hospital.
- ♦ Azoteas ubicadas entre el segundo y tercer piso del Hospital.





UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA - LEÓN

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLÓGIA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

León 28 de marzo, 2016

Para su posterior análisis en el laboratorio del departamento de microbiología y parasitología de la UNAN-LEÓN, dichas muestras se pretenden recolectar durante el periodo de Marzo a Mayo del presente año.

Esperando una respuesta positiva de su parte, nos despedimos deseándoles éxitos en sus labores.

Atte.:

Br. Mariam José Sánchez Velásquez.
14-02942-0

Dr. Erick Amaya. Ph.D
Profesor Titular Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN, León



Cc: Archivo