

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Determinación de Beta-lactamasas de Espectro Extendido  
en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a través de  
pruebas moleculares en urocultivos provenientes de  
pacientes ambulatorios con infecciones de vías urinarias**

**Proyecto de investigación**

**Mayra Sofía Ortega Ortega**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 30 de mayo de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Determinación de Beta-lactamasas de Espectro Extendido en *Escherichia coli*  
y *Klebsiella pneumoniae* a través de pruebas moleculares en urocultivos  
provenientes de pacientes ambulatorios con infecciones de vías urinarias**

**Mayra Sofía Ortega Ortega**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Cristina Chávez, MSc.

Firma del profesor

---

Quito, 30 de mayo de 2017

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Mayra Sofía Ortega Ortega

Código:

00108813

Cédula de Identidad:

1900746122

Lugar y fecha:

Quito, mayo de 2017

## RESUMEN

El incremento de la resistencia de las Enterobacterias a los antibióticos betalactámicos ha generado que estas se convirtieran en un problema epidemiológico a nivel mundial. El principal mecanismo de resistencia y de importancia clínica es la inactivación enzimática por medio de Betalactamasas; las que, debido a su rápida diseminación, han incrementado la tasa de morbilidad, los costos a nivel de atención, estancia hospitalaria y reducción de fármacos de utilidad. Debido a las altas tasas de modificaciones en estas enzimas se han creado nuevas clases de resistencias, siendo las más importantes a nivel nacional y clínico las enzimas TEM, SHV, OXA y CTX-M (concurrente principalmente en la comunidad); siendo los genes que codifican estas enzimas los analizados en el presente estudio. Las infecciones urinarias, infección bacteriana más común en pacientes ambulatorios, afecta a 150 millones de personas por año (Mireles, Walker y Hultgren, 2015); ubicándose en el Ecuador, en el octavo puesto de las principales causas de morbi-mortalidad (INEC). Entre los principales patógenos causantes de infecciones urinarias están *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), bacilos Gram negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de investigación en Salud Pública (INSPI) reportaron que en cepas de *E. coli* la incidencia de resistencia a cefotaxime (CTX) y a ceftazidime (CAZ) supera el 28% y en *K. pneumoniae* el 60% (INSPI, 2015). De igual manera, en el presente estudio se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de los diferentes genes que codifican los principales tipos de betalactamasas en muestras provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorios con infección de vías urinarias. La prevalencia de los genes de Betalactamasas fue de CTX-M: 96,67%, TEM: 28,89%, SHV: 2,22% y OXA:0%.

Palabras claves: Betalactamasas, epidemiología, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaOXA.

## ABSTRACT

The increase of Enterobacteriaceae's resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics has led them to become an epidemiological problem worldwide. The main mechanism of resistance– And clinical importance – is the enzymatic inactivation through Beta-lactamases. Due to their rapid dissemination, these enzymes have provoked an increase in the morbidity rate and the cost of clinical services besides reducing the offer of helpful medical drugs. New types of resistance have originated because of the high rate of modifications in these enzymes. In Ecuador, the ones with greater clinical value are: TEM, SHV, OXA and CTX-M (usual in the community); being the genes that encode these enzymes, the ones that are analyzed in this investigation. Urinary infection is the most common bacterial infection in outpatients; it affects 150 million people per year (Mireles, Walker y Hultgren, 2015). In Ecuador, these infections are located in the eighth position of the main causes of morbidity and mortality (INEC). Among the main pathogens causing urinary infections, we have *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*); these Gram- negative bacillus belong to the family *Enterobacteriaceae*. The latest data published by the Instituto Nacional de investigación en Salud Pública (INSPI) reported that in *E. coli* strains, the incidence of resistance to cefotaxime (CTX) and ceftazidime (CAZ) exceeds 28%; and in *K. pneumoniae* it exceeds 60%. (INSPI, 2015). Likewise, in this investigation, the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used for the detection of different genes that codify the main types of Beta-lactamases in urine culture samples from outpatients with urinary tract infection. The prevalence of the Beta-lactamases genes was CTX-M: 96,67%, TEM: 28,89%, SHV: 2,22% and OXA:0%.

Key words: Beta-lactamases, epidemiology, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaOXA.

## 1. TABLA DE CONTENIDO

<b>1. TABLA DE CONTENIDO.....</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1.1. Infecciones de vías urinarias .....	9
1.2. Clasificación .....	9
1.3. Diagnóstico .....	10
1.4. Etiología.....	13
1.5. Tratamiento .....	15
1.6. Antibióticos betalactámicos .....	15
1.7. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	17
1.8. Formas de diseminación .....	19
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO.....</b>	<b>22</b>
4.1. Población a estudiar .....	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
5.1. Formulario Comité de bioética .....	24
5.2. Extracción ADN.....	24
5.3. Cuantificación ADN .....	24
5.4. Amplificación gen HouseKeeping de <i>E. coli</i> .....	25
5.5. Amplificación de genes que codifican la producción de Betalactamasas.....	26
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
6.1. Total de muestras BLEE positivas en el año 2014-2015 en el laboratorio de microbiología de la USFQ .....	28
6.2. Análisis gen <i>purA</i> .....	28
6.3. Determinación del porcentaje de BLEE .....	28
6.1. Análisis de resistencia bacteriana según la interpretación de los antibiogramas.....	30
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
7.1. Resistencia a BLEE presentada en la comunidad .....	33
7.2. Análisis gen <i>purA</i> .....	33
7.3. Determinación del porcentaje de BLEE. Mecanismos de transferencia y multiresistencia. ....	34
7.4. Análisis nacional y regional de BLEEs. ....	37
7.5. Análisis de resistencia bacteriana de acuerdo a la interpretación de los antibiogramas.....	39
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>9. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>11. Anexo A: Susceptibilidad a antibióticos .....</b>	<b>54</b>
<b>12. Anexo B: Amplificación gen <i>pur-A</i> .....</b>	<b>59</b>
<b>13. Anexo C: Amplificación genes BLEE- PCR MÚLTIPLEX.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Primers utilizados para la detección de genes de BLEE en la PCR múltiplex .....	26
------------------------------------------------------------------------------------------	----

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Total de muestras BLEE positivas obtenidas en el año de muestreo .....	28
Gráfico 2: Genes de resistencia en <i>E. coli</i> .....	29
Gráfico 3: Genes de resistencia en <i>K. pneumoniae</i> .....	29
Gráfico 4: Combinaciones de los genes BLEE presentadas en las muestras de <i>E. coli</i> .....	30
Gráfico 5: Gráfico de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> .....	31
Gráfico 6: Gráfico de resistencia a antibióticos en <i>K. pneumoniae</i> .....	31
Gráfico 7: Gráfico de sensibilidad a antibióticos en <i>E. coli</i> .....	32
Gráfico 8: Gráfico de sensibilidad a antibióticos en <i>K. pneumoniae</i> .....	32

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1. Infecciones de vías urinarias

Se define, epidemiológicamente, como infección del tracto urinario a la presencia de  $10^5$  bacterias/ml en la orina (bacteriuria). Alrededor del 35% de mujeres sanas sufren infecciones de vías urinarias (ITUs) en algún momento durante su vida; la consulta por síntomas sugestivos de ITU es de 0,5-1%, y 5% de mujeres acuden al médico general con disuria. La ITU es la causa más común de septicemia causada por bacterias Gram- negativas (Lee y Neild, 2007).

Las infecciones de las vías urinarias, son una de las infecciones bacterianas más comunes en el mundo, afectando a 150 millones de personas por año; siendo en el año 2007 únicamente en Estados Unidos el 10,5 millones de consultas por síntomas de ITUs (0,9% de consultas a nivel ambulatorio) con un gasto de \$3,5 billones por año (Mireles, Walker y Hultgren, 2015). En el Ecuador, de acuerdo a datos del INEC, se ha determinado que las infecciones de vías urinarias son un problema de salud pública ubicándose en el octavo puesto de las principales causas de morbi-mortalidad; siendo la razón del 30% de consultas ambulatorias por año, pacientes en los que se busca directamente erradicar el organismo invasivo, evitar urosepsis, prevenir o minimizar daño renal, entre otras más

### 1.2. Clasificación

Las ITUs comprenden una gran variedad de cuadros clínicos dependiendo de la localización de la infección. A nivel clínico, se clasifican en complicadas y no complicadas, siendo estas últimas las que afectan generalmente a individuos sanos que no tienen anomalías neurológicas o estructurales del tracto urinario. Estas infecciones se dividen en ITUs bajas o cistitis, e ITUs superiores o pielonefritis (Mireles, Walker y Hultgren, 2015).

La cistitis se define como infección de la vejiga en conjunto con síntomas de disuria, dolor suprapúbico, alta frecuencia y urgencia urinaria. Por otro lado, la pelionefritis se denomina a la infección del riñón, caracterizada por síntomas de cistitis en conjunto con fiebre, dolor de flanco, dolor del ángulo costovertebral, náusea y vómito (Mireles, Walker y Hultgren, 2015).

Los factores de riesgo asociados a ITUs no complicadas son: ITU previa, la actividad sexual, reciente exposición a antibióticos, susceptibilidad genética y el sexo femenino, debido a la uretra corta y su proximidad al intestino (Mireles, Walker y Hultgren, 2015) (Lee y Neild, 2007).

### **1.3. Diagnóstico**

La relevancia de hacer uso de métodos confiables y de rápida detección para el diagnóstico de ITUs reside en la importancia de comenzar oportunamente con el manejo de antibióticos, disminuyendo de esta manera la tasa de morbi-mortalidad, gastos en consulta, y aumento de resistencia de los antimicrobianos (Reyes, Gómez y Rodríguez, 2013).

En primera instancia se realiza el análisis clínico en el que el doctor interroga al paciente (anamnesis) con el fin de recoger datos en su historia clínica, tales como: sus antecedentes personales y familiares, sintomatología, signos, entre otra información necesaria para obtener un objetivo diagnóstico; seguido, se examina clínicamente al paciente, exploración física (Gomila, 2008); y finalmente, se da una impresión diagnóstica de infección de la vía urinaria, y se envían exámenes de laboratorio de muestra de orina.

Para la recolección, transporte y conservación de la muestra, primero se debe indicar al paciente las instrucciones para la recolección adecuada de la misma; esto debido a que a pesar de que la orina en la vejiga es estéril es fácil su contaminación por micción con flora del periné, uretra o vagina. Para esto se debe seguir los métodos de recolección de acuerdo a

la condición del paciente: por bolsa pediátrica; punción suprapúbica; cateterismo vesical; sonda vesical permanente; y micción espontánea, método no invasivo más utilizado en la que se debe descartar el primer chorro de orina y recoger la muestra a partir del chorro medio, en un frasco recolector estéril de boca ancha. El transporte de la muestra al laboratorio debe ser inmediato y la muestra debe contener los datos del método de extracción utilizado, la hora en la que se tomó la muestra y uso previo de antibióticos (Thomson, 2007).

Existen varios métodos de diagnóstico para la detección de ITU. Para el procesamiento de la muestra el diagnóstico clínico se debe basar en los siguientes análisis: primero la identificación de ITUs por medio del examen elemental y microscópico de orina (EMO), en el que se realiza una evaluación física observando el color (si sigue o no el espectro normal de cristalino a amarillo oscuro de acuerdo a su concentración), aspecto (claridad o turbidez) y olor; evaluación química, por medio del uso de tiras reactivas las que al tomar contacto con la muestra generan cambios de color en sus almohadillas marcando parámetros como el pH, proteínas, glucosa, sangre, bilirrubina, nitritos, urobilinógenos, leucocitos y la densidad; y el examen microscópico, en el que la presencia de 5 o más leucocitos por campo indica infección urinaria (Martínez y Aguilar, 2015).

Uno de los métodos de tamización para el diagnóstico rápido de infecciones de tracto urinario es el Gram de orina. Este es un método económico en el que si se observa una bacteria por campo se asume un recuento de colonias de  $10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. No obstante, en el caso de obtener un número menor de UFC la sensibilidad del método disminuye al descartar bacterias que pueden ser importantes para el diagnóstico de ITUs (Esparza, Motoa, Robledo y Villegas, 2015).

Finalmente se realiza la prueba Gold estándar de mayor importancia para el diagnóstico de ITU, el urocultivo. El urocultivo, es el examen microbiológico del cultivo de orina en el que se considera como positivo a la presencia de  $>10^5$  UFC/ml en mujer con pielonefritis y

con bacteriuria asintomática por medio de chorro medio,  $>10^3$  UFC/ml en hombre con ITUs por chorro medio,  $>10^2$  UFC/ml en mujer con cistitis por medio de la recolección de la muestra por chorro medio, y  $>10^2$  UFC/ml en todos los pacientes en los que se haya extraído la orina a través de catéter recto y aspiración suprapúbica (Reyes, Gómez y Rodríguez, 2013). El cultivo de orina se puede realizar en medios enriquecidos, selectivos y diferenciales tales como: el medio de cultivo Cysteine Lactose Electrolyte Deficient (CLED) el cual permite recuperar uropatógenos de importancia y el medio MacConkey Agar (MKL) que inhibe el desarrollo de la flora Gram positiva y permite el aislamiento de bacilos Gram negativos, como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), entre otros más (Britanialab, s.f. a).

Siguiendo las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud y Organización Panamericana de la Salud, la selección, la concentración y la interpretación de los discos empleados para el diagnóstico de susceptibilidad microbiana de los patógenos aislados en orina siguen la guía del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); prueba de difusión por disco (antibiograma Kirby Bauer (KB)) en agar Muller-Hinton, que correlaciona el diámetro de inhibición presentado con la sensibilidad del microorganismo a determinado antibiótico (Riera, Chamorro, Zárate, Falcón y Franco, 2008). En *Enterobacteriaceae*, la estrategia de tamización para los antibióticos betalactámicos es: ampicilina /sulbactam, cefazolina (para la actividad de cefalosporinas orales), ceftriaxone, ceftazidime, ertapenem, aztreonam, meropenem y piperacilina/ tazobactam (Esparza, Mooto, Robledo y Villegas, 2015). De acuerdo a los resultados del antibiograma, las bacterias que presenten resistencia a la ceftazidime se les realiza la prueba fenotípica confirmatoria para betalactamasas; prueba confirmatoria por el método de doble disco y realizada en agar Mueller Hinton con los discos: ceftazidima (30 ug), ceftazidima-ácido clavulánico (30/10 ug), cefotaxima (30ug) y cefotaxima-ácido clavulánico (30/10 ug); determinando como BLEE positivo aquellas

muestras que presentan, en el disco de cefalosporina más ácido clavulánico (inhibidor de betalactamasas), un halo que supera por 5 mm al disco de cefalosporina sola (Lezameta, Gonzáles y Tamariz, 2010).

#### **1.4. Etiología**

Las ITUs pueden ser causadas tanto por bacterias Gram-negativas, como por bacterias Gram-positivas y por ciertos hongos. Como agente principal, más común, para las ITUs no complicadas esta *Echerichia coli* uropatógena (UPEC), asociada al 75% de estas infecciones, seguido de *K. pneumoniae* la que en ocasiones puede ser más agresiva que *E. coli*, entre otros microorganismos más (Mireles, Walker y Hultgren, 2015). Comúnmente, la causante de la mayoría de casos de cistitis y pielonefritis es la infección ascendente por medio de la entrada de bacterias a través de la uretra (Lee y Neild, 2007).

El proceso de adherencia de UPEC comienza con los uropatógenos residentes en el intestino, los cuales contaminan el área periuretral y colonizan la uretra. Seguido, estos microorganismos migran a la vejiga e invaden el uroepitelio por medio de la producción de toxinas y proteasas en altas concentraciones;  $\alpha$ - hemolisina (HlyA), la que se integra en los microdominios ricos en colesterol en la membrana de la célula huésped y resulta en la formación de poros en las células paraguas, evadiendo el sistema inmune. UPEC se une a uroplakins (los que forman una matriz cristalina para proteger al tejido de la vejiga, construcción de proteínas de placas uroteliales) por medio de pilis. En el caso de UPEC, este patógeno expresa una familia de adhesinas llamada Chaperone-usher pathway pili (CUP), conformada por diferentes adhesinas, principalmente por pili tipo 1 y P pili. El pili tipo 1, ayuda en la colonización, invasión y a la persistencia de UPEC en la vejiga; permitiendo que UPEC se adhiera directamente al epitelio de la vejiga, facilitando la invasión de tejidos y promoviendo las interacciones interbacterianas para la formación de biofilms; este además se

asocia con la adhesina FimH7, la que reconoce a las uroplakinas manosiladas, y a las integrinas  $\alpha3\beta1$  (integrinas que se expresan en la superficie de los uropatógenos y pueden servir como receptores), generando el desencadenamiento de una cascada de transducción de señales lo que provoca el reordenamiento de la actina y la entrada de UPEC (invasión que permite a UPEC alterar algunas de las defensas del huésped). Mientras que el pili asociado a pielonefritis (P), P pili, o PapG, modula la respuesta inmune secretor-anticuerpo interaccionando con el Toll-like receptor 4 (TLR4) y reduce la expresión del receptor de inmunoglobulina (PIGR), lo que genera daños en el transporte de la inmunoglobulina A por la lámina propia y de las células epiteliales al lumen del riñón; inhibición que permite a UPEC evadir el mecanismo protector del huésped generando una infección ascendente. UPEC también secreta el factor necrotizante citotóxico (CNF1), el que afecta la remodelación de la actina en la célula huésped; proceso que evita la apoptosis del uroepitelio colonizado, facilitando que UPEC sobreviva (Mireles, Walker y Hultgren, 2015).

Como consecuencia se produce una respuesta inhibitoria por parte del hospedador, infiltración de neutrófilos, los que juegan un papel central en la inmunidad innata al realizar fagocitosis y liberar reactivos anti-patógenos. Sin embargo, los patógenos capaces de evadir el sistema inmune, se siguen multiplicando y forman comunidades transitorias de bacterias intracelulares, (parecidas a biofilm), (IBCs); conjuntamente, también puede establecer depósitos intracelulares quiescentes (QIRs) conformados por bacterias no replicantes que permanecen viables durante meses y son capaces de reactivarse e iniciar una ITU recurrente. Este proceso es ayudado por la secreción de sideróforos (aerobactina y yersiniabactina) los que ayudan en la formación de biopelículas y protegen a la bacteria de muerte intracelular por estrés de cobre (Mireles, Walker y Hultgren, 2015).

Seguido, los uropatógenos ascienden a los riñones uniéndose a estos por medio de adhesinas o pili para colonizar el epitelio renal, esto con el fin de producir toxinas dañinas

para los tejidos celulares. Las ITUs pueden progresar a bacteremia si los uropatógenos cruzan la barrera epitelial tubular renal para alcanzar al torrente sanguíneo (Mireles, Walker y Hultgren, 2015).

En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, este patógeno sigue un mecanismo similar al de UPEC. Utiliza un pili tipo 1 para formar biopelículas y colonizar la vejiga, con la diferencia que la FimH de *klebsiella* tiene una acción adherente débil, a diferencia de la FimH de UPEC. No obstante, *K. pneumoniae* Fimh es un factor importante de virulencia durante la fase de colonización, formación de biofilm, y persistencia de este microorganismo en las ITU. Además, esta bacteria codifica un gran número de pili de CUP, como por ejemplo pili de tipo 3, el que ayuda, de igual manera que el pili tipo 1, en la colonización, formación de biofilm y persistencia durante ITUs asociadas a cateter (CAUTI). Este microorganismo, además, utiliza sideróforos: enterobactina y aerobactina, los que ayudan a evitar la muerte celular y a la formación de biopelículas (Mireles, Walker y Hultgren, 2015).

### **1.5. Tratamiento**

Las ITUs generan una alta carga económica y problemas de salud pública debido a la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos. En la actualidad, los antibióticos betalactámicos son los más utilizados para este tipo de infección (Mireles, Walker y Hultgren, 2015).

### **1.6. Antibióticos betalactámicos**

Los antibióticos betalactámicos son bactericidas de actividad lenta que generan su efecto, principalmente, a través de dos mecanismos: actúan en la etapa de crecimiento de las bacterias al inhibir la síntesis de la pared celular del microorganismo atacando a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) las que participan en la formación del peptidoglicano de la

pared celular, e inducen la autólisis bacteriana. Hasta el día de hoy, estos antibióticos son los antimicrobianos más numerosos y prescritos, tanto en hospitales como en atención primaria, lo que ha detectado un aumento de resistencias cada vez mayor, y por ende, un aumento del interés sobre su administración como estrategia terapéutica (Suárez y Gudiol, 2008).

El mecanismo de acción como la definición química de este tipo de antibióticos se basa en la presencia de un anillo betalactámico, anillo que debe estar unido a otros radicales para estar activo; siendo la agrupación de diferentes cadenas lineales en conjunto con el esqueleto (formado por 2 anillos) los que dan las diferentes propiedades a los compuestos. Existen cinco diferentes grupos de betalactámicos: penicilinas, carbapenémicos, cefalosporinas, inhibidores de betalactamasas y monobactamas (Suárez y Gudiol, 2008).

Dentro de las penicilinas están: la penicilina G, la cloxacilina, la ampicilina, amoxicilina, (mayor actividad frente a Gram negativos y frente a bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) al asociarse con inhibidores de betalactamasas), carbenicilina, mezlocilina y piperacilina (Ministerio de Salud Pública, 2013).

Los betalactámicos carbapenémicos son los de más amplio espectro, abarcando incluso a los microorganismos productos de BLEE; aquí se encuentra el imipenem, meropenem y ertapenem (Suárez y Gudiol, 2008).

En cuanto a los monobactamas, el único antibiótico disponible para uso clínico, es el aztreonam, el cual posee una gran actividad frente a bacterias Gram negativas aerobias y facultativas; no obstante, son inactivos frente a Gram positivos y bacterias anaerobias (Suárez y Gudiol, 2008).

En cuanto a las cefalosporinas, estas se dividen en: cefalosporinas de primera generación, la cefalexina, la cefazolina, cefalotina, entre otras más; cefalosporinas de segunda generación, cefuroxima, cefamandol, cefaclor, cefonicida; cefalosporinas de tercera generación, la ceftazidima, cefotaxima, cefpodoxima y la ceftriaxona; cefalosporinas de cuarta generación,

la cefepima (Chiriboga y Araujo, 2012); y cefalosporinas de quinta generación, como el ceftobiprole y la ceftarolina (Bustos, 2012).

Y finalmente, los inhibidores de las betalactamasas que son moléculas que tienen una alta afinidad frente a estas enzimas, evitando de esta manera la inactivación del betalactámico: el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Suárez y Gudiol, 2008). Las combinaciones principalmente utilizadas en personas que tienen cepas resistentes a BLEE son: piperacilina + tazobactam, ampicilina + sulbactam y amoxicilina + ácido clavulánico (Ministerio de Salud Pública, 2013).

### **1.7. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)**

La resistencia microbiana en bacterias se ha convertido en un problema de gran preocupación por parte de los profesionales de la salud; el incremento de microorganismos resistentes a antibióticos de uso frecuente se encuentra ampliamente documentado. La resistencia a  $\beta$ -lactámicos se da por diversos principios: modificaciones en el sitio blanco, el que se puede dar por modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico o también la adquisición de genes que codifican para sustitutos de los blancos originales; alteraciones de la permeabilidad de la membrana, al disminuir la expresión de porinas, haciendo a la membrana impermeable a sustancias hidrofóbicas al disminuir el flujo de llegada del antibiótico al periplasma; y finalmente, inactivación enzimática, por medio de mecanismos hidrolíticos de betalactamasas, siendo este el principal mecanismo de resistencia y de mayor importancia clínica.

Las  $\beta$ -lactamasas actúan en la fase de división celular rompiendo el puente amida del anillo betalactámico; evitando que el antibacteriano se una covalentemente a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) y que no se impida la síntesis de la pared celular (Romero, Gómez, Rodríguez y Pedral, 2011). Las primeras  $\beta$ -lactamasas conocidas fueron la

penicilinasas, sin embargo, tras la introducción de la ampicilina (1960) se encontró una  $\beta$ -lactamasa capaz de hidrolizarla. Debido al efecto de ampliación que tenían estas enzimas en el espectro de hidrólisis de las penicilinasas, se las llamó  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado (BLEA). Tiempo después, surgieron una serie de  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactames; dada a la extensión del espectro de hidrólisis en relación con las BLEAs se las denominó  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), siendo conocidas hoy en días más de 300 BLEE de diferentes familias (Casellas, 2011).

Debido a las modificaciones que ha habido en las  $\beta$ -lactamasas a través del tiempo, creando nuevas clases de resistencia, se las ha clasificado en dos esquemas generales: el esquema de clasificación molecular de Ambler, el que divide a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases (A- D) de acuerdo a la similitud de sus aminoácidos mas no por sus características fenotípicas; y el esquema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros, clasificado de acuerdo a la similitud de sus funciones. En la clase A de Ambler se encuentran las enzimas TEM-1 y SHV-1, subtipos de los que se derivan la mayoría de BLEEs; siendo la enzima TEM-1 la de mayor frecuencia en bacterias Gram- al ser capaz de hidrolizar cefalosporinas y penicilinas. Las  $\beta$ -lactamasas tipo SHV, generalmente son las más frecuentes en aislamientos en Enterobacterias y denotan una respuesta variable a los inhibidores sulfhidrilo. Las CTX-M, son enzimas que reflejan potente actividad hidrolítica contra la cefotaxima, quinolonas, aminoglucósidos, y sulfamidas tales como ciprofloxacina, gentamicina y trimetropim-sulfamethoxazol (Auer, Wojna, y Hell, 2010). Y las BLEE de tipo OXA que se encuentran en el grupo D y tienen mucha similitud con las de tipo TEM y SHV, se caracterizan por su alta actividad hidrolítica contra oxacilina y cloxacilina. Otras BLEE son las PER-1, las que hidrolizan eficientemente penicilinas y cefalosporinas, y las VEB-1 que tienen alta homología con PER-1; enzimas de menor incidencia en Latinoamérica.

## 1.8. Formas de diseminación

Un factor principal que se debe tomar en cuenta para el control de la resistencia a antibióticos es el mecanismo de difusión de los genes codificadores de BLEE. Entre las principales vías por las que se pueden adquirir genes de resistencia, dentro de la misma especie como a otras, esta: la transformación, transducción y conjugación; mecanismos conocidos como difusión horizontal de resistencia a antimicrobianos (Navarro y Miró, 2007). La localización genética de los genes de las betalactamasas (bla) es clásicamente en plásmidos o cromosomas; no obstante, debido a la capacidad de movilización e integración en plásmidos y transposones dependiendo del tipo de enzima, en cada familia de BLEE se diferencia el proceso de diseminación.

Las familias TEM, SHV y OXA se derivan de mutaciones puntuales de TEM-1, TEM-2, SHV-1 y OXA-10 mediadas por plásmidos clásicos; mientras que la familia de CTX-M, constituida por un grupo complejo y no homogéneo de enzimas, se sugiere se originaron por medio de movilización de genes bla cromosómicos del microorganismo *Kluyvera spp.* al integrarse a elementos genéticos móviles. No obstante, desde el punto evolutivo, al igual que otras BLEE, las CTX-M posteriormente divergieron por mutaciones puntuales como consecuencia de presión selectiva de antibióticos (Cantón, González y Galán, 2012).

En cuanto a los principales factores asociados a la presencia de ITU por BLEE en la comunidad están: uso previo de antibióticos, tales como cefuroxima, cefalosporinas, aztreonam y quinolonas; personas con infecciones recurrentes por *E. coli*; personas hospitalizadas recientemente (dentro del último año); la presencia de dos o más enfermedades (comorbilidades) que demanden el manejo de las mismas en cuidados intensivos; estancia en hogares de paso; hemodiálisis; y personas con familiares hospitalizados (Blanco, Maya, Correa, Perenguez, Muñoz, et al., 2015).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia que generan los microorganismos productores de BLEE se considera una amenaza de salud pública en América Latina dada la dificultad que generan al reducir las opciones de tratamiento, la estancia hospitalaria, fracaso terapéutico, costos de salud y morbilidad de los pacientes (McGowan y Tenover, 2004). De acuerdo a datos publicados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) se reportó que en cepas de *E. coli* la incidencia de resistencia a cefotaxime es del 53% y a ceftazidime del 28%, mientras que en *K. pneumoniae* el 70% es resistente a cefotaxime y el 68% a ceftazidime; datos obtenidos de muestras de orina de origen hospitalario (Reyes, Villacís, Vásquez, Villavicencio, Ushiña, et al., 2014). Estos datos muestran la alta incidencia de resistencia microbiana en el país, en especial en organismos causantes de infecciones urinarias, infecciones más comunes en pacientes ambulatorios, siendo estos los más afectados; por lo que a nivel de epidemiología es importante determinar el tipo de BLEE circulante en los pacientes no hospitalizados (ambulatorios) que padecen infecciones con bacterias multiresistentes. Principalmente, debido a la falta de información que se tiene sobre los distintos genes que codifican la producción de BLEE y que afectan a pacientes ambulatorios. El Foro Económico Mundial indica que la resistencia a antibióticos es una de las principales amenazas para la salud humana (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, y Piddock, 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Determinar el tipo de Beta lactamasa de espectro extendido (BLEE) en Enterobacterias (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) aisladas de urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios, a través de pruebas moleculares.

#### Objetivos específicos

- Realizar pruebas moleculares para determinar el tipo de BLEE: TEM, SHV, CTX-M y OXA.
- Determinar la resistencia y sensibilidad de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de Beta-lactamasas de espectro extendido a través del análisis de antibiogramas.
- Determinar el porcentaje de cepas de *Escherichia coli* y *klebsiella pneumoniae* productoras de Beta-lactamasas de espectro extendido de todos los urocultivos analizados en el año de muestreo.

## 4. ÁREA DE ESTUDIO

### 4.1. Población a estudiar

El aislamiento de bacterias se realizó durante un año, desde mayo del 2014 hasta mayo del 2015, a partir de muestras de orina de pacientes ambulatorios provenientes de dos centros de salud: Sistemas Médicos Universidad San Francisco de Quito (SIME) y Clínica de Especialidades Tumbaco. De los 2,281 urocultivos procesados durante todo el año de muestreo, 793 presentaron ITUs, de los cuales las bacterias almacenadas debían cumplir con los siguientes requerimientos: primero, ser identificadas bioquímicamente como *E. coli* y *K. pneumoniae* a través de un set de pruebas bioquímicas: Agar-hierro-triple azúcar (TSI), medio empleado para diferenciar Enterobacterias de acuerdo a la fermentación de lactosa, glucosa y sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico (Britanialab, s.f. c); prueba sulfuro-indol-motilidad (SIM), medio semisólido que verifica la movilidad y la producción de indol y de sulfuro de hidrógeno, útil para diferenciar entre Enterobacterias (Britanialab, s.f. b); Simmons Citrato agar y Christensen medio (urea). Para *E. coli*: TSI: A/A (pico y fondo ácido que representa la fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa) más gas; SIM: indol positivo, motilidad variable y producción de ácido sulfhídrico negativo; medio de urea negativo; y medio de citrato negativo. Para *K. pneumoniae*: TSI: A/A más gas; SIM: indol negativo, producción de ácido sulfhídrico negativo y motilidad negativo; urea positivo; y citrato positivo.

Seguido, una vez realizado el antibiograma; las muestras que presentaron resistencia a cefuroxime se les realizó la prueba confirmatoria de BLEE siguiendo los lineamientos establecidos por el CLSI. De las 793 bacterias positivas para ITUs 148 presentaron producción de BLEE, bacterias que fueron almacenadas en el medio Brain Heart Infusion (BHI) más glicerol al 20% a menos 80°C.

Finalmente, de las 148 BLEE positivas se seleccionaron 100 muestras para el análisis molecular. Para esto se ordenó a las 148 muestras de acuerdo a su mes de recolección y se separó por cada mes un número equitativo de muestras; aproximadamente 8 por período. De las 100 muestras, 98 fueron *E. coli* y 2 *K. pneumoniae*. El porcentaje bajo de *K. pneumoniae* se debe a que este fue el número total de cepas aisladas durante mayo de 2014 a mayo 2015.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Formulario Comité de bioética**

Para el posterior análisis de las muestras, se llenó y envió la documentación necesaria de la investigación junto con los formularios de aplicación al Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), tal como lo establecido por este comité. La investigación fue registrada con código 2015-167T y aprobada como un estudio exento al ser las bacterias analizadas en este proyecto, aisladas de urocultivos de pacientes de dos centros médicos, con infección de vías urinarias, después del correspondiente informe o resultado, desechadas; por lo que para esta investigación no hubo contacto directo con las personas de las que se obtuvo estas muestras y la información que se adquirió de cada paciente para el estudio se encuentra identificada y registrada por medio de códigos, tanto en los cuadernos de seguimiento como en la base de datos en Excel. De esta manera, la identidad y confidencialidad de los datos de los participantes no es ni será utilizada o revelada bajo ninguna circunstancia.

### **5.2. Extracción ADN**

Se utilizó la técnica de extracción por ebullición siguiendo el protocolo establecido en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ, como se detalla a continuación: se tomó 500ul de la muestra y se lo transfirió a un tubo estéril de 1,5ml; seguido, se etiquetó el tubo que contenía la muestra y se lo hirvió durante 10 minutos a baño maría; pasado este tiempo, se congeló la muestra a -20°C toda la noche, luego se la retiró de congelación, se la descongeló y se le dio un giro (spin) en la centrífuga; finalmente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1,5 ml.

### **5.3. Cuantificación ADN**

Para la cuantificación de ADN primero se diluyó al ADN en agua grado PCR a relación 10:90. Luego se cuantificó el ADN utilizando un espectrofotómetro General Electric. Las diluciones ya analizadas se almacenaron a -20°C hasta la realización de las pruebas moleculares.

#### **5.4. Amplificación gen HouseKeeping de *E. coli***

Como control positivo para la identificación de *E. coli*, se analizó la detección de uno de los genes Housekeeping de este microorganismo, gen pur A, gen que participa en la biosíntesis de nucleótidos de purina y codifica enzimas para la producción de adenosín monofosfato (AMP) a partir de inosinato (IMP) (Sun, Fukamachi y Kobayashi, 2011). Este proceso se analizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los primers específicos:

purAF 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3'

purAR 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'

Primers que fueron seleccionados al estar disponibles en la base de datos de la secuencia extensa de genes Housekeeping de *E. coli* los cuales han sido utilizados para estimar la estructura de la población de este microorganismo y para demostrar la recombinación generalizada en esta especie. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial por 2 minutos (min) a 95°C, 30 ciclos de 1 min a 95° C de denaturación, annealing a 57°C por 1 min, y extensión por 2 min a 72°C. Una extensión final de 5 min a 72°C (Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa., et al., 2006). El producto de amplificación fue observado en electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, teñido con bromuro de Etidio a 100V

por 45-60 minutos. El tamaño de los productos amplificados se comparó con el ladder comercial (Invitrogen) de 100-pb. El tamaño de banda esperado fue de 816 pb.

### 5.5. Amplificación de genes que codifican la producción de Betalactamasas

Para la identificación del tipo de BLEE en las muestras se realizó la detección de los genes que codifican la producción de las enzimas: SHV, TEM, CTX-M y OXA, mediante múltiplex PCR. Para esto se utilizaron los primers indicados en la Tabla 1.

*Tabla 1: Primers utilizados para la detección de genes de BLEE en la PCR múltiplex*

Genes que codifican BLEE	Secuencia de los Primers (5' a 3')
blaSHV	F: CTT TAT CGG CCC TCA CTC AA R: AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG
blaTEM	F: CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA R: ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT
blaCTX-M	F: ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC R: TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG
blaOXA	F: ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C R: AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 15 min de denaturación inicial a 95°C; seguido de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 62°C por 90 segundos y extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión final a 72° C por 10 minutos. Los productos de amplificación fueron observados en electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, teñido con bromuro de Etidio a 100V por 45-60 minutos. El tamaño de los productos amplificados se comparó con el ladder comercial (Invitrogen) de 100-pb. El

tamaño de banda (pb) para gen fue de: blaSHV: 237, blaTEM:445, blaCTX-M:593 y blaOXA:813 (Fang, Ataker, Hedin y Dornbusch, 2008).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Total de muestras BLEE positivas en el año 2014-2015 en el laboratorio de microbiología de la USFQ

Del total de urocultivos con ITUs analizados en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ durante todo el año de muestreo (793 muestras), de mayo 2014 a mayo 2015, 140 fueron identificados como BLEE positivos de acuerdo a la prueba de doble disco; cepas que representan el 17,65% de todos los urocultivos de este año respectivamente.

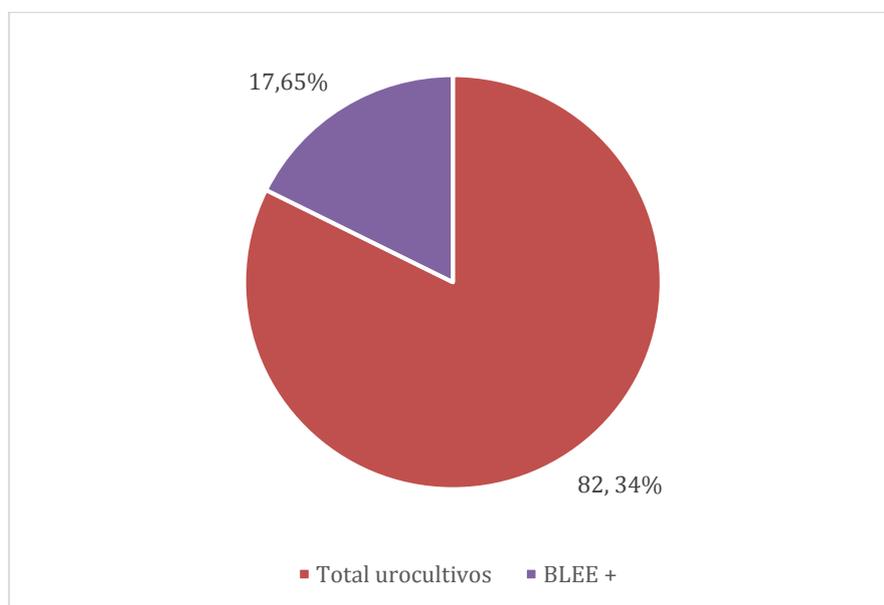


Gráfico 1: total de muestras BLEE positivas obtenidas en el año de muestreo

### 6.2. Análisis gen purA

90 de las 98 muestras seleccionadas y analizadas de *E. coli*, identificadas bioquímicamente como *E. coli*, dieron positivo para la técnica de PCR en la amplificación del gen purA. Siendo el 91,8% de las cepas correctamente identificada. El producto amplificado se observó a 816 pb. (Anexo B).

### 6.3. Determinación del porcentaje de BLEE

De las 90 muestras de *E. coli* BLEE positivas seleccionadas, se obtuvo, mediante la técnica de PCR multiplex, que el gen de betalactamasa que más predomina es el CTX-M (96,67%), seguido por el TEM (28,89%), y finalmente el SHV (2,22%). No se presentó ningún resultado para el gen OXA (0%). Estos datos se encuentran representados en el Gráfico 2.

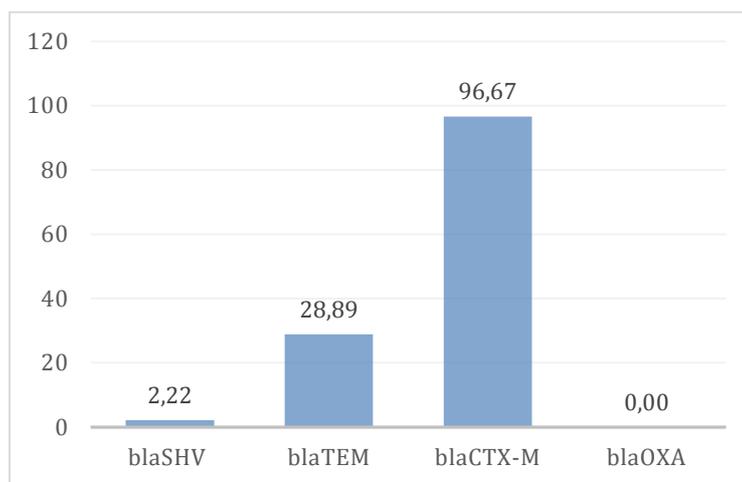


Gráfico 2: Genes de resistencia en *E. coli*

En cuanto a las cepas de *K. pneumoniae* se encontró que las dos muestras analizadas presentaron los genes: SHV, TEM y CTX-M; y ausencia del gen OXA. Gráfico 3.

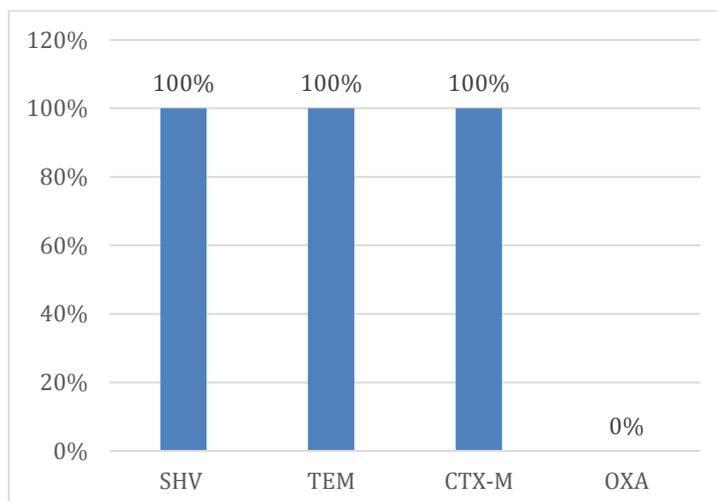


Gráfico 3: Genes de resistencia en *K. pneumoniae*

Finalmente, por medio de la PCR múltiple, se pudo observar la co-existencia de varios genes de resistencia en *E. coli* y *K. pneumoniae*. A continuación, en el Gráfico 4., se muestran las diferentes combinaciones presentadas de los genes BLEE en cepas de *E. coli*: 63% presentaron el gen blaCTX-M solo, 23% la combinación blaTEM-blaCTX-M, y el 1% presentó los genes blaTEM-blaSHV-blaCTX-M. En el Anexo C, se presentan las imágenes de los geles de agarosa obtenidos de cada una de las muestras analizadas; aquí se pueden observar las diferentes bandas respectivas al tamaño de fragmento (pb) de cada gen.

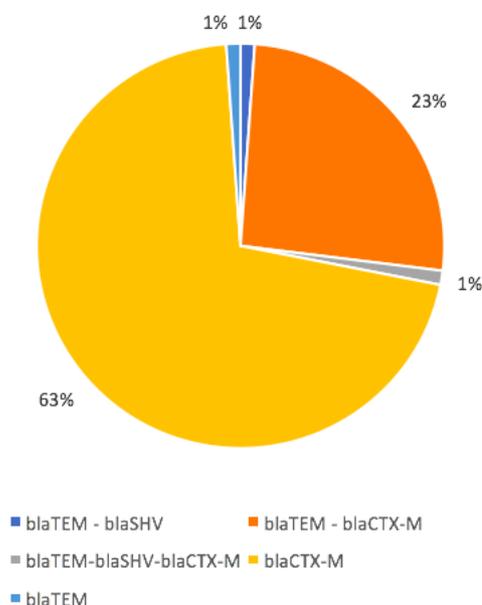


Gráfico 4: Combinaciones de los genes BLEE presentadas en las muestras de *E. coli*

De las dos muestras analizadas de *K. pneumoniae*, el 100% tuvo la presencia de tres de los cuatro genes de BLEE analizados: blaTEM- blaSHV- blaCTX-M.

### 6.1. Análisis de resistencia bacteriana según la interpretación de los antibiogramas

Las muestras de *E. coli* BLEE positivas presentaron las siguientes resistencias: ampicilina y cefuroxima, resistencia total del 100%; cefalotina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina con resistencia mayor a 90%. Seguido, se encuentran trimetoprima + sulfametoxazol con 82,50%,

ampicilina + sulbactam con una resistencia del 67,78% y la gentamicina con el 56,82%.

Resultados que se expresan en el Gráfico 5.

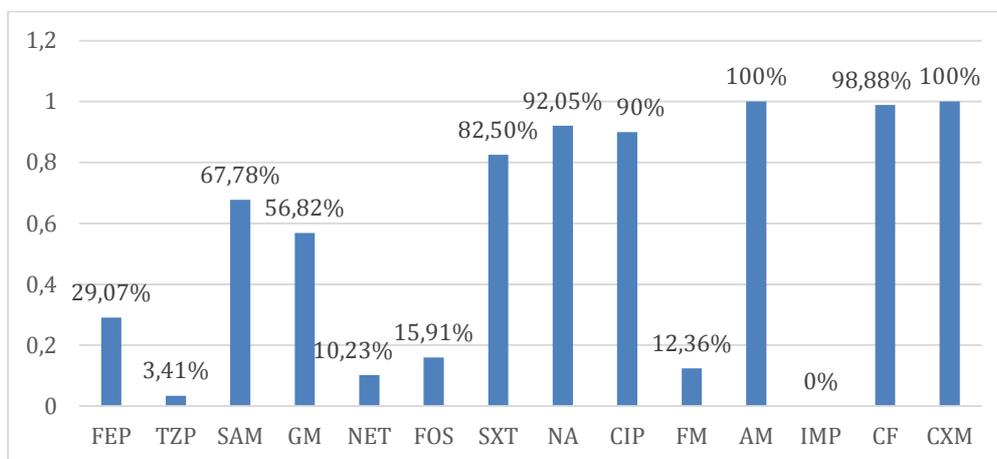


Gráfico 5: Gráfico de resistencia a antibióticos en *E. coli*

Por otro lado, las muestras de *K. pneumoniae* BLEE positivas presentaron una resistencia del 100% a los mismos 8 antibióticos presentados en *E. coli* más nitrofurantoína.

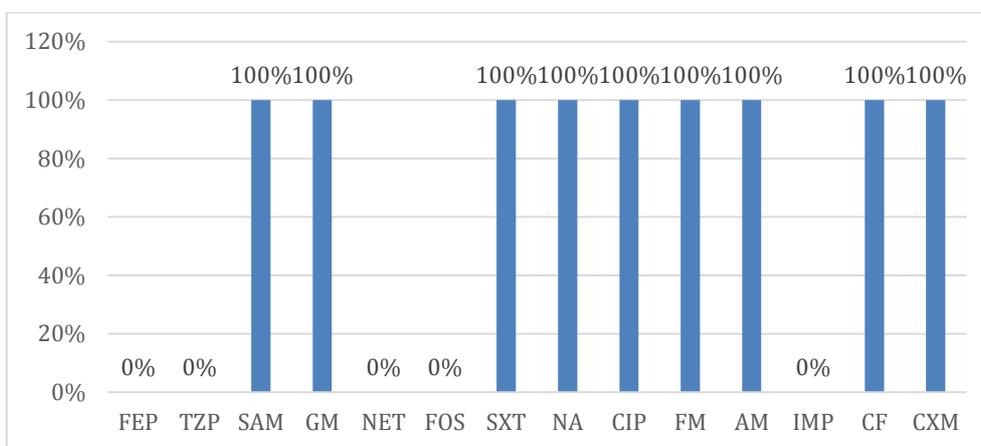


Gráfico 6: Gráfico de resistencia a antibióticos en *K. pneumoniae*

En cuanto a la alta sensibilidad que presentaron las cepas de *E. coli* analizadas están: imipenem con el 98,88%, nitrofurantoína con 86,52% y fosfomicina con 82,95%, tal como se puede observar en el Gráfico 7.

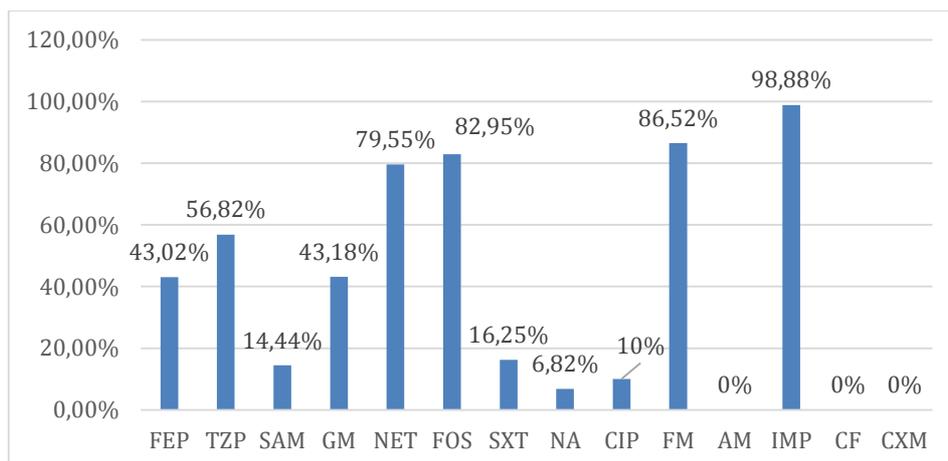


Gráfico 7: Gráfico de sensibilidad a antibióticos en *E. coli*

Mientras que en *K. pneumoniae* se presentó sensibilidad del 100% a: imipenem, fosfomicina y cefepima. Gráfico 8.

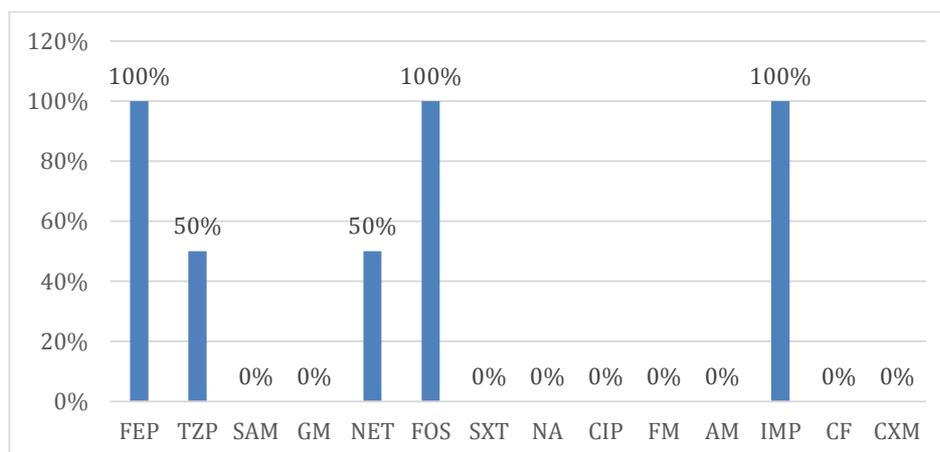


Gráfico 8: Gráfico de sensibilidad a antibióticos en *K. pneumoniae*

FEP: cefepima; TZP: piperacilina + tazobactam; SAM: ampicilina + sulbactam; GM: gentamicina; NET: netilmicina; FOS: fosfomicina; STX: trimetoprima + sulfametoxazol; NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; FM: nitrofurantoína; AM: ampicilina; IMP: imipenem; CF: cefalotina; CTX: cefuroxima.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Resistencia a BLEE presentada en la comunidad

Tradicionalmente, la presencia de Betalactamasas ha sido asociada con infecciones hospitalarias; sin embargo, se ha encontrado cambios en la epidemiología, por medio de la diseminación y aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M, familia de BLEE de origen comunitario que se está diseminando a nivel mundial y a rápida velocidad (Rodríguez y Navarro, 2007); siendo detectado en los últimos años el incremento de BLEE en establecimientos ambulatorios con ITUs (Leal, Cortés, Arias, Ovalle, Saavedra, et al., 2013).

El alto nivel de resistencia a BLEEs se pudo presenciar en el estudio al determinar el número total de BLEEs positivas aisladas durante el año de muestreo (mayo 2014- mayo 2015). De los 793 urocultivos con ITUs analizados en todo el año de muestreo por el Laboratorio de Microbiología de la USFQ, 140 (17, 65%) fueron BLEEs positivos. Gráfico 1.

En un estudio analizado en el Hospital Vozandes Quito en el año 2005-2009 sobre la epidemiología de las infecciones por microorganismos productores de BLEE en este determinado establecimiento se encontró que 86,9% de la población de estudio pertenecía a pacientes ambulatorios, de los cuales se observó un incremento progresivo de cultivos positivos para microorganismos productores de BLEE por año, y el tipo de fluido del cual se aislaron con mayor frecuencia fue de muestras de orina, siendo el patógeno más frecuente *E. coli* seguido de *K. pneumoniae* (Pacheco y León, 2011). Datos que concuerdan con la población estudiada y con los datos obtenidos en la presente investigación.

### 7.2. Análisis gen purA

Tal como se puede observar en los gráficos del Anexo B., el 91,8% de las muestras identificadas bioquímicamente como *E. coli* amplificaron para el gen HouseKeeping de esta

bacteria, gen *purA*. El 8,2% no identificado molecularmente como *E. coli* se pudo haber presentado por diversos factores: errores en la lectura de resultados de las pruebas bioquímicas obtenidos con los de otras Enterobacterias, en cuanto al consumo de azúcares y a la producción de indol y ácido sulfhídrico; la presencia de bacterias con bioquímicas similares a *E. coli*, por error humano o algún procedimiento microbiológico.

Entre las principales limitaciones de las pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos están, para la prueba de citrato: en el caso de tener un inóculo denso, el color del medio puede cambiar, afectando la visualización y generando falsos positivos; además, al sembrar al mismo tiempo varias pruebas bioquímicas a partir del mismo cultivo, al no haber esterilizado correctamente la aguja, o al haber arrastrado materia orgánica de otros medios se puede obtener falsos positivos (Britanialab, s.f.a). Para la prueba de ureasa las limitaciones se deben a la capacidad del buffer del medio, ya que este puede enmascarar la actividad ureásica en bacterias que tienen una lenta hidrólisis de este compuesto, conjuntamente se debe evitar sobrecalentar el medio debido a la fácil descomposición de la urea (Britanialab, s.f.b). Para la prueba en agar TSI, el tiempo es el principal limitante, por lo que se debe cumplir con el tiempo de lectura estimado, entre 18 a 24 horas desde la incubación; si se observa resultados en menor tiempo se pueden presentar falsos positivos, mostrando acidez o insuficiencia de la misma para el viraje del indicador de rojo de fenol a amarillo; y en caso de leer pasado este tiempo se podría obtener falsos negativos ya que puede haber consumo de peptonas durante el crecimiento de los microorganismos; aquí además se puede dificultar la visualización del medio en el caso de haber una elevada generación de  $\text{SH}_2$ , ya que el fondo del medio se puede ennegrecer (Britanialab, s.f.c).

### **7.3. Determinación del porcentaje de BLEE. Mecanismos de transferencia y multirresistencia.**

De acuerdo a lo observado en el Gráfico 2., en *E. coli* se pudo determinar un alto porcentaje de blaCTX-M (96,67%), seguido de blaTEM (28,89%), blaSHV (2,22%) y finalmente blaOXA (0%); mientras que en *K. pneumoniae* se observó la presencia del gen CTX-M, TEM y SHV en las dos muestras analizadas, de igual manera con ausencia del gen OXA; Gráfico 3.

La difusión rápida de CTX-M alrededor del mundo a partir de la primera década del 2000, ha hecho referencia a la “pandemia de CTX-M”, siendo revelado en los últimos 10 años el desplazamiento de casi todas las demás familias de BLEE en Enterobacterias, incluyendo TEM y SHV, por medio de las CTX-M. Este proceso de desplazamiento se pudo haber presentado por varias razones: por la rápida diseminación de los genes blaCTX-M en plataformas genéticas móviles, como plásmidos y transposones; por los clones exitosos; y la coexistencia en los organismos que producen CTX-M, particularmente de los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, lo que facilitaría los procesos de coselección.

En cuanto a las posibles fuerzas selectivas que han contribuido a la diversificación y evolución de CTX-M, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, están los antibióticos: cefotaxima y cefetazidime; las secuencias de inserción (IS) que tienen un papel en el proceso de selección al participar en la sobreexpresión de estos genes, siendo algunos de ellos adyacentes a integrones de estructura que se integran en las unidades de transposición; y la incorporación de las IS en plásmidos conjugativos en los que podrían haber clones exitosos (clones de alto riesgo) principalmente del clon ST131, de extensión internacional (Cantón, González y Galán, 2012). Los clones de *E. coli* asociadas a CTX-M son de alta virulencia y se pueden transmitir fácilmente entre miembros de familia y en pacientes infectados o colonizados (Mihaila et al., 2010).

Dentro de la familia de las CTX-M, las más importantes son las CTX-M-15 y CTX-M-14; esto debido a su capacidad de invasión a compartimentos medioambientales, animales y

humanos; encontrando aumento de cepas productoras de CTX-M-15 en países como Colombia, Uruguay y Perú (Cantón, González y Galán, 2012). En el caso de esta enzima, se ha demostrado la asociación de su gen con plásmidos de incompatibilidad del grupo FII; plásmidos con número bajo de copias, presentes principalmente en Enterobacterias, y también denominados “plásmidos de resistencia epidémica” dada a su preferencia a adquirir genes de resistencia y de transferencia entre bacterias. Dentro de estos plásmidos están presentes diferentes replicones, los que facilitan la rápida evolución y diversificación del plásmido (Cantón, González y Galán, 2012). En la actualidad CTX-M 15 es la BLEE identificada a nivel mundial en Enterobacterias, siendo asociada a infecciones que se originan en la comunidad en varios países; su diseminación se cree podría deberse a la asociación con clones internacionales que codifican estas BLEE: ST131, ST405, y ST617, que tienen una amplia capacidad de diseminación debido a elementos genéticos móviles (Blanco, Maya, Correa, Perenguez, Muñoz, et al., 2015).

Las Enterobacterias productoras de CTX-M son típicamente resistentes a antimicrobianos como sulfonamidas, ciprofloxacina, gentamicina, trimetoprim-sulfametoxazol (Auer, Wojna y Hell, 2010), cloranfenicol y tetraciclina; esto debido a los mega plásmidos que codifican (Casellas, 2011). Además, se ha encontrado que los clones de alto riesgo que expresan las CTX-M favorecen a la adquisición de mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos, trimetoprim- sulfametoxazol y fosfomicina; por lo que se debe evitar el uso de todos estos antibióticos.

En cuanto al resultado obtenido del gen blaOXA, ausencia del gen en todas las muestras, se concuerda con la literatura, al ser este tipo de betalactamasa predominante en *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria de la que fue aislada por primera vez, siendo detectado en otras Gram negativas como *E. coli* entre el 1 al 10% de los aislados de OXA-1. Derivados de esta enzima han sido descubiertos en Francia, OXA-28, OXA-18 y OXA13; la evolución de esta familia

de BLEEs es a partir de enzimas parentales con espectros estrechos, en relación con BLEEs de tipo TEM y SHV. No obstante, existe pocos datos epidemiológicos sobre la extensión a nivel geográfico de este tipo de BLEE (Shaikh, Fatima, Shakil, Rizvi y Kamal, 2015).

La alta distribución a nivel mundial de la enzima CTX-M ha dado lugar a la coexistencia de dos o más BLEEs en la misma cepa. En el Gráfico 4., combinación de genes BLEE presentes en cepas de *E. coli*, se puede observar la prevalencia del gen blaCTX-M solo (63%), seguido de la combinación de los genes blaCTX-M-blaTEM (23%), y finalmente la combinación de tres de los cuatro genes estudiados, blaCTX-M-blaTEM-blaSHV (1%). En cuanto a las cepas de *K. pneumoniae* se encontró que el 100% de las muestras analizadas presentaron la combinación de los genes blaCTX-M-blaTEM-blaSHV.

La multirresistencia presentada en *E. coli* se pudo haber dado debido a que muchos de los genes de BLEE se encuentran en grandes plásmidos con bajo número de copias, plásmidos multirresistentes frecuentes en esta Enterobacteria (Livermore, 1995). Principalmente del clon ST131 relacionado con frecuencia como causa de infecciones adquiridas en la comunidad; algunas cepas de este clon también pueden ser portadoras de otras variantes y de otras familias de BLEE como TEM y SHV (Leal, Cortés, Arias, Ovalle, Saavedra, et al., 2013).

En cuanto a los resultados de multirresistencia obtenidos en las cepas de *K. pneumoniae*, esto se puede relacionar con el factor de que este microorganismo es capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo sobre la piel y fomites lo que facilita la infección cruzada por medio de la propagación clonal, a diferencia de otros bacilos Gram negativos y adquiere con facilidad plásmidos conjugativos (Hernández, Pascual, Cantón, Martínez y GEIH, 2003)

No obstante, la diseminación de BLEEs a otros géneros de Enterobacterias ha ido aumentando significativamente (Livermore, 1995).

#### **7.4. Análisis nacional y regional de BLEEs.**

Al comparar los datos obtenidos en la presente investigación con otros estudios realizados en el Ecuador, en el año 2016, Calva y colaboradores, en su estudio sobre la detección y caracterización de BLEE en aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas en el sur del país, en la provincia de Loja (uno de los pocos estudios analizados en el Ecuador debido a la falta de informes detallados que caractericen la propagación de estas enzimas) se encontró similitud en la alta persistencia del gen CTX-M (98,6%), seguida del gen TEM (71,23%), y SHV (28,76%). Sin embargo, la diferencia entre los porcentajes presentados en este estudio con el nuestro se pudo haber dado debido a que en el estudio de Calva y colaboradores, se analizaron aislados clínicos del género *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*; razón por la cual además se pudo haber encontrado la presencia del gen OXA en este estudio (Calva, Toledo, Ochoa, Arévalo y Ausili, 2016).

De igual manera, al analizar nuestros resultados con datos de Latinoamérica, se pudo presenciar una prevalencia del gen CTX-M en toda esta región, principalmente de la variante CTX-M 15 al norte y de la variante CTX-M 2 en el sur. No obstante, al analizar los datos por país encontramos diferencias significativas en varios países como en Venezuela, país en el que predomina el gen SHV (54%) en *E. coli* y TEM (64%) en *K. pneumoniae*; en México, en donde hay un mayor porcentaje del gen CTX-M (85%) en *E. coli* y SHV (86%) en *K. pneumoniae*; y en Brasil, en donde hay mayor prevalencia del gen TEM tanto *E. coli* como en *K. pneumoniae*, con el 67 y 95% respectivamente. Los resultados altamente variados entre estas investigaciones se pudieron haber presentado primero por el número de estudios analizados de acuerdo a las investigaciones realizadas en cada país; segundo, debido al tipo de muestra que se analizó, la cual varió en cada estudio (sangre, piel, orina, entre otras muestras más), analizando además no únicamente bacterias multirresistentes; y finalmente, debido al número de muestras analizadas en cada estudio de cada país (Guzmán, Labarca, Villegas, Gotuzzo, 2014).

### **7.5. Análisis de resistencia bacteriana de acuerdo a la interpretación de los antibiogramas**

En cuanto a los resultados analizados en las pruebas de susceptibilidad en cepas de *E. coli*, como se puede observar en el Gráfico 5., se obtiene un porcentaje de resistencia mayor del 90% a dos principales antibióticos betalactámicos administrados por vía oral: la ampicilina y la cefuroxima, seguido de la cefalotina (vía intravenosa (Facmed, 2007a)), el ácido nalidíxico y trimetoprima + sulfametoxazol (administrado por vía oral, intravenosa o intramuscular (Facmed, 2007b)), por lo que se debería descartar el uso de estos antimicrobianos. Mientras que en *K. pneumoniae*, Gráfico 6., se puede descartar el uso a 9 antibióticos: ampicilina + sulbactam, gentamicina, trimetoprima + sulfametoxazol, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, nitrofurantoína, ampicilina, cefalotina y cefuroxima.

De acuerdo con los resultados presentados en el Gráfico 7., debido a su alta sensibilidad, los antibióticos que podrían ser utilizados como una posible opción para el tratamiento de ITU en *E. coli* son: imipenem, antibiótico aplicados por vía intravenosa; nitrofurantoína y fosfomicina, administrados por vía oral (Suárez y Gudiol, 2008).

La nitrofurantoína es un profármaco, activado por las bacterias por medio de flavoproteínas (nitrofurano-reductasa) que reducen la molécula obteniendo sustancias intermedias las cuales alteran a los ribosomas y a otras macromoléculas bacterianas. Este fármaco interfiere en una variedad de rutas enzimáticas que se encuentran vinculadas a la respiración celular, el metabolismo glucídico y la síntesis de proteínas, ARN, ADN y la pared bacteriana; posible razón por la que se dificulta el desarrollo de resistencias y motivo por el cual su uso en la actualidad ha sido como profiláctico (Horcajada, Sorlí y Montero, 2013).

En cuanto a la fosfomicina, esta presenta una elevada sensibilidad de *E. coli* productor de BLEE tanto en pacientes a nivel hospitalario como en la comunidad y tiene fácil aplicación (oral); lo que evita que el paciente ingrese a centros de atención médica para la

administración del mismo. El mecanismo de acción de este antimicrobiano es inhibir la UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa (MurA), enzima que cataliza el paso inicial en la síntesis de la pared celular bacteriana. Conjuntamente, debido a que la resistencia a fosfomicina en Enterobacterias no está mediada principalmente por plásmidos, sino codificados cromosómicamente, este carece de resistencias múltiples y bajo nivel de resistencia cruzada (Falagas, Kastoris, Kapaskelis y Karageorgopoulos, 2010). Sin embargo, este antibiótico debe ser administrado con su coactivador, sal de trometamol, el que le confiere una mayor estabilidad al pH gástrico, incrementando su absorción por vía oral (50-60%) (Horcajada, Sorlí y Montero, 2013).

Finalmente, al ser uniformemente activas y debido a que en diversos estudios se asocian con mayor tasa de curación y menor tasa de mortalidad, las carbapenemasas (imipenem) son los fármacos de elección en infecciones urinarias por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE (Horcajada, Sorlí y Montero, 2013). El imipenem fue el primer carbapenem disponible para el tratamiento de infecciones microbianas complejas al tener una alta afinidad por las PBP y estabilidad frente a betalactamasas (Papp-Wallace, Endimiani, Taracila y Bonomo, 2011); y se administra por vía intravenosa (Suárez y Gudiol, 2008); siendo debido, a su administración parenteral principalmente que el uso de este antibiótico se limita ya que el paciente debe recurrir a centros de salud para su aplicación, lo que aumentará la estancia hospitalaria y los costos de salud.

En cuanto a los datos de sensibilidad obtenidos en *K. pneumoniae*, Gráfico 8., se puede determinar como posible tratamiento adecuado, además de la fosfomicina e imipenem.

Además, se recomienda en infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE, la administración de colistina y polimixinas (Casellas, 2011).

## 8. CONCLUSIONES

El análisis de la susceptibilidad a antibióticos betalactámicos presentó alta resistencia en *E. coli* y *K. pneumoniae* a: ampicilina (100%), cefalotina y cefuroxima (>98%), ciprofloxacino (>90%) y a ácido nalidíxico, trimetoprim + sulfametoxazol, ampicilina + sulbactam y gentamicina; con un porcentaje mayor al 55% de resistencia. En cuanto a la sensibilidad se registró que imipenem, nitrofurantoína y fosfomicina, presentaron una sensibilidad mayor al 80% en *E. coli* y cefepima, fosfomicina e imipenem sensibilidad del 100% en *K. pneumoniae*; mostrando una reducción de las alternativas de tratamiento para ITUs, siendo la más aconsejada a nivel terapéutico el imipenem en ambos microorganismos.

La prevalencia de los genes de BLEE en muestras de pacientes ambulatorios con infecciones de vías urinarias presentados por *E. coli* fue: blaCTX-M (96,67%), blaSHV (2,22%), blaTEM (28,89%) y blaOXA (0%); y en *K. pneumoniae*, las dos muestras analizadas mostraron los genes blaCTX-M-blaSHV-blaTEM. Estos resultados tienen relación con los porcentajes encontrados y reportados en otros estudios tanto a nivel nacional como regional, en los que predomina la presencia del gen blaCTX-M (Cantón, González y Galán, 2012).

La alta presencia del gen CTX-M en la comunidad se puede dar principalmente debido a su capacidad de diseminación. En el caso de CTX-M, esta enzima se asocia con clones internacionales que poseen una amplia capacidad de diseminación por medio de elementos genéticos móviles, los que están relacionados con los genes que codifican a este tipo de BLEE; principalmente por el clon ST131, el que se ha relacionado frecuentemente como causante de infecciones adquiridas en la comunidad. Además de los plásmidos conjugativos (Blanco, Maya, Correa, Perenguez, Muñoz, et al., 2015).

De igual manera, en las cepas de *E. coli* se encontró la presencia de dos o más genes de BLEE en una misma muestra, blaTEM-blaCTX-M: 23%, blaTEM-blaSHV-blaCTX-M: 1%,

y blaTEM-blaSHV: 1%. En el caso de las 2 cepas analizadas de *K. pneumoniae*, el 100% portó los genes blaTEM-blaSHV-blaCTX-M. Datos que pudieron haber dado debido a la presencia de plásmidos conjugativos (Leal, Cortés, Arias, Ovalle, Saavedra, et al., 2013).

Al comparar las pruebas moleculares con las pruebas bioquímicas, se puede determinar que estas últimas no son 100% certeras. Tal como se pudo observar en la amplificación del gen purA para la identificación de *E. coli* en donde amplificó el 91,8% de las 98 muestras analizadas.

El porcentaje de muestras BLEE positivas, de todos los urocultivos con ITUs analizados durante todo el año de muestreo (mayo 2014 a mayo 2015) fue del 17,65%; lo que indica una tasa elevada de BLEE circulando en los pacientes ambulatorios que asisten a estas casas de salud.

## 9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar análisis de susceptibilidad a antibióticos y estudios a nivel molecular del total de las muestras BLEE positivas aisladas durante el año de muestreo (mayo 2014- mayo 2015), 140 muestras. Siendo posible de esta manera obtener un resultado real de la presencia de BLEE en el grupo de estudio, al igual de la resistencia presente a los antibióticos betalactámicos, y su relación; esto debido a que con el universo analizado en el presente estudio no se puede determinar la prevalencia de estos genes productores de BLEE.

Por otro lado, se recomienda identificar a nivel molecular las diferentes variantes de los genes TEM, SHV, OXA y CTX-M. En el caso de infecciones de origen en la comunidad, se ha presentado en varios países la presencia de CTX-M-15, por lo que la detección de esta como otras variantes podrían ayudar a comprender su diseminación en la comunidad.

Se recomienda determinar también lactamasas tipo AmpC, las que además de ser capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, no son inhibidas por el ácido clavulánico (inhibidor de lactamasas).

Conjuntamente, el análisis de la combinación amoxicilina + ácido clavulánico y el ertapenem (antibióticos no analizados en el antibiograma de este estudio) como tratamiento empírico de las ITUs se debería realizar debido al aumento en el uso de estos antimicrobianos; principalmente dada a la escasa información que se tiene sobre su eficacia frente al aumento de resistencia bacteriana. Al igual que las cefalosporinas de quinta generación, las cuales tienen actividad bactericida contra patógenos Gram negativos.

La metodología utilizada para la detección de los diferentes genes de BLEE analizados fue la técnica de PCR múltiple, la que se realizó a un volumen final de 20µl obteniendo resultados confiables. Sin embargo, se recomendaría optimizar las condiciones de PCR al realizar diversas pruebas con variación en el volumen final, desde 20 a 10µl, con el fin de generar ahorro de dinero y recursos.

Se recomienda comprobar la eficiencia y eficacia de los primers de OXA por medio del uso de controles positivos, como *Pseudomona aeruginosa*.

De igual manera la implementación de genes HouseKeeping para *K. pneumoniae* nos permitiría la verificación de la identificación bioquímica de este microorganismo; especialmente, al ser reducido el porcentaje de las cepas de este patógeno aisladas durante todo el año de muestreo.

Se recomienda identificar las cepas que no amplificaron para el gen *purA* y así poder determinar que género es el que está presentando, además de *E. coli* y *K. pneumoniae*, multirresistencias.

Y finalmente, para futuros análisis epidemiológicos de Betalactamasas, se recomienda incluir un análisis de género y edad, lo que podría ayudar a identificar la población con mayor riesgo a portar este tipo de resistencia y conjuntamente identificar posibles factores de riesgo.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreu, A. (2005). Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (23): 15-21.
- Andreu, A., Alós, J., Gobernado, M., Marco, F., De la Rosa, M., et al. (2005). Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (23): 4-9.
- Auer, S., Wojna, A. y Hell, M. (2010). Oral Treatment options for ambulatory patients with urinary tract infections caused by extended-spectrum-B-Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (54): 4006-408.
- Bagó. (s.f.). Furadantina MC. Nitrofurantoína 100mg. Recuperado el 02 de enero de 2017 de <http://www.bago.com.ar/vademecum/wpcontent/uploads/2016/05/FURADANTINA.pdf>.
- Barriga, G., Mercado, N. y Arumir, C. (2008). Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de 1200 microorganismos Gram negativos causales de infecciones de vías urinarias. *Enfermedades infecciosas y microbiología* (28): 90-98.
- Bedolla, E. y López, B. (2008). Infección de vías urinarias. Detección por métodos rápidos de laboratorio. *Revista Mexicana de Patología Clínica* (55): 201-206.
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D. y Piddock, L. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews* (13): 42-51.
- Blanco, V., Maya, J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J., et al. (2015). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>.

- Britanialab. (s.f. a). Mac Conkey Agar. Recuperado el 12 de abril de 2017 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/maconkeyagar.htm>.
- Britanialab. (s.f. b). SIM medio. Recuperado el 24 de abril de 2017 de <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simedio.htm>.
- Britanialab. (s.f. c). Simmons Citrato Agar. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simmonscitagar.htm>.
- Britanialab. (s.f. d). TSI Agar. Recuperado el 24 de abril de 2017 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tsiagar.htm>.
- Britanialab. (s.f. e). Ureasa Medio para la prueba. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/ureasamedprue.htm>.
- Bustos, Á. (2012). Cefalosporinas parenterales. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría* (25): 109-113.
- Calva, D., Toledo Z., Ochoa, S., Arévalo, A. y Ausili, A. (2016). Detection and molecular characterization of B-lactamase genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria in Southern Ecuador. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* (20): 627-630.
- Cantón, R., González, J. y Galán, J. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in microbiology* (3):1-19.
- Caro, M., Hernando, S., Carrero, P. y García, S. (2007). Estudio de multirresistencia antibiótica de *Escherichia coli* en urocultivos. *Med Clin Barc* (129): 409- 411.
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panamericana Salud Pública* (6): 519-528.
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2012). *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings. *Healthcare-associated Infections*. Recuperado el 02 de febrero de 2017 de <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>.

- Chiriboga, M. y Araujo, C. (2012). Nuevo método alternativo para la detección de betalactamasas de Espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* Universidad Central del Ecuador. Quito.
- Echeverri-Toro, L., Rueda, Z., Maya, W., Agudelo, Y. y Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista chilena de infectología* (2): 175-182.
- Esparza, G., Motoa, G., Robledo, C, y Villegas, M. (2015). Aspectos microbiológicos en el diagnóstico de infecciones del tracto urinario. *Infectio- Asociación Colombiana de Infectología* (19): 150-160.
- Espinal, P., Mantilla, J., Saavedra, C., Leal, A., Alpuche, C., et al. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica* (24): 252-261.
- Facultad de Medicina UNAM [facmed]. (2007a). Cefalotina. Recuperado el 17 de abril de 2017 de [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Cefalotina.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Cefalotina.htm).
- Facultad de Medicina UNAM [facmed]. (2007b). Trimetoprima/sulfametoxazol. Recuperado el 17 de abril de 2017 de [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Trimetoprima-sulfametoxazol%20Tabs.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Trimetoprima-sulfametoxazol%20Tabs.htm).
- Falagas, M., Kastoris, A., Kapaskelis, A. y Karageorgopoulos, D. (2010). Fosfomicin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases* (10): 43-50.
- Fang, H., Ataker, F., Hedin, G. y Dornbusch, K. (2008). Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum B-Lactamases among *Escherichia coli* Isolates Collected in a

- Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology* (46): 707-712.
- FAO. (s.f.). El uso racional de los antimicrobianos. *Depósito de documentos de la FAO*. Recuperado el 28 de marzo de 2017 de <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s0g.htm>.
- Galas, M. (2014). Infecciones hospitalarias y Resistencia antimicrobiana. Cómo detectar mecanismos de resistencia por KPC. Ministerio de la Salud, República Argentina.
- Garau, M., Latorre, A. y Alonso-Sanz, M. (2001). Fosfomicina: un antibiótico infravalorado en infecciones urinarias por *Escherichia coli*. *Enfermedades infecciosas microbiología clínica* (19): 462-466.
- García, A., et al. (2014). Betalactamasas de espectro extendido en las infecciones del tracto urinario causadas por enterobacterias: aproximación a su conocimiento y pautas de actuación. *Actas Urológicas Españolas*. Recuperado el 29 de abril de 2017 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2014.05.004>
- Gómez, A. (2011). Presencia de carbapenemasas en Enterobacterias de muestras recolectadas de nueve hospitales de la ciudad de Quito, de mayor del 2009 a noviembre del 2010. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Gomila, M. (2008). Capítulo VII. La anamnesis. *Psicodiagnóstico clínico infantil*. (pp. 127-129). Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Guevara, A., Machado, S. y Manrique, E. (2011). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: epidemiología, resistencia a los antimicrobianos y opciones terapéuticas. *Kasmera* (2): 87-97.
- Guevara, A., Machado, S. y Manrique, E. (2011). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: epidemiología, resistencia a los antimicrobianos y opciones terapéuticas. *Kasmera* (39): 87-97.

- Guzmán, M., Labarca, J., Villegas, M., Gotuzzo, E. (2014). Extended spectrum -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* (18): 421-433.
- Hernández, J., Pascual, Á., Cantón, R., Martínez, L. y Grupo de estudio de infección hospitalaria [GEIH]. (2003). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (21): 77-82.
- Horcajada, J., Sorlí, L. y Montero, M. (2013). Tratamiento de las infecciones no complicadas del tracto urinario inferior. Tratamiento de la pielonefritis aguda. *Infeccion del tracto urinario*. (pp. 57-73). Ed. Pigrau, C. Madrid: Salvat.
- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública [INSPI]. (2015). Datos vigilancia. *Red Nacional de resistencias a antibióticos Ecuador*. Recuperado el 12 de abril de 2017 de <https://sites.google.com/site/whonetecuador/home/datos-vigilancia>
- Leal, A., Cortés, J., Arias, G., Ovalle, M., Saavedra, S., et al. (2013). Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Enterobacteriaceae causantes de infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (31): 298-303.
- Lee, J. y Neild, G. (2007). Urinary tract infection. *Medicine* (35): 423- 428.
- Lezameta, L., Gonzáles, E. y Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de Beta- lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud pública* (3): 345-351.
- Livermore, D. (1995). -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* (8): 557- 584.
- Martínez, Y. y Aguilar, M. (2015). Identificación de infección del tracto urinario según el examen elemental y microscópico de orina en la población de cuarenta y uno a

- sesenta y cuatro años de Quilloac- Cañar 2014. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador.
- McGowan, J. y Tenover, F. (2004). Confronting bacterial resistance in healthcare settings: a crucial role for microbiologists. *Nature reviews* (2): 252-258.
- Medina, M., Arcos, A., Bello, J. y Weber, F. (2012). Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. coli* y *E. coli* ESBL a quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y nitrofurantoin. *Medicina interna de México* (28): 434-439.
- Ministerio de Salud Pública. (2013). *Cuadro nacional de medicamentos básicos*. 9na revisión. Recuperado el 23 de diciembre de 2016 de <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21672es/s21672es.pdf>.
- Mireles, A., Walker, J. y Hultgren, J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology* (13): 1-14.
- Molina, J., Cordero, E., Palomino, J. y Pachón, J. (2009). Aminoglucósidos y polimixinas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (27): 178-188.
- Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A., Pérez, T., et al. (2006). Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (24): 483-489.
- Navarro, F. y Miró, E. (2007). Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (2007): 11-17.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016). *Centro de prensa. E. coli*. Recuperado el 01 de febrero de 2017 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>.
- Ortega, M. y Soriano, A. (2000). Efectos adversos de las fluoroquinolonas. *Medicina integral* (36): 396-399.

- Pacheco, M. y León, C. (2011). Epidemiología de las infecciones por microorganismos productores de BLEE en el Hospital Vozandes Quito entre los años 2005-2009. *Revista Médica Vozandes* (22): 15-21.
- Palomino, J. y Pachón, J. (2003). Aminoglucósidos. *Enfermedades infecciosas microbiología clínica* (21): 2015-115.
- Papp-Wallace, K., Endimiani, A., Taracila, M. y Bonomo, R. (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (55): 4943-4960.
- Pinheiro, P. (2016). Bactrim- sulfametoxazol y trimetopima- para qué sirve, dosis y efectos. *Antibióticos/antimicóticos/antivirales*. Recuperado el 27 de diciembre de 2016 de <http://www.mdsau.de.com/es/2016/10/bactrim-sulfametoxazol-trimetoprima.html>.
- Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S. y Nordmann, P. (2011). Genetic Features of blaNDM-1-Positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (55): 5403-5407.
- Raghunathan, A., Samuel, L. y Tibbetts, R. (2011). Evaluation of a Real-Time PCR Assay for the Detection. *American Society for Clinical Pathology* (135): 566-571.
- ReAct. (2011). Recuperar la salud integral y la armonía de los ecosistemas, para contener la resistencia bacteriana a los antibióticos. Cuenca: React Latinoamérica
- Reyes, A., Gómez, A. y Rodríguez, J. (2013). Validez del parcial de orina y el gram en el diagnóstico de infección del tracto urinario en el embarazo. Hospital Simón Bolívar, Bogotá, Colombia, 2009-2010. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* (64): 53-59.
- Reyes, J., Villacís, Je., Vásquez, R., Villavicencio, F., Ushiña, L., et al. (2014). Resistencia bacteriana en el Ecuador 2014. Recuperado el 28 de noviembre de 2016 de <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2016/08/API-P0856.pdf>.

- Riera, E., Chamorro, G., Zárate, M., Falcón, M. y Franco, R. (2008). Efecto del espesor y del pH del agar Mueller-Hinton en el antibiograma. *Revista Panamericana de infectología* (10): 64-69.
- Rodríguez, J. y Navarro, M. (2007). Impacto de las BLEE en los tratamientos empíricos y las políticas antibióticas. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica* (25): 54-49.
- Romero, S., Gómez, M., Rodríguez, M. y Pedral, M. (2011). Presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de casos de infección nosocomial. *Ciencia* (18): 164-170.
- Sanz, M. y Abad, M. (2003). Fenotipos de resistencia en aislamientos urinarios de *Escherichia coli* en la comunidad: implicaciones terapéuticas. *Medicina Clínica Barcelona* (120): 361-364.
- Satán, C., Tamayo, R., Ushiña, L., Rivera, R., Villavicencio, F., et al. (2016). Carbapenemasa en bacilos Gram negativos, situación actual en el Ecuador. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 de <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2016/07/POSTER-LABORATORIO-7-JR.pdf>.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. y Kamal, M. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* (22): 90–101. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
- Shanmugam, P., Meenakshisundaram, J. y Jayaraman, P. (2013). blaKPC gene Detection in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* in Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* (7(12)): 2736-2738.
- Solanki, R., Vanjari, L., Ede, N., Gungi, A., Soory, y Vemu, L. (2013). Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of blaNDM-1 and blaKPC genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates. *Journal of Medical Microbiology* (62): 1540-1544.

- Suárez, C. y Gudiol, F. (2008). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (27): 116-129.
- Sun, Y., Fukamachi, T. y Kobayashi, H. (2011). ATP Requirement for Acidic Resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* (193): 3072-3077.
- ThermoFisher. (2017). PCR basis. *PCR Reagents and Enzymes*. Recuperado el 01 de febrero de 2017 de <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>.
- Thomson, K. y Smith, E. (2001). Cefepime, Piperacillin-Tazobactam, and the Inoculum Effect in Tests with Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (45): 3548-3554.
- Thomson, R. (2007). Specimen Collection, transport, and processing: Bacteriology. En Murray P., Baron, E., Joergensen, J., Landry, M. y Pfaller, M. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Tripathi. K. (2008). Quinolonas. *Farmacología en odontología: fundamentos*. (pp. 397-398). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol.Microbiol.* 60(5), 1136-1151.

## 11. ANEXO A: SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

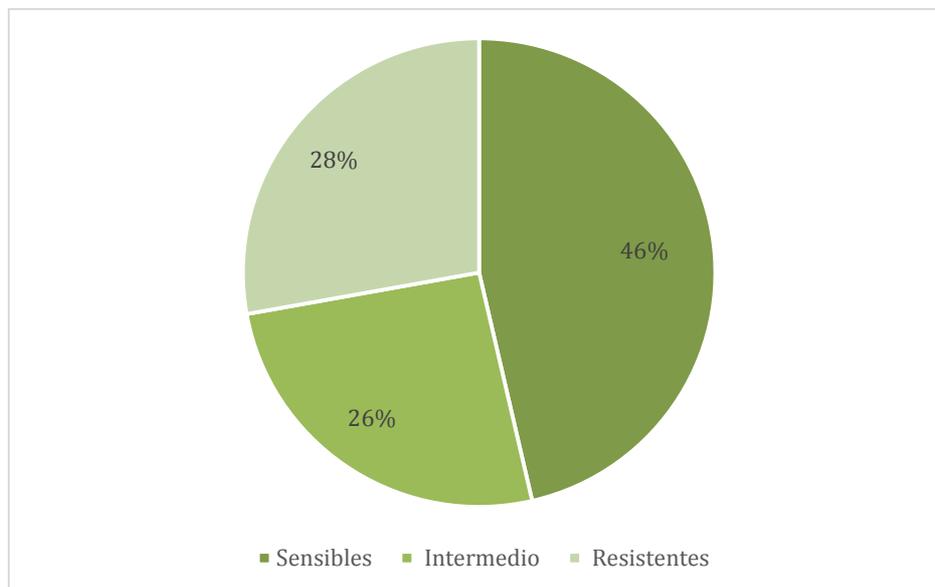


Gráfico 9. Gráfico de susceptibilidad al disco de cefepima

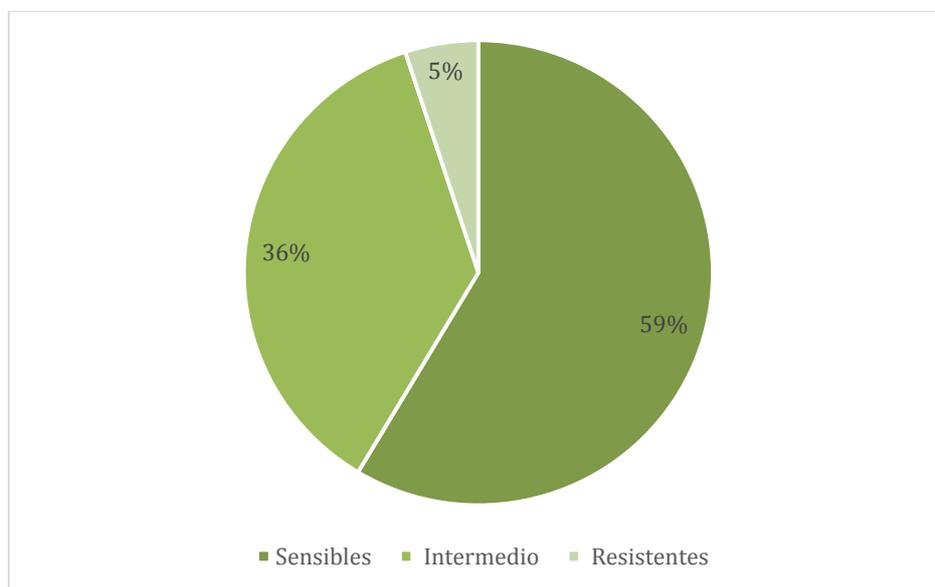


Gráfico 10. Gráfico de susceptibilidad al disco de piperacilina + tazobactam

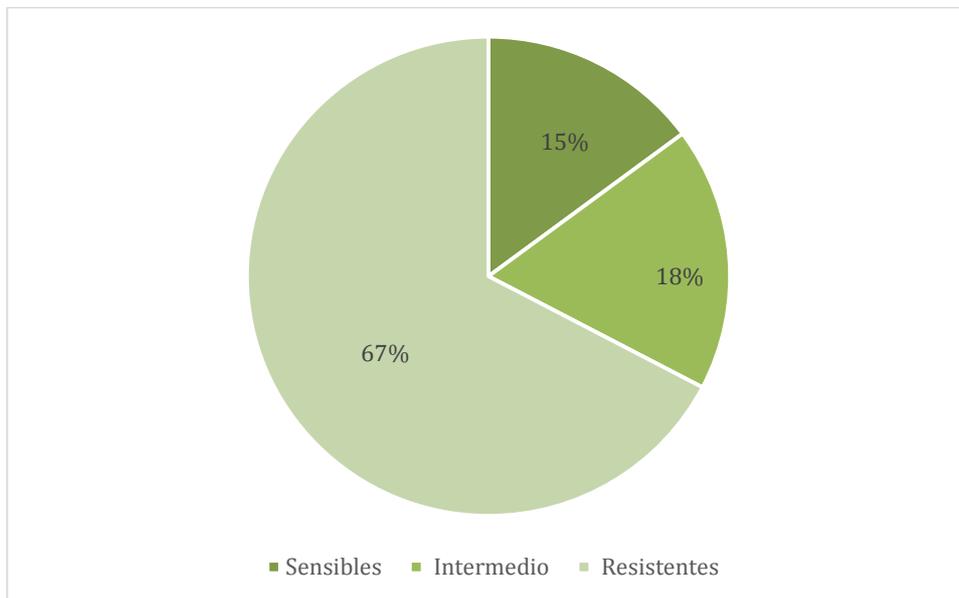


Gráfico 11. Gráfico de susceptibilidad al disco de ampicilina + sulbactam

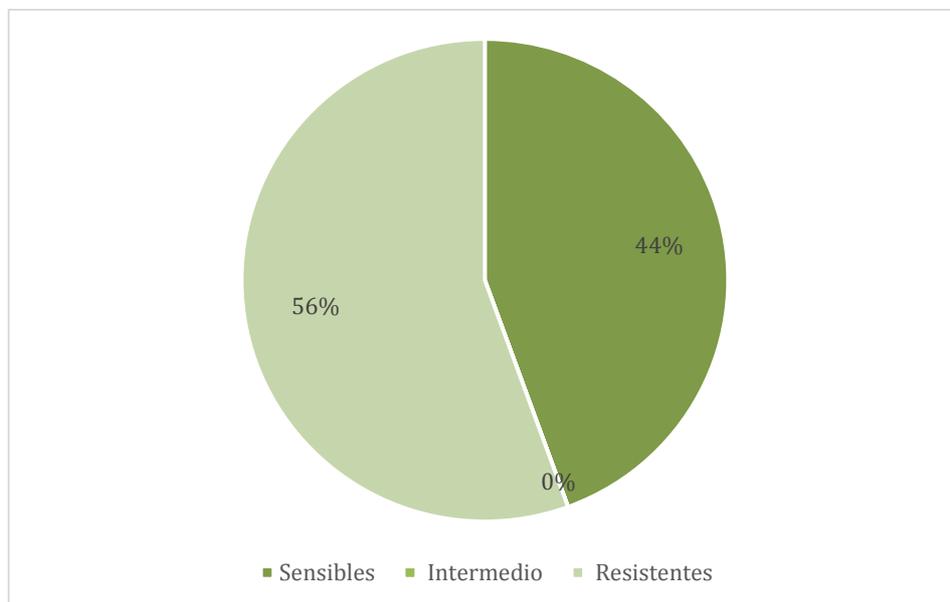


Gráfico 12. Gráfico de susceptibilidad al disco de gentamicina

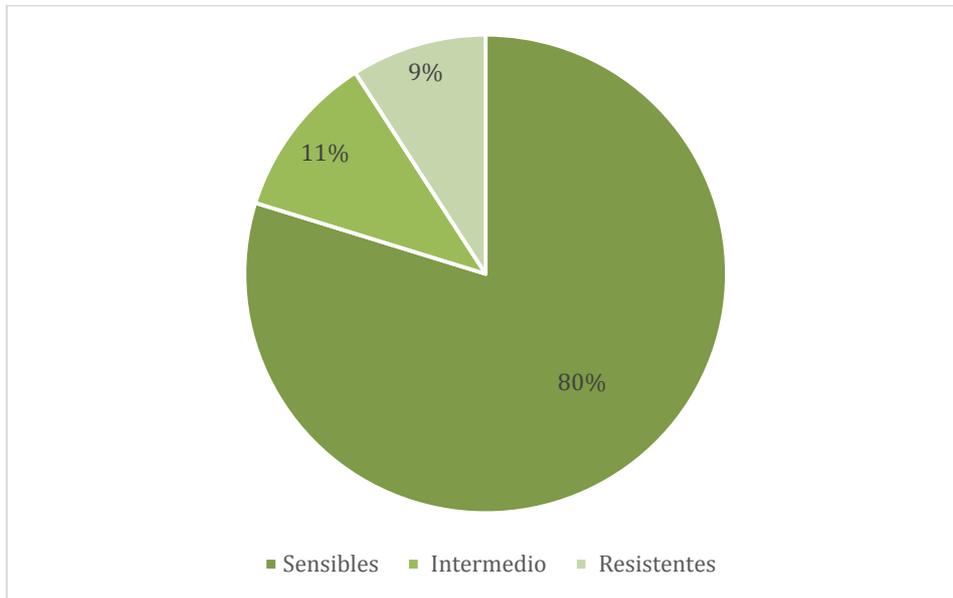


Gráfico 13. Gráfico de susceptibilidad al disco de netilmicina

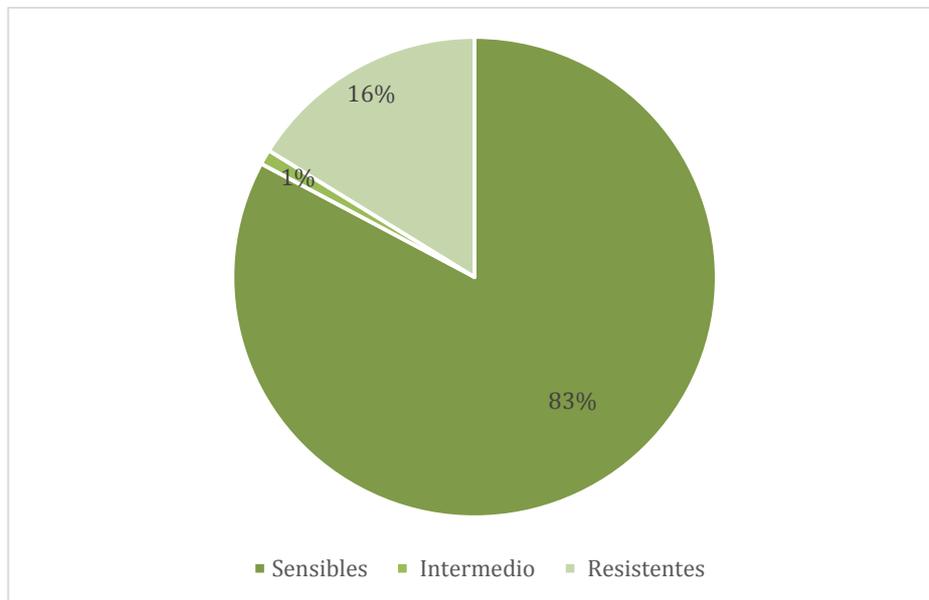


Gráfico 14. Gráfico de susceptibilidad al disco de fosfomicina

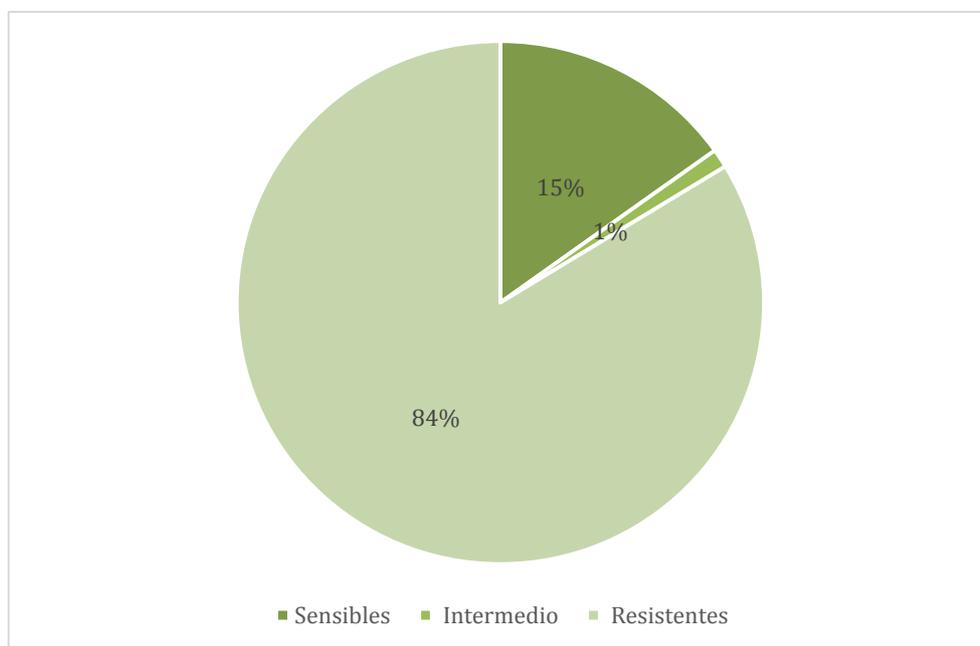


Gráfico 15. Gráfico de susceptibilidad al disco de trimetoprima + sulfametoxazol

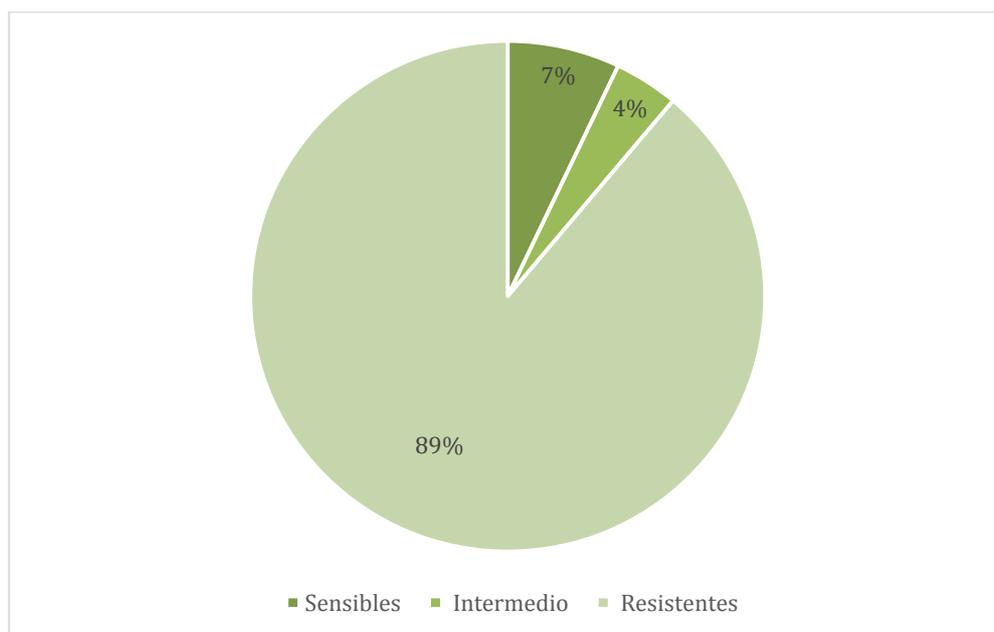


Gráfico 16. Gráfico de susceptibilidad al disco de ácido nalidíxico

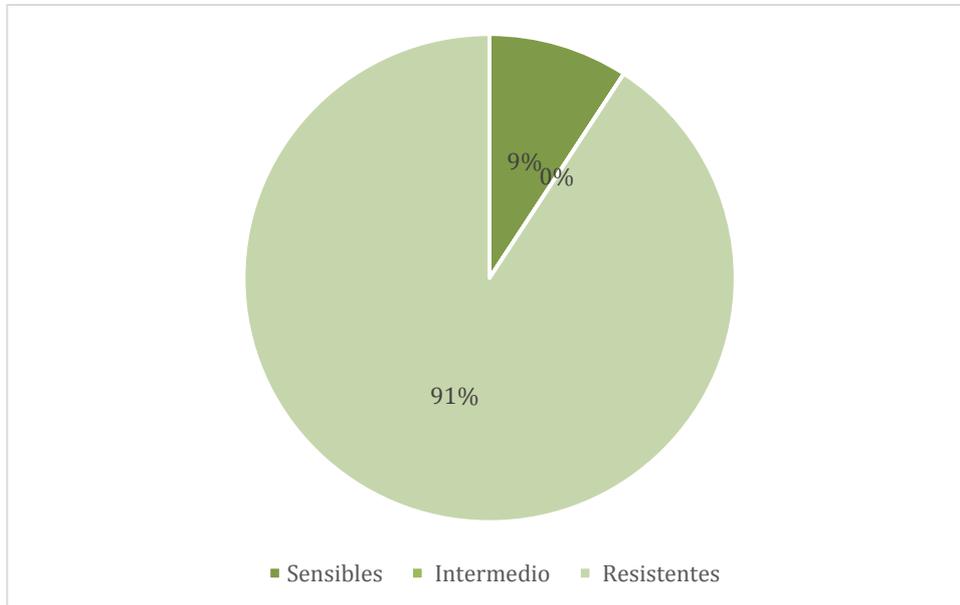


Gráfico 17. Gráfico de susceptibilidad al disco de ciprofloxacino

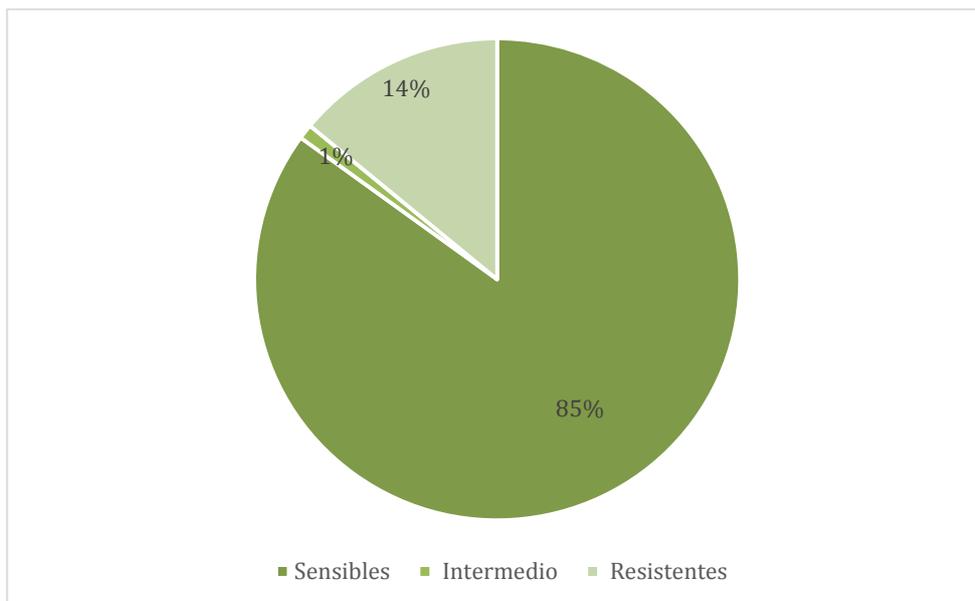


Gráfico 18. Gráfico de susceptibilidad al disco de nitrofurantoína

## 12. ANEXO B: AMPLIFICACIÓN GEN PUR-A

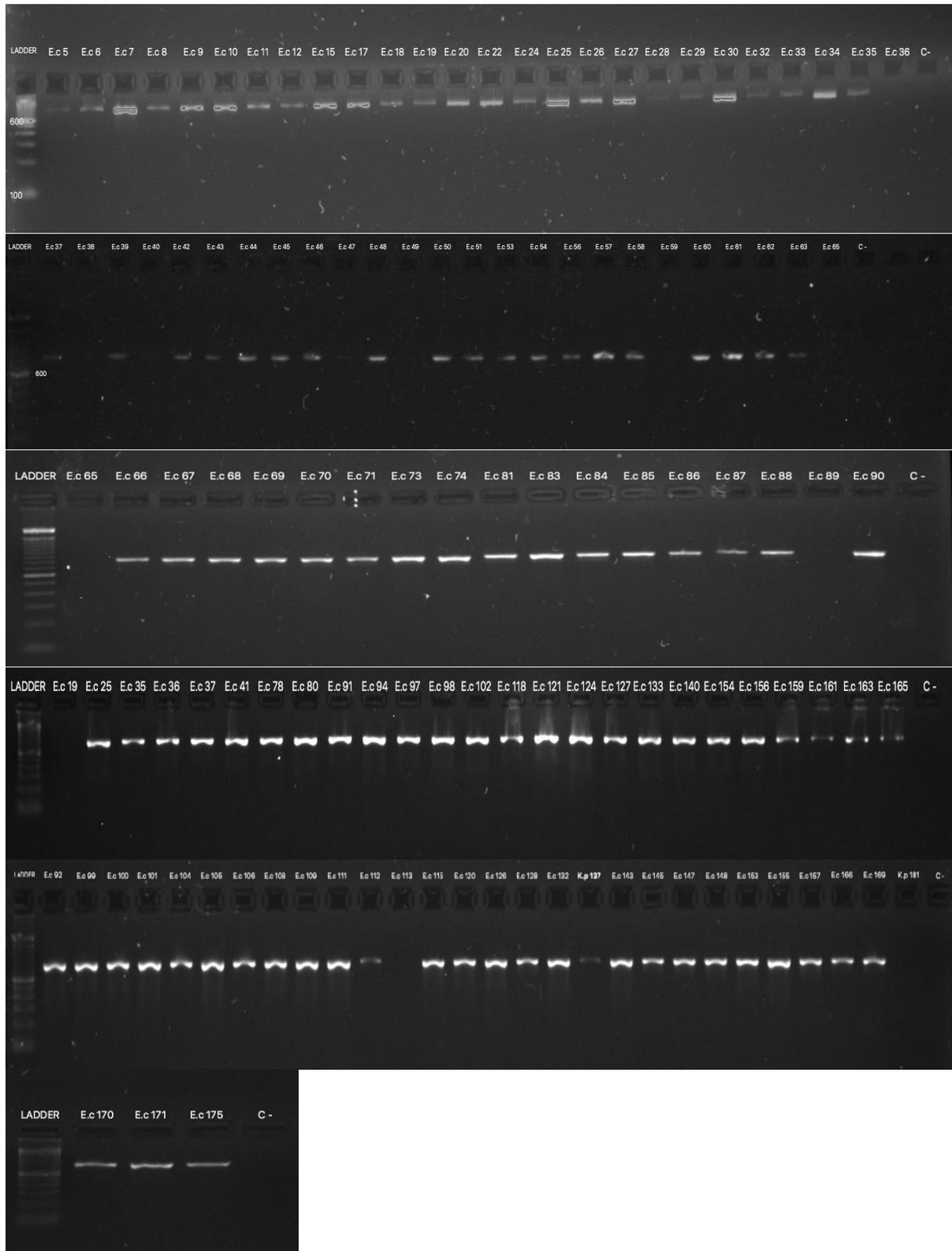


Imagen 1. Imagen del gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen *purA* de las 140 muestras analizadas de *E. coli* y *K. pneumoniae* BLEE positivo

### 13. ANEXO C: AMPLIFICACIÓN GENES BLEE- PCR MÚLTIPLEX.

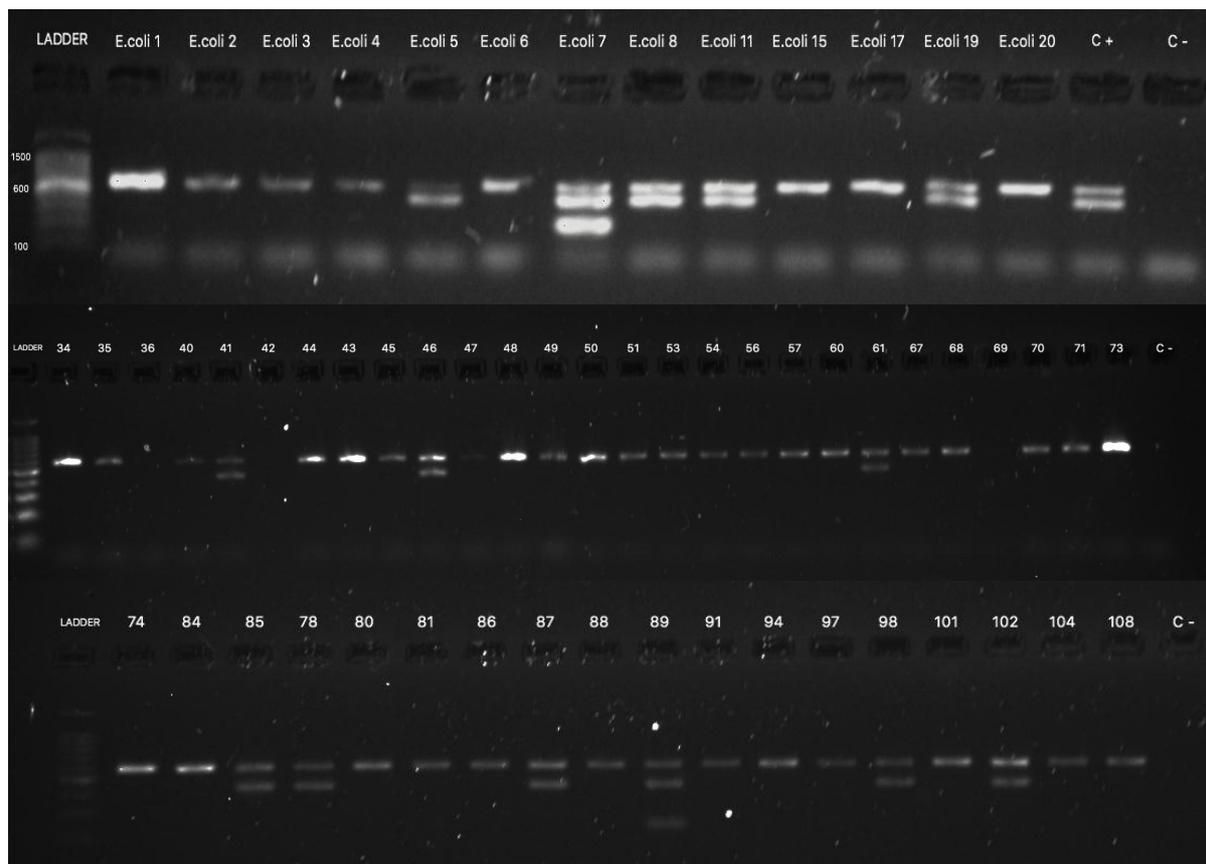


Imagen 2. Imagen del gel de agarosa al 1,5% de la múltiplex PCR para la amplificación de los genes: TEM, SHV, CTX-M y OXA. Muestra *E. coli* 1 a *E. coli* 108 BLEE positivo.

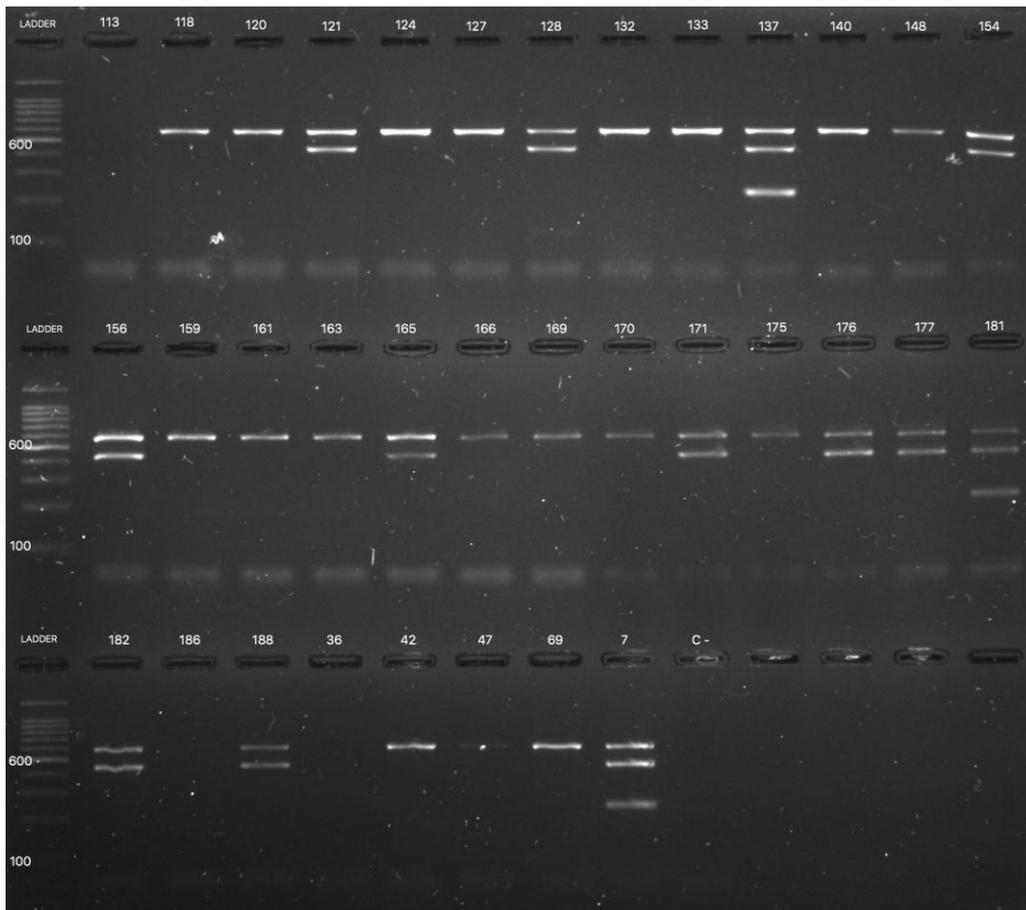


Imagen 3. Imagen del gel de agarosa al 1,5% de la múltiplex PCR para la amplificación de los genes: TEM, SHV, CTX-M y OXA. Muestra *E. coli* 113 a *E. coli* 188 BLEE positivo.