

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA**

**VARIABILIDAD GENOTÍPICA EN ENTEROBACTERIAS  
PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO (BLEE) EN AISLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES  
HOSPITALIZADOS DE NUEVE CENTROS HOSPITALARIOS DE  
TERCER NIVEL DE LA CIUDAD DE QUITO MEDIANTE MÉTODO  
DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DURANTE  
EL PERIODO MAYO 2009 A DICIEMBRE 2009**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO  
CIRUJANO**

**DIANA CAROLINA MUÑOZ LÓPEZ**

**DIRECTORA**

**DRA. JEANNETE ZURITA**

**QUITO, 13 OCTUBRE DEL 2011**

## AGRADECIMIENTOS

Infinito agradecimiento y admiración a la Dra. Jeannete Zurita Salinas y a la Dra. Iliana Alcocer Negrete por la oportunidad de colaborar en su proyecto de investigación, por la guía y preocupación en el desarrollo de este trabajo de tesis, y sobretodo por enseñarme el valor de la investigación científica.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en especial a Pedro Barba, David Ortega y Fernanda Yauri, gracias amigos.

Salmo 23

El Señor es mi pastor, nada me falta.

En prados de hierba fresca me hace reposar,

me conduce junto a fuentes tranquilas

y repara mis fuerzas.

Me guía por el camino justo,

haciendo honor a su Nombre.

Aunque pase por un valle tenebroso,

ningún mal temeré,

porque Tú estás conmigo.

Tu vara y tu cayado me dan seguridad.

Me preparas un banquete

en frente de mis enemigos,

perfumas con unguento mi cabeza

y mi copa rebosa.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Martha y Bolívar,

A mis hermanas, Nora, Daysi y Priscila,

Es por ustedes... los amo.

A H.K y M. Ramón, por esperar siempre mi regreso a casa.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<i>Página</i>
1. Agradecimientos.....	2
2. Dedicatoria.....	3
3. Resumen .....	9
4. Abstract.....	11
<b>5. <u>Capítulo I</u></b>	
Introducción .....	13
<b>6. <u>Capítulo II</u></b>	
<b><i>Revisión Bibliográfica:</i></b>	
Variabilidad fenotípica y genotípica bacteriana .....	18
Enterobacterias .....	19
Antibióticos betalactámicos .....	21
Mecanismo de acción .....	22
Clasificación de los antibióticos betalactámicos .....	23
Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos .....	25
Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	
Origen de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	27
Definición de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	28
Clasificación de las betalactamasas .....	28
Familias representativas de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	
SHV .....	34
TEM.....	35
CTX-M .....	35
PER.....	36

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

*Página*

---

Familias representativas de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	
OXA .....	37
Epidemiología de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	37

### 7. Capítulo III

#### *Metodología*

Justificación .....	42
Problema .....	45
Objetivos .....	46
Diseño .....	47
Universo .....	47
Muestra .....	48
Criterios de inclusión .....	48
Criterios de exclusión .....	49
Variables .....	49
Análisis de Datos .....	53
Procedimientos de recolección de Información .....	53
Procedimientos diagnósticos .....	54
Confirmación fenotípica del género y la especie bacteriana .....	54
Determinación de la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	55

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

*Página*

---

### Procedimientos diagnósticos

Confirmación de aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante fenotipo .....	56
Extracción del ADN total bacteriano .....	57
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	59

### 8. Capítulo IV

Resultados .....	65
------------------	----

### 9. Capítulo V

Discusión .....	75
Conclusiones y recomendaciones.....	81
10. Abreviaturas .....	87
11. Glosario .....	89
12. Bibliografía .....	91
13. Anexo .....	107
Anexo 1: Matriz de recolección de datos .....	107
Anexo 2: Matriz de recolección de datos .....	108

## LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Estructura molecular de los antibióticos betalactámicos .....	23
Figura 2. Esquema molecular de las betalactamasas TEM y SHV .....	29
Figura 3. Prevalencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. mirabilis</i> productores de BLEE en centros hospitalarios de todo el mundo.....	39
Figura 4. Presencia de <i>E. coli</i> productoras de BLEE en aislamientos de tracto urinario, desde el año 2003 al 2010.....	43
Figura 5. Aislamiento de colonias de enterobacterias en agar EMB .....	54
Figura 6. Confirmación fenotípica del género y la especie bacteriana mediante pruebas bioquímicas.....	55
Figura 7. Fenotipo BLEE mediante método de difusión con disco.....	57
Figura 8. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	62
Figura 9. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen <i>bla</i> <sub>PER</sub> .....	63
Figura 10. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	63
Figura 11. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .....	64

## **LISTA DE TABLAS**

	<i>Página</i>
Tabla 1. Clasificación de los antibióticos betalactámicos .....	24
Tabla 2. Clasificación esquemática de las betalactamasas .....	32
Tabla 3. Factores de riesgo para colonización por bacterias productoras de betalactamasas Espectro extendido (BLEE).....	40
Tabla 4. Operacionalización de Variables .....	49
Tabla.5 Primers utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	61
Tabla 6. Relación: aislados bacterianos con fenotipo BLEE negativos/positivos en la población de estudio .....	65
Tabla 7. Enterobacterias identificadas en la población de estudio independientemente del perfil de sensibilidad antibiótica.....	66
Tabla 8. Géneros y especies bacterianas de enterobacterias productoras y no productoras de BLEE. Análisis fenotípico* .....	67
Tabla.9 Relación: centros hospitalarios con fenotipo BLEE negativo/positivo.....	69
Tabla 10. Relación: servicios hospitalarios con fenotipo BLEE negativo/positivo .....	70
Tabla 11. Relación: origen de la muestra con fenotipo BLEE negativo/positivo .....	71
Tabla 12. Relación: género de los pacientes con fenotipo BLEE negativo/positivo.....	73
Tabla 13. Resultados de acuerdo a grupos de edad de los pacientes donde se aisló enterobacterias productoras de BLEE .....	73
Tabla 14. Resultados de los genes encontrados en relación con género y especie bacteriana con fenotipo BLEE positivo/negativo .....	74
Tabla 15. Opciones de tratamiento en infecciones por enterobacterias productoras de BLEE .....	85

## RESUMEN

**Introducción:** El fracaso terapéutico en infecciones por enterobacterias en pacientes hospitalizados ha dirigido estudios hacia los mecanismos de resistencia de dichas bacterias y se ha comprobado la presencia de bacterias productoras de enzimas inactivadoras de los antibióticos betalactámicos (betalactamasas). Dentro del grupo de betalactamasas se encuentran las BLEE, capaces de lograr resistencia bacteriana a cefalosporinas espectro extendido, monobactámicos y aminoglucósidos lo cual es un serio problema de salud (1). **Objetivos:** Se presenta un estudio descriptivo transversal observacional retrospectivo de periodo intencionado cuyo objetivo fundamental fue determinar la variabilidad genotípica centrándose en la identificación de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>PER</sub> mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en enterobacterias productoras de BLEE de aislados bacterianos de pacientes hospitalizados en nueve centros hospitalarios de la ciudad de Quito. **Metodología:** La población de estudio cumplió con criterios de inclusión, el universo fue de 2.693 aislados clínicos, de los cuales 820 aislados pertenecieron a pacientes hospitalizados, se recolectaron aislados bacterianos durante el periodo mayo 2009 a diciembre 2009. **Resultados principales:** Se identificó a 225 aislamientos productores de BLEE mediante pruebas de difusión con disco según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute- 2009* (CLSI), lo que representó una prevalencia del 27,4% del fenotipo BLEE en la población de estudio. De éstos aislamientos confirmados como BLEE, el 62,2% (140 aislamientos) fueron *Escherichia coli*, el 27,1% (61 aislamientos) fueron *Klebsiella pneumoniae*, el 4% (9 aislamientos) fueron *Enterobacter cloacae*, el 1,8 % (4 aislamientos) fueron *Klebsiella oxytoca*, el 1,3% (3 aislamientos) fueron *Enterobacter aerogenes*, el 0,8% (2 aislamientos) fueron

*Citrobacter freundii*, el 0,8% (2 aislamientos) fueron *Morganella morganii*, el 0,8% (2 aislamientos) fueron *Proteus vulgaris*, el 0,4% (1 aislamiento) fue *Citrobacter diversus* y el 0,4% (1 aislamiento) fue *Hafnia alvei*. De acuerdo a centros hospitalarios, el Hospital Enrique Garcés aportó el mayor porcentaje de los aislados confirmados como productores de BLEE: 44,1% (15 aislamientos), seguido por el Hospital Pablo Arturo Suárez: 42,2% (19 aislamientos), y por el Hospital Baca Ortiz: 35,1% (33 aislamientos). Mientras que el menor porcentaje se encontró en el Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora: 21,7% (5 aislamientos), y en el Hospital de La Policía Nacional: 10,8% (4 aislamientos). El grupo de edad en el cual se halló la mayor frecuencia de aislamiento bacterianos productores de BLEE, fueron en personas mayores de 60 años. En relación a la variabilidad genotípica, determinada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los hallazgos fueron: el gen *bla<sub>CTX-M</sub>* estuvo presente en 140 aislamientos confirmados como BLEE, el gen *bla<sub>SHV</sub>* estuvo presente en 104 aislamientos, el gen *bla<sub>TEM</sub>* estuvo presente en 75 aislamientos, y el gen *bla<sub>PER</sub>* no se encontró en ningún aislamiento. **Conclusiones:** La alta prevalencia del fenotipo BLEE detectada en el estudio indica la creciente resistencia al grupo de antibióticos de mayor uso en la práctica clínica, además la alta frecuencia en servicios diferentes a la Unidad de Cuidados Intensivos indica la constatación de dispersión de enterobacterias multiresistentes en el ámbito hospitalario, el gen *bla<sub>CTX-M</sub>* se manifestó como el más frecuente revelando la potente resistencia contra cefotaxima especialmente.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** The failure on the treatment of infections caused by *Enterobacteriaceae* in hospitalized patients, has conducted studies on the mechanisms of resistance of these bacteria and has established the presence of bacteria that produce enzymes inactivating beta-lactam antibiotics (betalactamase). Within the group of betalactamases, ESBLs are capable of achieving bacterial resistance to extended-spectrum cephalosporins, monobactams, and aminoglycosides and it has resulted a serious health problem (1).

**Objectives:** A retrospective observational cross-sectional study of intentional period is presented to determine the genotypic variability by focusing on the identification of genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>PER</sub> by chain reaction (PCR) in producing enterobacteria ESBL of asylum inpatients bacterial, nine hospitals in the city of Quito.

**Methodology:** The study population met the inclusion criteria, a total of 2.693 clinical isolates, including 820 isolates belonging to hospitalized patients; bacterial isolates were collected during the period May 2009 to December 2009. **Main Results:** We identified 225 ESBL-producing isolates were identified by disk diffusion test as recommended by the *Clinical and Laboratory Standards Institute-2009* (CLSI), it represented a 27.4% prevalence of ESBL phenotype in the study population. Of these isolates confirmed as ESBL, 62.2% (140 isolates) were *Escherichia coli*; 27.1% (61 isolates) as *Klebsiella pneumoniae*; 4% (9 isolates) as *Enterobacter cloacae*; 1.8% (4 isolates) as *Klebsiella oxytoca*; 1.3% (3 isolates) as *Enterobacter aerogenes*; 0.8% (2 isolates) as *Citrobacter freundii*; 0.8% (2 isolates) as *Morganella morganii*; 0.8% (2 isolates) as *Proteus vulgaris*; 0.4% (1 isolates) as *Citrobacter diversus* and, 0.4% (1 isolates) was *Hafnia alvei*. The Enrique Garcés Hospital contributed the highest percentage of isolates confirmed as ESBL producers: 44.1% (15 isolates), followed by Pablo Arturo Suarez

Hospital: 42.2% (19 isolates), and Baca Ortiz Hospital: 35.1% (33 isolates). The lowest percentage was found in the Obstetric-Gynecologic Isidro Ayora Hospital: 21.7% (5 isolates), and the National Police Hospital: 10.8% (4 isolates). ESBL-producing bacterial isolates were most commonly identified from people over 60 years. In relation to genotypic variability, determined by chain reaction (PCR) was: *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was present in 140 isolates confirmed as ESBL, the gene was present in 104 *bla*<sub>SHV</sub> isolates, the *bla*<sub>TEM</sub> gene was present in 75 isolates, and the gene *bla*<sub>PER</sub> was not found in any insulation. **Conclusions:** The high prevalence of ESBL phenotype detected in the study indicates the growing resistance to the antibiotic group most widely used in the clinical practice. The high frequency of ESBL isolates at different services to the Intensive Care Unit shows the dispersion finds of multiresistant *Enterobacteriaceae*. The *bla*<sub>CTX-M</sub> gene proved as the most frequent genes especially revealing the powerful resistance to cefotaxime.

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

La aparición de resistencia a betalactámicos se inició incluso antes de la aparición del primer betalactámico, la penicilina. La primera betalactamasa fue identificada en *Escherichia coli* antes de la liberación de la penicilina para su utilización en la práctica médica (2). Al poco tiempo de la introducción de la penicilina se observó una rápida aparición de resistencia en *Staphylococcus aureus* debido a una penicilinasas codificada por plásmidos. Esta betalactamasa rápidamente se extendió a la mayoría de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, así como a otras especies de estafilococos. Muchos géneros de bacterias Gram negativas poseen betalactamasas en forma natural mediadas por elementos cromosómicos. Estas enzimas, se cree que han evolucionado a partir de las proteínas ligadoras de unión a la penicilina, debido a que éstas muestran secuencias homólogas con las betalactamasas (3). El desarrollo de betalactamasas probablemente se debió a la presión selectiva ejercida por betalactámicos que producen los organismos del suelo en el medio ambiente. Es clásica la utilización de fangoterapia de los egipcios, considerándose que el betalactámico se encontraba en los hongos tipo penicillium contenidos en el fango o arcilla (4). La primera betalactamasa mediada por plásmidos en bacterias Gram negativas, denominada TEM-1, fue descrita en la década de 1960 (5), originalmente en un solo aislado de *E. coli* de un cultivo de sangre de un paciente llamado Temoniera en Grecia, por lo tanto, la designación de TEM (6). Esta betalactamasa mediada por plásmidos y transposones ha facilitado la propagación de la betalactamasa tipo TEM-1 a otras especies de bacterias.

En pocos años, después de su primer aislamiento, la betalactamsa tipo TEM-1 se diseminó en todo el mundo y ahora se encuentra en muchas especies, diferentes a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, y *Neisseria gonorrhoeae*. Además de TEM-1, otra betalactamasa común, también mediada por plásmidos es la denominada SHV-1 encontrada en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*. Su nombre se debe a la variable sulfhidrilo de la enzima. Esta betalactamasa es codificada cromosómicamente en la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae*, pero suele ser mediada por plásmidos en *E. coli*.

A partir de la década de los 60, y sobre todo durante los años 70 y 80 se desarrollaron un gran número de antibióticos betalactámicos resistentes a la acción de estas enzimas. Asimismo, aparecieron en el arsenal terapéutico los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam que permitían recuperar la actividad de las penicilinas. Así, la asociación amoxicilina-ácido clavulánico presentaba actividad frente a un gran número de enterobacterias incluyendo aquellas que se habían vuelto resistentes por la producción de una betalactamasa (generalmente TEM-1, TEM-2 o SHV-1). Estas betalactamasas presentaban actividad frente a aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (ticarcilina) y como se ha mencionado, eran sensibles a los inhibidores de betalactamasas.

En los últimos 20 años, muchos de los nuevos antibióticos betalactámicos han sido desarrollados y diseñados específicamente para ser resistentes a la acción hidrolítica de las betalactamasas. Sin embargo, con cada nueva clase que se ha utilizado en la

práctica médica, surge una nueva betalactamasa. Es de suponer que, la presión selectiva del uso y abuso de los nuevos antibióticos en el tratamiento de infecciones ha seleccionado las nuevas variantes de betalactamasas. Una de estas nuevas clases de antibióticos introducidos, fueron las oximino-cefalosporinas, como cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefepime, éstas llegaron a ser ampliamente utilizadas para el tratamiento de infecciones graves por bacterias Gram negativas en la década de 1980. Por lo tanto no es sorprendente, que el exagerado uso de estos antibióticos haya determinado el rápido surgimientos de la resistencia a estos betalactámicos de espectro extendido.

La primera de estas enzimas capaces de hidrolizar a estos nuevos betalactámicos, fue la betalactamasa SHV-2, encontrada en una sola cepa de *Klebsiella ozaenae*, aislada en Alemania (7). Debido a su mayor espectro de actividad, especialmente en contra de las oximino-cefalosporinas, estas enzimas se denominaron betalactamasas de espectro extendido (BLEE). En la actualidad se han descrito más de 300 enzimas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar a oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico.

Las betalactamasas se pueden clasificar en diferentes grupos, según dos criterios generales, la clasificación funcional descrita por Karen Bush (8), o la clasificación molecular descrita por JB Ambler (9). La mayoría de las BLEE, de acuerdo a la clasificación de Ambler, pertenecen a la clase molecular A. Entre ellas se encuentran las betalactamas tipo TEM y SHV, derivadas de betalactamasas con menor espectro de

hidrólisis, la familia de betalactamasas tipo CTX-M, procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*, y otras menos prevalentes como las PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, en correlación a la clasificación funcional todas éstas se encuentran incluidas en el grupo funcional 2be (10). Otras BLEE pertenecientes a la clase A, aunque del subgrupo 2ber son las betalactamasas CMT (complex mutant TEM), como la TEM-50 que combinan cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oximino-cefalosporinas. Algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional 2de), son también betalactamasas de espectro extendido.

La detección de BLEE es factible en la mayoría de los casos, en enterobacterias sensibles a la actividad de la asociación amoxicilina-ácido clavulánico. Por tanto, su presencia no puede detectarse fenotípicamente en bacterias naturalmente resistentes a esta asociación como son las enterobacterias (*Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* y *Proteus* spp) o en los bacilos Gram negativos no fermentadores (*P. aeruginosa*) portadores de betalactamasas tipo AmpC inducible, debido a la superposición de mecanismos de resistencia. Sin embargo debido a los patrones cambiantes de resistencia por acción de elementos móviles genéticos, este concepto puede ir cambiando. Así en el año 2007, Chien-Fang-Peng y colaboradores presenta un reporte de una BLEE tipo CTX-M-3 en *Serratia marcescens* en Taiwan (11), posteriormente, Lewis y colaboradores hacen el primer reporte de BLEE tipo CTX-M en *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., y *Morganella morganii*. (12). Otros reportes también indican la presencia de BLEE en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens* (13). En forma similar existen reportes esporádicos de la producción de BLEE en *Citrobacter* spp (14). *Enterobacter*, si bien no esta dentro del grupo de

búsqueda sistemática de BLEE en la rutina del laboratorio de Microbiología, es una bacteria en la cual hay varios reportes en la literatura de producción de BLEE detectadas a nivel molecular.

Así, para el resto de enterobacterias, a partir de los antibiogramas realizados, bien por la técnica de difusión con disco, o por la técnica de microdilución, se puede sospechar la presencia de este tipo de enzimas, aunque su confirmación definitiva debe ser realizada mediante técnicas moleculares dado que pueden presentarse patrones de resistencia similares entre los distintos mecanismos de resistencia bacteriana a betalactámicos. Por otro lado se hace importante la identificación de los genes que codifican las BLEE debido a que se encuentran en elementos móviles como plásmidos, es fácil su diseminación y con frecuencia se encuentran asociados a resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol.

En el Ecuador se conoce que la producción de BLEE en *E.coli* procedente del tracto urinario se ha incrementado del 2% en el año 2003 al 10 % en el año 2010 (Figura.4) de acuerdo a los datos obtenidos de la Red de Vigilancia de Resistencia Bacteriana Ecuador (REDNARBEC), obtenido de [www.rednarbec.org](http://www.rednarbec.org). Sin embargo hasta el momento se desconoce a nivel molecular los diferentes tipos de BLEE que circulan en el Ecuador. En otras regiones geográficas se conoce que las BLEE más prevalentes son TEM y CTX-M (15), y las menos prevalentes como las PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO. (16)

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **Variabilidad fenotípica y genotípica bacteriana.**

La amplia gama de géneros y especies bacterianas implica que las bacterias son capaces de transmitir con mucha precisión información genética de generación en generación, sin embargo además de la herencia, existe una variabilidad o cambios adaptativos que se expresan en la descendencia, estos cambios están asociados a dos propiedades, fundamentales de las células u organismos: el genotipo y el fenotipo. El genotipo hace referencia a la constitución genética precisa de una célula bacteriana o un organismo superior, mientras que el fenotipo es la expresión del genotipo, las características observables de una célula bacteriana o un organismo superior. Las bacterias pueden expresar cambios en cualquiera de las dos propiedades (17).

Las variaciones fenotípicas pueden ser de distintos tipos: morfológicas, cuando se producen cambios de tamaño, forma, pérdida de cápsula, flagelos. Cromógenas: en bacterias con la capacidad de producir pigmentos, los cuales pueden desaparecer temporalmente al modificar condiciones ambientales. Enzimáticas: producción de enzimas por estímulos nutricionales, ambientales, exposición a antibióticos. Las variaciones genotípicas se producen por cambios en las secuencias de nucleótidos de un gen (mutaciones), esto da origen a un nuevo rasgo genético o a un fenotipo cambiado.

La transferencia del material genético en las bacterias se realiza mediante mecanismos definidos:

1. La conjugación: tiene lugar cuando el material genético pasa de forma directa de una bacteria a otra, un plásmido o una parte del cromosoma bacteriano pasa de una bacteria donante a una receptora.
2. La transformación: tiene lugar cuando una bacteria capta el ADN del medio en el cual se desarrolla, existe recombinación del material genético introducido y el original.
3. La transducción: tiene lugar cuando los virus bacterianos (bacteriófagos) transportan el ADN de una bacteria a otra sufriendo recombinación con el cromosoma bacteriano. La resistencia a antibióticos en las bacterias suele ser el resultado de la acción de genes localizados en plásmidos, los cuales evolucionan logrando resistencia simultánea a varios antibióticos (17).

## **Enterobacterias**

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos con importancia clínica. Se han descrito más de 40 géneros y cientos de especies y subespecies. Estos géneros se han clasificado en función de sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación ADN-ADN y secuenciación de ARNr16S. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos Gram negativos de tamaño intermedio, pueden ser móviles o inmóviles, con flagelos, no forman esporas, pueden crecer rápidamente de forma aerobia y anaerobia en varios medios no selectivos,

tienen requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa positivos y oxidasa negativos. Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran en forma general en el suelo, el agua la vegetación y también en la flora intestinal normal de animales incluido el ser humano. Producen gran variedad de enfermedades, hasta el 35% de bacteriemias, más del 70% de infecciones del tracto urinario, y gran parte de infecciones intestinales (18).

*Escherichia coli*, es el miembro más frecuente e importante de la familia, Este microorganismo se asocia a múltiples enfermedades incluidas las gastrointestinales, del tracto urinario, meningitis y sepsis (19). La identificación de los miembros de esta familia se lleva a cabo por medio de la detección de metabolitos que se manifiestan por un grupo de pruebas llamadas sistema bioquímico y por la identificación de los antígenos de superficie manifestado por pruebas serológicas. Casi todas estas bacterias crecen bien en medios de cultivo simples y no son exigentes en sus requerimientos nutricionales (19).

Las infecciones por enterobacterias en pacientes hospitalizados son frecuentes y potencialmente mortales. Los hospitales son ambientes especiales (20). Las enfermedades infecciosas se extienden fácil y rápidamente en un ambiente hospitalario por varias razones:

1. Los pacientes hospitalizados están debilitados y su sistema inmune deprimido no puede hacer frente a la enfermedad infecciosa.

2. En muchos pacientes se ha debilitado la resistencia a enfermedades infecciosas, a causa de su patología previa.
3. En los hospitales se trata a pacientes que padecen enfermedades infecciosas y estos pacientes pueden ser reservorios de bacterias altamente virulentas.
4. La aglomeración de pacientes en las habitaciones y en los consultorios aumenta la probabilidad de infecciones cruzadas.
5. El personal del hospital se mueve de un paciente a otro, aumentando la posibilidad de transferencia de patógenos.
6. Muchos procedimientos hospitalarios tales como la cateterización, inyección hipodérmica, punción lumbar, recolección de muestras y o tejidos llevan inherente el riesgo de introducir microorganismos patógenos en el hospedador.
7. Por otro lado un paciente hospitalizado se encuentra recibiendo múltiples fármacos los cuales aumentan la susceptibilidad a infecciones. Un número relativamente limitado de microorganismos son los agentes de la mayoría de las infecciones hospitalarias (20).

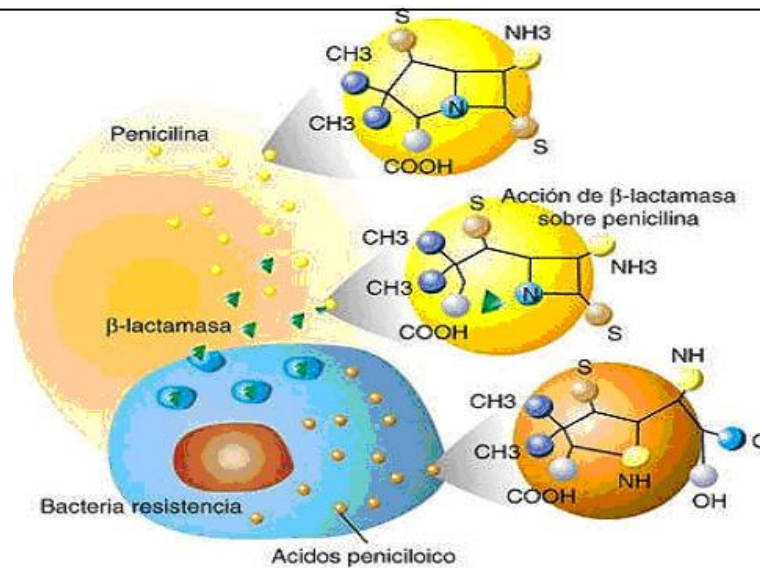
### **Antibióticos betalactámicos**

El descubrimiento de la penicilina en 1928 y su producción a principios de la década de los 40 marcaron los inicios de la era de los antibióticos en el uso clínico. A partir de esta época se ha realizado el descubrimiento, síntesis y aplicación terapéutica

de muchas otras moleculares efectivas en la lucha contra las infecciones bacterianas. Los antibióticos betalactámicos pertenecen al grupo de inhibidores de síntesis de la pared celular, son fármacos de gran utilidad en la práctica clínica debido a su efecto bactericida, baja toxicidad, amplio espectro y amplia gama de derivados siendo quizá los de mayor uso clínico solos o en combinación con otros antibióticos (21).

***Mecanismo de acción:*** Los betalactámicos comparten una estructura común, la presencia de un anillo betalactámico con un anillo de tiazolidina, y el mismo mecanismo de acción, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana formada por peptidoglucanos. El peptidoglucano es un componente heteropolimérico de la pared bacteriana que le proporciona estabilidad mecánica rígida gracias a su estructura en forma de entrecruzamiento, el peptidoglucano posee cadenas de glucano de aminoazúcares alternantes que están entrecruzados por cadenas peptídicas. La biosíntesis de peptidoglucano incluye más de 30 enzimas bacterianas y se desarrolla en tres etapas, es en la última etapa de biosíntesis donde actúan los antibióticos betalactámicos al inhibir a la enzima transpeptidasa que se encarga de la terminación de la formación de los enlaces cruzados del peptidoglucano (22).

Los antibióticos betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. El espectro de los antibióticos betalactámicos incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas. No son activos sobre micoplasmas porque éstos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares (22).



**Figura 1.** Estructura molecular de los antibióticos betalactámicos, ejemplo Penicilina. Tomado de: <http://www.microbiologiareview.com/trabajos62/penicilina-cefalosporina/penicilina-cefalosporina2.html>

**Clasificación de los antibióticos betalactámicos:** Este grupo de antibióticos comprende varios miembros, entre los que se encuentran: Penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las betalactamasas. Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico, además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades (21).

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas y un anillo betalactámico, la introducción de modificaciones en las cadenas

laterales origina las diversas cefalosporinas. (21) Las cefalosporinas se clasifican según su generación: las de primera generación tienen excelente actividad contra Gram positivos y moderada contra Gram negativos, las de segunda generación tienen mayor espectro contra Gram negativos y cierta actividad contra anaerobios, las de tercera generación tienen actividad contra Gram positivos, mayor actividad contra Gram negativos y un subgrupo posee actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, las de cuarta generación poseen el espectro de las de tercera generación pero con mayor estabilidad contra la hidrólisis que inducen betalactamasas cromosómicas (22).

**Tabla 1. Clasificación de los antibióticos betalactámicos.**

<b>Grupo</b>	<b>Vía de Administración: Parenteral</b>	<b>Vía de Administración: Oral</b>
<b><i>Penicilinas</i></b>		
Sensibles a las betalactamasas: Espectro reducido Activas frente a enterobacterias Activas frente a enterobacterias y <i>Pseudomonas</i>	Bencilpenicilina Ampicilina Carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, azlocilina, piperacilina	Fenoxibencilpenicilina Amoxicilina, ampicilina Indanil-carbenicilina
Resistentes a las betalactamasas: Antiatafilocócicas	Meticilina, oxacilina, nafcilina Ticarcilina-ácido clavulánico, ampicilina- sulbactam, piperacilina- tazobactam, Amoxicilina-ácido clavulánico.	Cloxacilina, dicloxacilina
Combinadas con inhibidores de la betalactamasas		Amoxicilina-ácido clavulánico
<b><i>Cefalosporinas</i></b>		
Primera generación	Cefazolina, cefalotina, cefradina	Cefalexina, cefradina, cefadroxilo
Segunda generación Activas frente a <i>Haemophilus</i>  Activas frente a <i>Bacteroides</i>	Cefamandol, cefuroxima, cefonicida, ceforanida Cefoxitina, cefotetán, cefmetazol	Cefaclor, cefuroxima, cefprozilo
Tercera generación Espectro ampliado	Ceftriaxona, cefotaxima, ceftizoxima	Ceftibuteno, cefdinir, cefixima, Cefpodoxima

Espectro ampliado y anti- <i>Pseudomonas</i>	Ceftacidima, cefoperazona, cefepima	Ninguna
<b><i>Carbapenémicos</i></b>	Imipenem-cilastatina, meropenem, ertapenem	Ninguno
<b><i>Monobactámicos</i></b>	Aztreonam	Ninguno

Tomado de: Marín M, et al. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(1):42-55

### **Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos**

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos betalactámicos por varios mecanismos controlados por material genético tanto cromosómico como plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutaciones, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser auto transferibles entre bacterias. Los mecanismos implicados en la resistencia son:

1. Alteraciones de la permeabilidad: la presencia de membrana externa en los bacilos Gram negativos dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas, como los betalactámicos, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para tal fin, la resistencia es secundaria a alteraciones en las porinas (23).
2. La modificación de las dianas: es otro de los mecanismos de resistencia, los betalactámicos deben unirse a las proteínas de unión a las penicilinas para ejercer su efecto bactericida, cambios a nivel de estas proteínas implican una pérdida de afinidad de los betalactámicos

por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad, este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos Gram positivos (23).

3. La producción de enzimas (betalactamasas): constituye el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos sobre todo en las bacterias Gram negativas. Las betalactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un genoma, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos o transposones (24). Actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBPs (Penicillin-binding proteins).

La mayoría de las bacterias Gram positivas excretan sus betalactamasas extracelularmente (exo-enzimas), inactivándose el betalactámico antes de ingresar a la bacteria. Este es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina mediante una penicilinasas. En cambio, las betalactamasas en las bacterias Gram negativas se encuentran alojadas en el espacio periplásmático (endo-enzimas), entre la membrana externa y la membrana citoplasmática, lugar donde inactivan a los betalactámicos. La producción de betalactamasas puede ser constitutiva o inducible por la presencia de un betalactámico. En las bacterias Gram negativas, las betalactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido. Las betalactamasas cromosómicas, producidas fundamentalmente por bacterias Gram negativas, pueden ser constitutivas o inducibles (24).

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

### ***Origen de las betalactamasa de espectro extendido (BLEE)***

El origen de las BLEE inicia con la introducción de las cefalosporinas de amplio espectro como la cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, y un monobactam, el aztreonam, las cuales se caracterizaron por poseer un espectro de actividad mucho mayor que el de las cefalosporinas que existían hasta su aparición (25). Fueron introducidas en los años 1980 con la esperanza de que fueran eficaces contra los aislados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, cuya resistencia a los betalactámicos se debía a betalactamasas plasmídicas siendo las más frecuentes TEM-1 y SHV-1 (26). No obstante, al poco tiempo de la introducción de éstos nuevos antibióticos en la práctica clínica se registraron bacterias resistentes al tratamiento, debido a la gran capacidad adaptativa de las células bacterianas y a la alta diseminación de genes de resistencia inducida por la utilización masiva de antibióticos en el medio hospitalario y en la comunidad, lo cual, en la actualidad, ha dado lugar a la aparición de bacterias multiresistentes (27).

La presión de selección ejercida por el uso excesivo de estas cefalosporinas de amplio espectro ha influido probablemente en la aparición de estas nuevas variantes de betalactamasas (28). Estas nuevas betalactamasas caracterizadas por un espectro ampliado de actividad, fueron llamadas BLEE (28). El primer reporte de betalactamasas codificadas por plásmidos capaces de hidrolizar a cefalosporinas de espectro extendido fue publicado en 1983. El gen que codificaba las betalactamasas tradicionales mostró una mutación de un nucleótido en comparación con el gen que codificaba SHV-1. Pronto se descubrieron otras betalactamasas que estaban

estrechamente relacionadas con TEM-1 y TEM-2, pero que tenían la capacidad para conferir resistencia prolongada a cefalosporinas de amplio espectro (29). Estudios posteriores demostraron que las sustituciones de los aminoácidos en las posiciones 104, 164, 238, y 240 en las betalatasas tipo TEM originaron el fenotipo de las BLEE, esta mutación otorgaba mayor resistencia a la ceftazidima y aztreonam que a cefotaxima. En la familia SHV, sustituciones en la posición 238 y 240 se registraron como las más comunes y se asociaron con resistencia a la ceftazidima, cefotaxima y aztreonam (29).

### ***Definición de betalactamasa de espectro extendido (BLEE)***

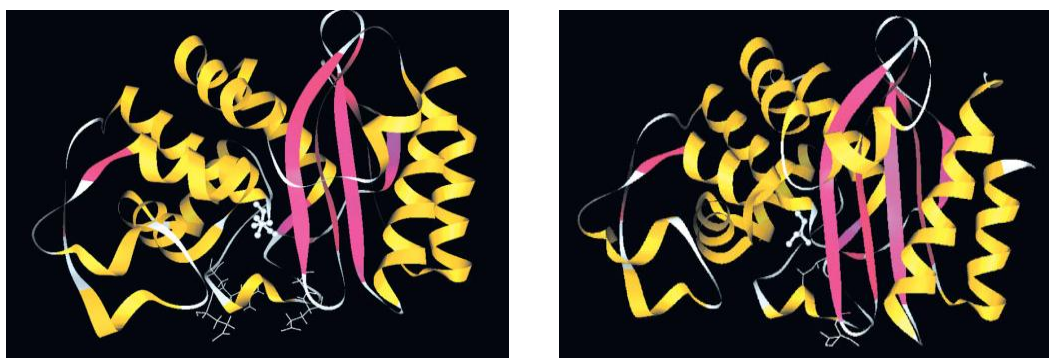
Las BLEE se definen como, betalatasas capaces de conferir resistencia bacteriana a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación y aztreonam, además son inhibidas por inhibidores de betalatasas como por ejemplo el ácido clavulánico (30).

### ***Clasificación de las betalactamasas***

Son clasificadas de acuerdo a dos criterios generales:

1. La clasificación molecular de Ambler (31), se basa en la homología de aminoácidos donde existen cuatro clases: A, C y D las cuales son serina betalatasas, que hidrolizan sus sustratos mediante la formación de una enzima acil a través de una serina del sitio activo y la clase B, metalo betalatasas las cuales requieren iones de zinc como sustrato.

2. La clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (32), en la cual existen los siguientes grupos y subgrupos: grupo 1, las enzimas son cefalosporinas pertenecientes a la clase C en la clasificación molecular de Ambler y son codificadas en cromosomas de enterobacterias, son más activas en las cefalosporinas que en la bencilpenicilina, suelen ser resistentes a la inhibición por ácido clavulánico, activas en cefamicinas, tienen una alta afinidad por el aztreonam, pocas tienen propiedades inusuales, tales como la falta de actividad en cefoxitina (33), la inhibición por ácido clavulánico o tazobactam (34).



---

**Figura 2.** Esquema molecular de las betalatasas TEM y SHV. El residuo de serina se muestra en el centro de cada molécula y los átomos de los residuos de las sustituciones de los aminoácidos que producen el amplio espectro de las betalatasas de espectro extendido (BLEE) se muestran en modo de bastón. Tomado de: George A. Jacoby, M.D., and Luisa Silvia Muñoz-Price. The New  $\beta$ -Lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352:380

---

El nuevo subgrupo 1e, es un grupo de variantes con mayor actividad frente a ceftazidima y otros oximiino-betalactámicos como consecuencia de sustituciones de aminoácidos, inserciones o supresiones (35). El grupo 2, incluye las clases moleculares A y D, representan el grupo más grande de betalatasas, debido a la creciente

identificación de nuevas variantes en los últimos 20 años. El subgrupo 2a, penicilinasas, representa un pequeño grupo de betalatasasas con un espectro relativamente limitado de la actividad hidrolítica, son las betalatasasas predominantes en cocos Gram positivos, entre ellos los estafilococos (36) y, ocasionalmente, enterococos (37). Estas enzimas hidrolizan preferentemente a la bencilpenicilina y a muchos derivados de penicilina, presentan pobre hidrólisis a cefalosporinas, carbapenémicos, o monobactámicos, son inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam. La mayoría de estas enzimas están codificadas en cromosomas, aunque algunas penicilinasas estafilocócicas están codificadas en plásmidos (38).

El subgrupo 2b hidroliza fácilmente a penicilinas y cefalosporinas como cefaloridina y cefalotina, están fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam, incluyen TEM-1, TEM-2, y SHV-1, son las betalatasasas más comunes mediadas por plásmidos (39).

El subgrupo 2be comprende a las BLEE. Estas enzimas de amplio espectro tienen actividad frente a las penicilinas y cefalosporinas del subgrupo 2b, además, hidrolizan a uno más antibióticos del grupo de oxiimino-betalactámicos, como cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, este grupo fue derivado por sustituciones de aminoácidos en betalactamasas clásicas como: TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (40). Las betalactamasas tipo TEM y SHV comparten similitudes funcionales, mientras que CTX-M, hidroliza a cefotaxima más fácilmente que a ceftazidima. A diferencia de TEM o SHV, las enzimas CTX-M son inhibidas por tazobactam en mayor magnitud que por el ácido clavulánico (41). El subgrupo 2be es sensible a la inhibición por ácido clavulánico, un elemento utilizado en su detección por los laboratorios clínicos (42).

El subgrupo 2br, son betalatasas de amplio espectro que han adquirido resistencia al ácido clavulánico y a los inhibidores asociados, manteniendo el espectro de actividad del subgrupo 2b (43). El subgrupo 2c, penicilinasas, se caracterizan por su capacidad para hidrolizar carbenicilina o ticarcilina (43), son generalmente inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam.

El subgrupo 2d incluye betalatasas con capacidad para hidrolizar a cloxacilina y oxacilina, por lo tanto se conocen como enzimas OXA, muchas son inhibidas por Na Cl. Otro de los subgrupos de importancia es el 2e, cefalosporinasas, tienen la capacidad de hidrolizar a cefalosporinas de espectro extendido y ser inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam. Se pueden confundir con el grupo 1, ya que pueden aparecer en organismos similares y con perfiles de resistencia comparables (44).

El grupo 3, metalo betalatasas, se diferencian estructuralmente de otras betalatasas por la exigencia de un ion de zinc en el sitio activo, tienen la capacidad de hidrolizar carbapenemes, aunque algunas serina betalatasas ahora también han adquirido esa habilidad, no se inhiben por ácido clavulánico ácido o tazobactam pero, son inhibidas por quelantes de iones como el EDTA, ácido dipicolínico, o 1,10-o-fenantrolina (45).

**Tabla 2. Clasificación esquemática de las betalatasas.**

<b>Grupo de Bush-Jacoby (2009)</b>	<b>Grupo Bush -Jacoby-Medeiros (1995)</b>	<b>Clase Molecular</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Inhibida por Ácido clavulánico o Tazobactam</b>	<b>Inhibida por EDTA</b>	<b>Características</b>	<b>Enzimas representativas</b>
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Gran hidrólisis de Cefalosporinas como Bencilpenicilina, hidrólisis de Cefamicinas	<i>E.coli</i> , AmpC, ACT-1,CMY-2,FOX-1,MIR-1
1c	N. I	C	Cefalosporinas	No	No	Incremento de la hidrólisis por Ceftazidima y con frecuencia hidrólisis de oximino-betalactámicos	GC1,CMY-37
2 <sup>a</sup>	2a	A	Penicilinas	Si	No	Gran hidrólisis de Bencilpenicilina como Cefalosporinas	PCI
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	Si	No	Similar hidrólisis de Bencilpenicilina y Cefalosporinas	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, Monobactámicos	Si	No	Incremento de la hidrólisis de oximino-betalactámicos	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-2 VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistencia a Ácido clavulánico, Sulbactam y Tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	N.I	A	Cefalosporinas de espectro extendido, Monobactámicos	No	No	Incremento de la hidrólisis de oximino-betalactámicos combinado con resistencia a Ácido clavulánico, Sulbactam y Tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilinas	Si	No	Incremento de la hidrólisis de Carbenicilinas	PSE-1, CARB-3,

2ce	N.I	A	Carbencilinas, Cefepime	Si	No	Incremento de la hidrólisis de Carbencilinas, Cefepime y Cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variabl e	No	Incremento de la hidrólisis a Cloxacilina u Oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	N.I	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variabl e	No	Hidrólisis de Oxacilina o Cloxacilina, y oximino-betalactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	N.I	D	Carbapenémicos	Variabl e	No	Hidrólisis de Oxacilina o Cloxacilina, y Carbapenémicos	OXA-23, OXA-48OR
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	Hidrólisis de Cefalosporinas inhibidas por Ácido clavulánico pero no Aztreonam.	CepA
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variabl e	No	Incremento de la hidrólisis a Carbapenémicos, oximino-betalactámicos y Cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 <sup>a</sup>	3	B1	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro, incluyendo Carbapenémicos pero no Monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CerA, IND-1
		B3					CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis preferencial de Carbapenémicos	CphA, Sfh-1
N.I	4		No conocido				

N.I: No incluido.

Tomado de: Karen Bush and George A. Jacoby. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Mar 2010; 54: 969 - 976.

### ***Familias representativas de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)***

Las BLEE están representadas por enzimas definidas.

1. SHV: Sulfhidrilo Hidroxil Variable, es considerada la enzima más frecuente en aislamientos clínicos que cualquier otro tipo de BLEE (46). En 1983, en un aislamiento de *Klebsiella ozaenae* fue descubierta una betalactamasa que hidrolizaba de manera eficaz a cefotaxima y ceftazidima en menor medida (47). La secuenciación demostró que esta nueva betalactamasa difería de SHV-1 previamente descrita, mediante la sustitución de glicina por serina en la posición 238. Esta mutación concedió las propiedades de espectro extendido a la nueva betalactamasa y fue designada como SHV-2. Algunos años después del descubrimiento de esta enzima, se ha reportado que se encuentran en todos los continentes habitados (48). Esto se explica por la presión de selección que ejerció el uso de cefalosporinas de tercera generación en los años 80. Hasta el momento se han descrito más de 134 variantes de SHV, siendo la mayoría de ellas BLEE, aunque también existen variantes que muestran resistencia variable a inhibidores de betalactamasas como por ejemplo: SHV-10, 26, 49, 56 y 72. Betalactamasas tipo SHV se han detectado en diferentes especies de enterobacterias, principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae* aunque también en *P. aeruginosa* y en *Acinetobacter* spp. (49). Las enzimas SHV se encuentran codificadas por el gen *bla<sub>SHV</sub>*, codificado inicialmente por genoma cromosómico, pero 1979, se demostró la transferencia del gen en elementos móviles como plásmidos, desde entonces, el gen *bla<sub>SHV</sub>* se ha distribuido ampliamente, tanto geográficamente, como en distintos hospederos, mutando para producir variantes de amplio espectro (50).

2. TEM: Son enzimas encontradas con frecuencia en aislamientos clínicos. Las enzimas clásicas, y de las que derivan las BLEE son: TEM-1 y TEM-2. TEM-1 fue reportada por primera vez en 1965 en un aislamiento de *Escherichia coli* en Grecia, en un paciente llamado Temoneira (de ahí la denominación TEM) (51). TEM-1 es capaz de hidrolizar a ampicilina, tiene actividad moderada contra cefalosporinas de amplio espectro y se inhibe por el ácido clavulánico. TEM-2 tiene un perfil hidrolítico similar a TEM-1 (52). En 1987 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* se detectó una enzima con actividad hidrolítica contra cefotaxima por lo que se denominó inicialmente CTX-1, esta nueva enzima difería de TEM-2 por dos sustituciones de aminoácidos (53). Posteriormente esta nueva enzima se denominó TEM-3. Hasta el momento se han descrito más de 182 variantes de enzimas TEM, que incluyen muchas BLEE, enzimas IRT (Inhibitor-Resistant TEM), que son enzimas de amplio espectro resistentes a los inhibidores de betalactamasas, y las CMT (Complex Mutant TEM) que son enzimas que combinan los perfiles de BLEE e IRT. La mayoría de estas enzimas se ha descrito en *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque también se han identificado en otras especies de enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* y *Salmonella* spp. (54). Las enzimas TEM derivan de los genes *bla*<sub>TEM</sub> (55).

3. CTX-M: Las enzimas de tipo CTX-M se dividen según su secuencia de aminoácidos en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (56). Tienen una gran actividad hidrolítica frente a cefotaxima y

algunas de sus variantes también hidrolizan a ceftazidima. Las BLEE tipo CTX-M derivan de betalactamasas cromosómicas de distintas especies de *Kluyvera*. El origen de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-2 parece estar en genes de *Kluyvera ascorbata* y los grupos CTX-M-8 y CTX-M-9 habrían evolucionado a partir de genes de *Kluyvera georgiana* (57). El origen del grupo CTX-M-25 no se ha identificado de forma precisa pero se cree que también podría derivar de otros miembros del género *Kluyvera* (58) CTX-M, son consideradas las enzimas más representativas en la actualidad, estas se han identificado en tres áreas geográficas: Sur América, Europa y Lejano Oriente, se han descrito más de 100 variantes considerándose que son el tipo de BLEE más frecuentes en todo el mundo (59).

4. PER: Son enzimas que comparten homología en un 25 a 27% con enzimas tipo TEM y SHV (60). Confieren resistencia a penicilinas, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, su actividad se inhibe por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Se han descrito más de 6 variantes de enzimas tipo PER. La enzima PER-1 se describió por primera vez en Francia, en 1991 de un aislado de un paciente originario de Turquía, actualmente está muy diseminada en *Acinetobacter* spp. y en *P. aeruginosa*. PER-2, que presenta un 86% de homología en aminoácidos con PER-1, fue descrita por primera vez en aislados de *S. enterica* serovar Thyphimurium en 1996 en Argentina (61). Llama la atención, que mientras PER-1 se ha descrito principalmente en Turquía y Corea, PER-2 sólo se ha encontrado en América del Sur (62).

5. OXA: Son enzimas con capacidad de hidrolisis para oxacilina, cloxacilina y en menor porcentaje a bencilpenicilina (63). Las betalatasas tipo OXA tienen actividad predominantemente en *Pseudomonas aeruginosa* (64), pero se han detectado en muchas otras bacterias Gram negativas. La mayoría de enzimas tipo OXA no hidrolizan a cefalosporinas de espectro extendido en forma significativa por lo que no se consideraban inicialmente como BLEE. Sin embargo, OXA-10 hidroliza aunque débilmente a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam por lo que es considerada como una BLEE, al igual que: OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35, y -45 (65). Las enzimas tipo OXA fueron descritas originalmente en *Pseudomonas aeruginosa* en Ankara, Turquía (66).

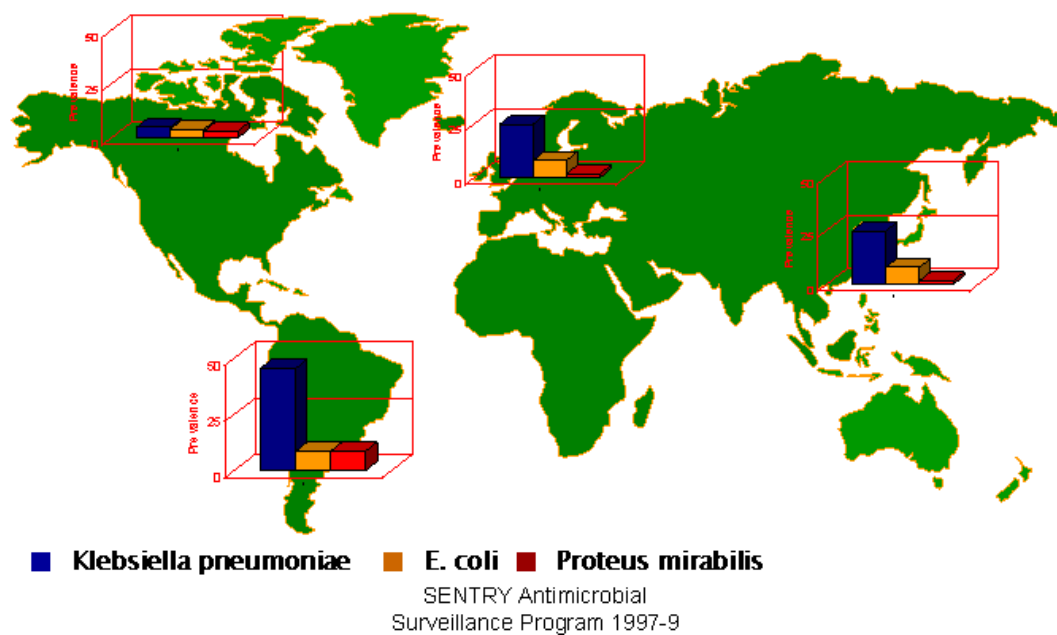
### ***Epidemiología de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE)***

El origen de bacterias productoras de BLEE inició con mutaciones en los genes de las betalactamasas tradicionales, TEM-1, TEM-2 y SHV-1, su aparición ha estado asociada a la introducción y uso masivo de cefalosporinas de amplio espectro. A la primera de estas betalactamasas, descubierta en Alemania en 1984, se la denominó TEM-3 por ser una variante de la TEM-2 (67). Posteriormente se han descrito mutantes de TEM-1 y TEM-2 (TEM-3 a TEM-139), y de SHV-1 (SHV-2 a SHAV63), encontrándose en la gran mayoría de las enterobacterias, esencialmente en *K. pneumoniae*, y recientemente en *P. aeruginosa* y en *Acinetobacter baumannii* (68). La evolución de BLEE es constante, considerándose que la familia CTX-M es la más prevalente en la actualidad, estas, fueron descritas durante la década de los años ochenta, apenas 3 años después de la descripción de BLEE de tipo TEM y SHV (69). Aparte de estos grupos o familias, que incluyen la mayoría de las BLEE, existen otras

enzimas menos prevalentes no relacionadas con las anteriores y con peculiaridades en la distribución geográfica o preferencia por diferentes bacterias (70). Hasta finales de los años noventa la mayoría de las BLEE detectadas pertenecía a las familias SHV y TEM, los aislados que las producían se aislaban en brotes nosocomiales epidémicos, con una prevalencia, mayor en *K. pneumoniae* que en *E. coli* (71,72).

La prevalencia de enterobacterias BLEE es variable en cada región geográfica, Hirakata Y, Matsuda J. y colaboradores reportaron una prevalencia de *K. pneumoniae* con fenotipo BLEE en Singapur del 35,6%, seguidos de China continental con un 30,7%, Sudáfrica 28,1% y Filipinas 21,9% (73). Otros reportes, Luzzaro, Francesco, Mezzatesta y colaboradores reportan en Italia una prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE del 7,4% en aislados de pacientes hospitalizados y del 3,5% en pacientes ambulatorios, en los pacientes hospitalizados, la enterobacteria de mayor prevalencia fue *Escherichia coli*, en los pacientes ambulatorios en cambio *Proteus mirabilis* fue el más prevalente (74).

En Estados Unidos, Smith Moland Ea, Black Ja y colaboradores reportan que el 3,2% de todos los aislamientos (enterobacterias provenientes de aislados en UCI/ enterobacterias no provenientes de aislados en UCI) fueron productores de BLEE, y que *Klebsiella spp.* y *E. coli* fueron los productores más comunes de BLEE en la población de estudio (75).



**Figura 3.** Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *P. mirabilis* productores de BLEE en aislados bacterianos comunitarios y hospitalarios de más de 80 centros hospitalarios de todo el mundo desde 1997-2001, reporte del estudio: SENTRY antimicrobial surveillance program 1997 (76).

Se considera que el principal reservorio de enterobacterias BLEE es el tracto digestivo, y su transmisión de persona a persona es fácil, esta se ha extendido por todo el mundo y muchas veces generan brotes epidémicos, constituyendo una amenaza para la evolución favorable de las infecciones, tanto hospitalarias como adquiridas en la comunidad (77). Se detectan con mayor frecuencia en pacientes a los que se ha administrado antibióticos durante largos periodos de tiempo, con estancia en unidades de cuidados intensivos, servicios de neonatología, sometidos a cirugías, ventilación mecánica, con hospitalización prolongada, con enfermedades graves, y que hayan recibido previamente cefalosporinas o quinolonas, con instrumentación o cateterización invasora asociado a algún grado de inmunosupresión (77).

---

**Tabla 3. Factores de riesgo para colonización por enterobacterias BLEE**

---

Catéter arterial
Catéter venoso central
Tubo de gastrostomía o yeyunostomía
Catéter urinario
Vivir en casas de cuidado crónico o asilo de ancianos
Bajo peso al nacimiento
Cirugía abdominal
Tratamiento previo con ceftazidima o aztreonam
Enfermedad grave
Ventilación asistida
Estancia prolongada en Unidades de Cuidados Intensivos
Estancia hospitalaria prolongada

---

Tomado de: Alpuche Acm y col. Infecciones nosocomiales por bacterias gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 21(2):77-82

La presencia de bacterias productoras de BLEE se relaciona con la distribución horizontal que tienen las bacterias y con factores condicionantes como:

1. Presión selectiva: por el uso de fármacos como cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona) que se ha descrito como uno de los factores de riesgo más importantes para la aparición de cepas productoras de BLEE, característica en la que coinciden la gran mayoría de investigadores en este campo (78).

2. Monoterapias antibióticas: el uso de ceftazidima en procesos infecciosos como fármaco de primera elección parece ser un factor de alto riesgo para el desarrollo de aislados productores de BLEE al igual que el uso de ceftriaxona y aztreonam (78).
3. Estadía hospitalaria prolongada: en los servicios de Oncología, Unidad de Quemados, Neonatología, Unidad de Cuidados Intensivos, en los cuales es más fácil la adquisición de este tipo de bacterias (78).
4. Procesos invasivos: siendo los más asociados la cateterización urinaria y cateterización nasogástrica, pues el tracto gastrointestinal y urinario son los reservorios más comunes para enterobacterias productoras de BLEE (78).
5. Incumplimiento de normas de bioseguridad: el personal de salud es el vehículo primordial para la transmisión bacteriana, al no realizar la desinfección de manos y material de trabajo (78).

## CAPITULO III

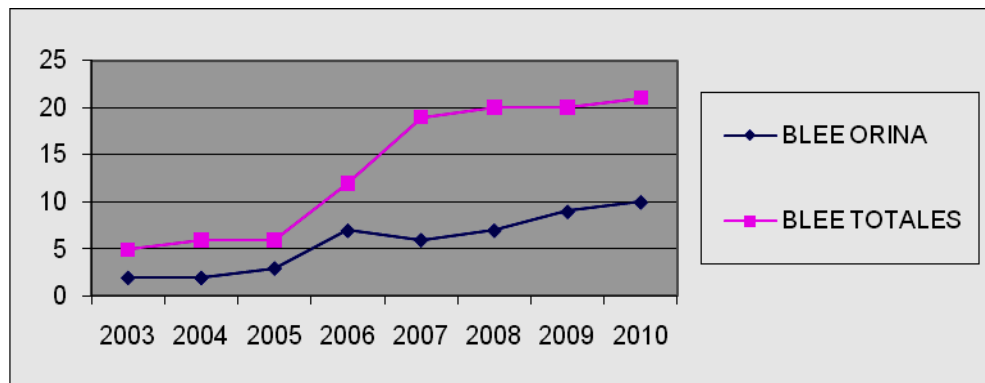
### METODOLOGÍA

#### *Justificación*

La resistencia bacteriana a antibióticos betalactámicos, en especial cefalosporinas de tercera generación en infecciones hospitalarias ha sido reconocida como un problema de salud pública debido a las implicaciones económicas y terapéuticas que conduce a una mala respuesta al tratamiento, agotamiento del arsenal terapéutico, altos costos hospitalarios, y marcada morbimortalidad al presentarse complicaciones de difícil manejo en infecciones hospitalarias. Los pacientes con infecciones graves por una bacteria productora de BLEE tienen mal pronóstico, con una mortalidad elevada, superior al 30% y siendo en algunas series hasta del 100% (79). Mark Melzer e Irene Petersen, reportan que la mortalidad después de una infección sistémica causada por *E. coli* productora de BLEE fue significativamente mayor en relación a una infección sistémica por *E. coli* no productora de BLEE (80). Estos hallazgos tienen implicaciones serias para la prescripción de antibióticos.

Sin embargo, otros estudios demuestran datos distintos referentes a mortalidad. Así, el estudio de Menashe y colaboradores en Israel (81) demostraron una mortalidad del 50% en infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE, frente al 34% en bacterias no productoras de BLEE con una  $p > 0.005$ , concluyendo que la mortalidad de los pacientes con infección por bacterias productoras de BLEE no parecen tener un mayor índice de mortalidad en comparación con infección por bacterias no productoras de BLEE.

En Ecuador, la prevalencia reportada en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE en procesos infecciosos en los hospitales de la ciudad de Quito fue del 37,2% durante el año 2003 (78) mostrando una tendencia creciente. Según los datos obtenidos de la Red de Vigilancia de Resistencia Bacteriana Ecuador (REDNARBEC) ([www.rednarbec.org](http://www.rednarbec.org)), se conoce que la producción de BLEE en *E.coli* procedente del tracto urinario se ha elevado del 2% en el año 2003 al 10 % en el año 2010 y en *E coli* no procedente del tracto urinario, los datos arrojados son, un aumento del 5% en el año 2003 al 21% en al año 2010.



**Figura 4.** Presencia de *E.coli* productoras de BLEE en aislamientos de tracto urinario, desde el año 2003 al 2010. Modificado por Diana Muñoz. Figura original disponible en de la Red de Vigilancia de Resistencia Bacteriana Ecuador (REDNARBEC) ([www.rednarbec.org](http://www.rednarbec.org))

La prevalencia reportada en poblaciones similares a la nuestra es elevada, en aislamientos de pacientes hospitalizados en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza (HNAL), Lima – Perú la prevalencia de aislamientos con fenotipo BLEE fue del 63 % para *Escherichia coli* y 71,3% para *Klebsiella spp* (82). Las BLEE, son consideradas como marcadores clínicos importantes que sugieren la posibilidad de aumento en la

tasa de morbilidad, según datos reportados en el Hospital San Jerónimo de Montería, Córdoba, Cartagena la prevalencia de BLEE es de 44% en *Klebsiella pneumoniae* y 12% en *Escherichia coli*, fue más elevada en servicios como pediatría 50%, UCI 36% y cirugía 40% (83).

Las unidades de cuidados intensivos a menudo son el epicentro de la producción de bacterias productoras de BLEE, en brotes intrahospitalarios más del 40% de todos los organismos aislados productores de BLEE fueron de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (84). Epidemias de infección por bacterias productoras de BLEE, fuera de las unidades de cuidados también han sido bien documentadas (86). Incluyen servicios como Neurocirugía (86), Unidades de quemados (86), Nefrología (87), Obstetricia y Ginecología (88), Hematología y Oncología (89), y Unidades geriátricas (90). Los hogares de ancianos y centros de atención crónica también puede ser un foco de infecciones por microorganismos productores de BLEE. En estos sitios, la propagación clonal también ha sido documentada (91).

El advenimiento de bacterias productoras de BLEE constituye una amenaza muy grave para pacientes hospitalizados con o sin infección nosocomial pues las alternativas terapéuticas son limitadas, estas se reducen básicamente a carbapenems, betalactámicos adheridos a una molécula inhibidora de betalactamasas, y tigeciclina, considerando que se inicie antibioticoterapia dirigida la tasa de morbilidad en este grupo de pacientes es mayor (92). Aun más grave, y que lamentablemente es algo común en nuestros hospitales es el no detectar la presencia de una infección desarrollada por este tipo de bacterias, sin explicarse el deterioro hemodinámico, fallo

mutiorgánico, shock séptico refractario y muerte. Por tanto es urgente contar con información real y actualizada acerca de la resistencia bacteriana para una conducta terapéutica racional y acertada en el manejo de infecciones por enterobacterias en pacientes hospitalizados.

### ***Problema***

El uso irracional de antibióticos de amplio espectro, sobre todo cefalosporinas de tercera generación en infecciones en pacientes hospitalizados ha producido un incremento considerable en la incidencia de enterobacterias productoras de BLEE, condicionando un incremento en la estancia hospitalaria, costos, agotamiento de posibilidades terapéuticas y complicaciones potencialmente mortales por lo que se plantea la necesidad de conocer la variabilidad fenotípica, incluyendo el perfil de resistencia en enterobacterias y caracterización de genes codificadores de BLEE circulando en el medio hospitalario.

Por tanto se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es la variabilidad genotípica en enterobacterias productoras de BLEE en aislados clínicos de pacientes hospitalizados de nueve centros hospitalarios de tercer nivel de la ciudad de Quito durante el periodo mayo 2008 a mayo 2009?

## ***Objetivos***

### ***Objetivo General:***

Determinación de la variabilidad genotípica en enterobacterias productoras de BLEE en aislados bacterianos de pacientes hospitalizados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### ***Objetivos Específicos***

1. Determinar la producción fenotípica de BLEE en aislados clínicos de pacientes hospitalizados mediante la prueba de difusión con disco.
2. Determinar la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en aislados clínicos de pacientes hospitalizados.
3. Describir la frecuencia de BLEE de acuerdo a género y especie bacteriana en la población de estudio durante mayo 2009 a diciembre 2009.
4. Describir la correlación multivarial entre enterobacterias productoras de BLEE con género del paciente, grupos de edad, centros hospitalarios, origen de la muestra, determinado si existen diferencias estadísticamente significativas mediante la aplicación de pruebas estadísticas.
5. Determinar la presencia o ausencia de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, y *bla*<sub>PER</sub> mediante iniciadores específicos a través de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

6. Describir la correlación multivariar entre enterobacterias que codifican los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, y *bla*<sub>PER</sub> con género y especie bacteriana, determinando si existen diferencias estadísticamente significativas.

### ***Diseño***

Se realizó un estudio descriptivo transversal observacional retrospectivo de periodo intencionado.

### ***Universo***

El universo fue 2.693 aislados clínicos, de los cuales 820 aislados bacterianos cumplieron criterios de inclusión, los cuales fueron facilitados a través de la Red Nacional Vigilancia de Resistencia Bacteriana - Ecuador (REDNARBEC) obtenida de los Laboratorios Clínicos de los Hospitales participantes en la ciudad de Quito:

1. Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM)
2. Hospital de la Policía Nacional (HPN)
3. Hospital Enrique Garcés (HEG)
4. Hospital de las Fuerzas Armadas (HG1)
5. Hospital Pablo Arturo Suarez (HPAS)
6. Hospital Pediátrico Baca Ortiz. (HBO)
7. Hospital SOLCA Núcleo Quito (SNQ)
8. Hospital Vozandes de Quito (HVZ)
9. Maternidad Isidro Ayora (MIA)

## ***Muestra***

La recolección de las muestras inició en el mes de mayo del 2009 con una duración aproximada de 3 meses, cada semana el laboratorio de microbiología de cada uno de los hospitales participantes reservó los cultivos donde se identificó enterobacterias para que éstos fueran retirados para el presente estudio. Se destino un día de la semana para el retiro de muestras de cada hospital, se verificó en cada laboratorio de origen: el buen estado de cajas de Petri, identificación completa de cada muestra que incluyó: número de cultivo, origen de la muestra, nombre del paciente, edad del paciente y servicio al que perteneció el paciente. Se transportó las cajas de Petri al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador donde se realizó el procesamiento de las muestras, éstas se sometieron a una nueva codificación y confirmación de los datos del paciente. Con el listado completo de las muestras se estableció el cumplimiento de criterios de inclusión o exclusión, se completo una muestra de 820 aislados bacterianos, no se realizo aleatorización de las muestras.

### ***Criterios de inclusión:***

Aislados bacterianos identificados como enterobacterias en el laboratorio de microbiología de origen pertenecientes a pacientes hospitalizados en los diferentes servicios de los hospitales pertenecientes a la Red Nacional de Resistencia Bacteriana – Ecuador (REDNARBEC).

### ***Criterios de exclusión:***

1. Aislados bacterianos provenientes de pacientes atendidos en consulta externa y/o urgencias.
2. Aislados bacterianos de pacientes pertenecientes a centros hospitalarios que no forman parte de la Red Nacional de Resistencia Bacteriana (REDNARBEC).
3. Aislados bacterianos no pertenecientes al grupo de Enterobacterias.
4. Aislados bacterianos en los cuales no se disponga de información acerca del origen de la muestra (comunitario u hospitalario)
5. Aislados bacterianos que se encuentren contaminados con 2 o más bacterias que dificulten el aislamiento de la enterobacteria.

### ***Variables***

**Tabla 4. Operacionalización de Variables**

<b>Variables</b>	<b>Definición Conceptual</b>	<b>Definición Operacional</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Categoría / Escala</b>	<b>Indicador</b>
<b>Edad</b>	Años cumplidos	Años cumplidos para establecer grupos de edad	Cuantitativa	<b>1.</b> 0-28 días <b>2.</b> 29 días- 2 años <b>3.</b> 3-5 años <b>4.</b> 6 -10 año <b>5.</b> 11-20 años <b>6.</b> 21-60 años <b>7.</b> 61 o más años	Media Moda Desviación estándar Frecuencias absolutas Porcentajes

<b>Género</b>	Fenotipo expresado en función de las características sexuales	Fenotipo definido para establecer categorías	Cualitativa	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Femenino</li> <li>2. Masculino</li> </ol>	Proporción Frecuencia absoluta Porcentaje
<b>Servicio</b>	Servicio clínico o quirúrgico del hospital, del cual se tomó la muestra.	Servicio hospitalario para definir grupos de análisis de datos	Cualitativa	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cardiología</li> <li>2. Cirugía General</li> <li>3. Cirugía Plástica</li> <li>4. Cirugía Vascular</li> <li>5. Endocrinología</li> <li>6. Gineco-Obstet.</li> <li>7. Hematología</li> <li>8. Hospitalización</li> <li>9. Infectología</li> <li>10. Medicina Int.</li> <li>11. Nefrología</li> <li>12. Neonatología</li> <li>13. Neumología</li> <li>14. Neurocirugía</li> <li>15. Neurología</li> <li>16. Oncología</li> <li>17. Pediatría</li> <li>18. Unidad de Q.</li> <li>19. Traumatología</li> <li>20. UCI</li> <li>21. Urología</li> </ol>	Proporción Frecuencia absoluta Porcentaje
<b>Hospital de toma de la muestra</b>	Institución hospitalaria de donde proviene la muestra	Institución hospitalaria definida para análisis de datos	Cualitativa	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hospital Carlos Andrade Marín</li> <li>2. Hospital de las Fuerzas Armadas</li> <li>3. Hospital Vozandes de Quito</li> <li>4. Hospital SOLCA Núcleo Quito</li> <li>5. Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora</li> </ol>	Proporción Frecuencia absoluta Porcentaje

					6. Hospital Pablo Arturo Suarez	
					7. Hospital Enrique Garcés	
					8. Hospital de la Policía Nacional	
					9. Hospital Pediátrico Baca Ortiz.	
<b>Origen de la muestra</b>	Lugar del cuerpo y característica del fluido o muestra celular a partir del cual se identifica la enterobacteria.	Origen de la muestra en donde se identifico la enterobacteria.	Cualitativa		1. Escara/Úlcera 2. Espujo 3. Herida quirúrgica 4. Hisopado rectal 5. Hueso 6. Líquido sinovial 7. Muestras abdominales 8. Orina 9. Prótesis infectada 10. Punta catéter 11. Sangre 12. Secreción/ Lavado bronquial 13. Secreción urogenital	Proporción Frecuencia absoluta Porcentaje
<b>Identificación de la enterobacteria</b>	Identificación bioquímica del tipo de enterobacteria a partir de la muestra biológica	Bacteria identificada mediante pruebas bioquímicas	Cualitativa		1. <i>Citrobacter diversus</i> 2. <i>Citrobacter freudii</i> 3. <i>Enterobacter aerogenes</i> 4. <i>Enterobacter cloacae</i> 5. <i>Escherichia coli</i> 6. <i>Hafnia alvei</i> 7. <i>Klebsiella oxytoca</i> 8. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proporción Frecuencia absoluta Porcentaje

- 9. *Morganella morganii*
- 10. *Proteus mirabilis*
- 11. *Proteus vulgaris*
- 12. *Serratia marcescens*
- 13. *Serratia liquefacien*

<b>Aislado productor de BLEE positivo/negativo</b>	Aislado productor de BLEE positivo/negativo para prueba confirmatoria según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).	Aislado positivo prueba confirmatoria.	BLEE según	Cualitativa	1. Si 2. No	Proporción Frecuencia absoluta Porcentaje
<b>Gen identificado</b>	Gen identificado en cepas confirmadas como productoras de BLEE mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Gen identificado mediante biología molecular		Cualitativa	1. <i>bla<sub>TEM</sub></i> 2. <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> 3. <i>bla<sub>SHV</sub></i> 4. <i>bla<sub>PER</sub></i>	Proporción Frecuencia absoluta Porcentaje

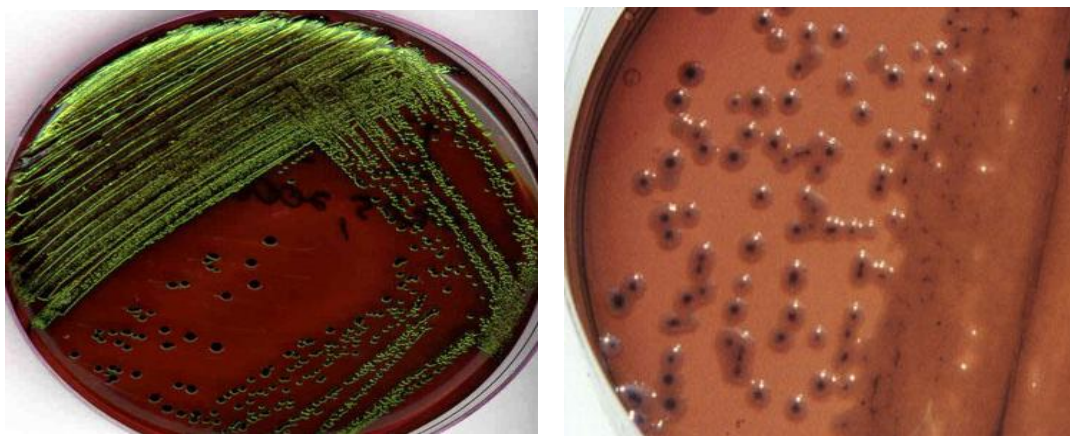
### ***Análisis de Datos:***

Los datos obtenidos fueron tabulados en una hoja de cálculo de MS Excel ver 2007, para luego ser exportados SPSS ver19.0 (*Statistical Package for the Social Sciences, Chicago – IL*). Se realizó un análisis univariado y multivariado mediante la medición de proporciones, frecuencias, porcentajes y determinación de diferencias significativas con pruebas estadísticas.

### ***Procedimientos de recolección de Información:***

Las muestras incluidas en el estudio, de acuerdo al cumplimiento de criterios de inclusión fueron sometidas a una nueva codificación, asignándoles un código de investigación de acuerdo al hospital de origen, se construyó una base de datos utilizando una matriz de recolección de información (disponible en: Anexo 1). La base de datos mencionada fue parte del proyecto de investigación “CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS” aceptado por la Facultad de Medicina (Código del proyecto G13122) y dirigido por la Dra. Jeannete Zurita. El procesamiento y desarrollo completo del estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

El procesamiento de los aislados bacterianos inició con el aislamiento de colonias de enterobacterias de la caja de Petri de origen a una nueva caja de Petri con agar EMB (eosina azul de metileno) para realizar la identificación fenotípica del género y especie bacteriana mediante pruebas bioquímicas.



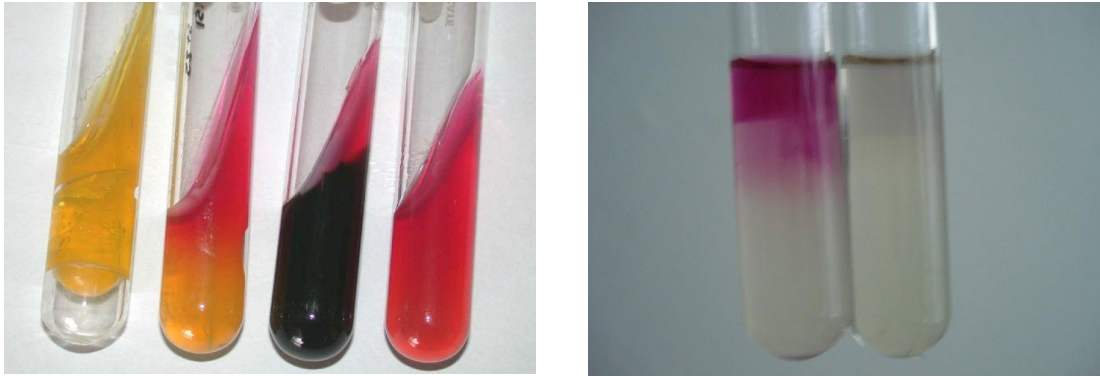
---

**Figura 5. Aislamientos de colonias de enterobacterias en agar EMB.** De izquierda a derecha, colonias de *Escherichia coli* pertenecientes a la muestra del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM-167), y colonias de *Klebsiella pneumoniae* de la muestra del Hospital Vozandez (HVZ-59). Tomadas durante el desarrollo del estudio, el 7/06/2009, por Diana Muñoz, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

---

### ***Procedimientos Diagnósticos:***

***Confirmación fenotípica del género y la especie bacteriana:*** La confirmación fenotípica del género y la especie de los aislados se llevó a cabo mediante medios de cultivo diferenciales estándar con la guía del Manual de Microbiología, Alcocer Iliana. Manual, Laboratorio de Microbiología. Quito, Ecuador. 2010 (93). Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: Citrato de Simmons, TSI (*Triple sugar iron*), MILI (*Motility, Indol, Lysine*), Lisina Descarboxilasa, Urea, Fenilalanina y el indicador de pH mediante el caldo de Rojo de Metilo (*Methyl Red*). Se conformó una bacterioteca con 2.963 aislamientos. Se procedió a guardar de dos maneras: 1) Una siembra en agar nutriente pico de flauta a temperatura ambiente mientras duró el estudio y 2) en glicerol estéril al 30%, alícuotas de 1,5 mL en tubos Eppendorf estériles, en 2 copias, para ser congeladas, una copia a - 20° C y otra a - 85° C.



**Figura 6. Confirmación fenotípica del género y la especie bacteriana mediante pruebas bioquímicas.** De izquierda a derecha, TSI (Triple sugar iron) (A/A), (K/A), (K/A+ H<sub>2</sub>S) y Rojo de Metilo, prueba positiva, tubo control. Tomadas durante el desarrollo del estudio, el 17/09/2009, por Diana Muñoz, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

---

#### *Determinación de la producción de betalactamasas de espectro*

*extendido (BLEE):* Para determinar la producción de BLEE y para el análisis de la susceptibilidad a antimicrobianos se utilizó el método de difusión con disco en agar Müeller-Hinton, según lo descrito por Bauer et al. (1966) y siguiendo las recomendaciones y criterios de interpretación propuestos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute- 2009 (CLSI)*. Se determinó resistencia a los siguientes antibióticos:

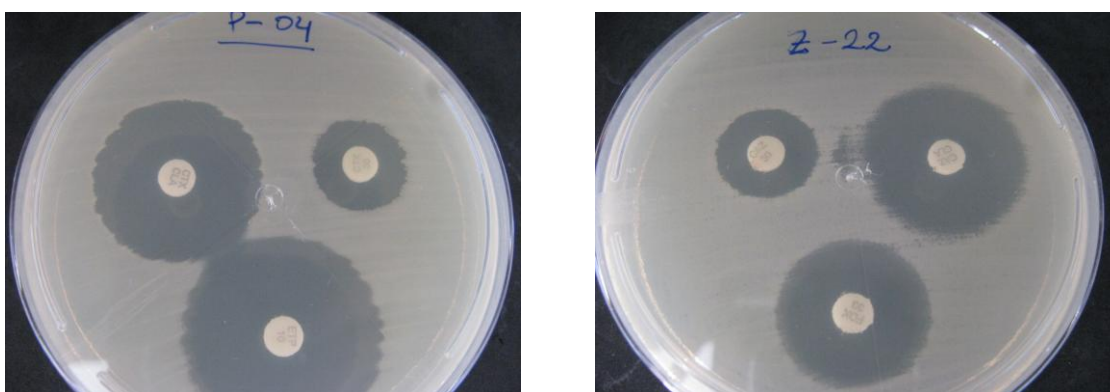
1. Amoxicilina/Ácido clavulánico (AMC) 20/10µg
2. Ceftazidima (CAZ), 30 µg
3. Cefotaxima (CTX), 30 µg
4. Imipenem (IPM) 10 µg
5. Meropenem (MEM) 10µg

A partir de los aislados conservados a - 20° C, se obtuvo colonias aisladas en agar nutriente incubadas a 37° C por 24 horas. Luego de este tiempo, de 3 a 5 colonias fueron transferidas a caldo Müeller-Hinton hasta obtener una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland, verificada en un turbidímetro Baxter (MicroScan®), para obtener un inóculo de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. La suspensión bacteriana se sembró, con un hisopo estéril, en la superficie de una caja de Petri 8.5mm de diámetro desechable conteniendo agar Müeller-Hinton (4mm de grosor y pH 7.2 – 7.4). Este proceso se realizó dentro de los primeros 15 minutos después de ajustado el inóculo. La suspensión fue sembrada en 3 planos rotando la placa 60°, para asegurar una completa distribución del inóculo según los lineamientos del CLSI - 2009. Los discos de antibióticos se colocaron en la superficie del agar, con ayuda de una pinza estéril. Las placas de Petri se incubaron a 37° C por 18-24 horas, para posterior lectura. Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos, en milímetros, definieron el carácter sensible o resistente del aislado según CLSI – 2009 (94).

***Confirmación de aislados productores de BLEE mediante fenotipo:*** Los aislados bacterianos que mostraron halos de resistencia para ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) fueron sometidos a confirmación de la producción de BLEE mediante el método de difusión con disco propuesto por el CLSI - 2009, mediante el empleo de discos de:

1. Ceftazidima (CAZ) 30µg
2. Ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CL) 30/10µg
3. Cefotaxima (CTX) 30µg
4. Cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CL) 30/10µg

Los aislados que presentaron un halo de inhibición de la cefalosporina de tercera generación en combinación con ácido/clavulánico de 5 mm o más se consideraron como positivos para la producción de BLEE. Además se probó la sensibilidad para cefoxitina (FOX) 30 $\mu$ g y ertapenem (ETP) 10 $\mu$ g. Estos dos últimos para detección de betalactamasas tipo AmpC y carbapenemasas.



**Figura 7. Fenotipo BLEE mediante método de difusión con disco.** De izquierda a derecha, aislado bacteriano (Hospital Policía Nacional- HPN-004) con halo de inhibición para Cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CL) de más de 5mm. y aislado bacteriano (Hospital Vozandes- HVZ-022) con halo de inhibición para Ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CL) de más de 5mm. Aislados bacterianos considerados como positivos para la producción de BLEE. Tomada durante el desarrollo del estudio, el 12/03/2010, por Diana Muñoz, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

---

**Extracción del ADN total bacteriano:** La extracción del ADN se realizó en los aislamientos con fenotipo BLEE mediante el protocolo de lisis: (95)

1. Cada aislado será inoculado en 5mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco®) por 24 horas a 37° C.

2. Se transferirán 1,5 mL a microtubos estériles, se centrifugará por un minuto a máxima velocidad (14.000 RPM).
3. Una vez desechado el sobrenadante se lavará una vez con 1 mL de Tris – EDTA (Tris 50mM + EDTA 20mM, pH8), se volverá a centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad (14.000 RPM).
4. Se descartará el sobrenadante y se resuspenderá el pellet en 400  $\mu$ L de Tris – EDTA (Tris 50mM + EDTA 20mM, pH8); se añadirá: 50  $\mu$ L de SDS- Solución de dodecilsulfato de sodio (al 10%), 10  $\mu$ L de lisozima (a 5 mg/mL) y 5  $\mu$ L de proterinasa K (a 20mg/mL), y se dejará incubar a 37 ° C por 1 hora.
5. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se centrifugará 2 minutos a máxima velocidad (14.000 RPM).
6. Se recolectará el sobrenadante en nuevos microtubos estériles y se mezclará con pipeta 5-10 veces para quebrar proteínas.
7. A esto se adicionará: 23,25  $\mu$ L de cloruro de Sodio y 46,5  $\mu$ L de solución de acetato de sodio y se deja incubar por 1 hora a 4° C.
8. Posteriormente se centrifugará 15 minutos a máxima velocidad (14 .000 RPM), a esto se adiciona 660  $\mu$ L (2 volúmenes) de etanol al 100% helado y se dejará reposar de 10-15 minutos.
9. Los tubos con la solución se centrifugarán por 15 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante será descartado.

10. Se dejará secar en cabina de flujo laminar y se re suspenderá el ADN con 200  $\mu$ L de buffer Tris-EDTA (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 7,5).
11. El ADN se almacenará a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.
12. Se visualizará el ADN extraído mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Se conformó una ADNteca para mantener el ADN extraído en condiciones óptimas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la detección de la presencia de los genes: *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>PER</sub> codificadores de BLEE mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando iniciadores específicos.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genotipos: *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>PER</sub> con una reacción inicial de 12,5  $\mu$ L de Master Mix (Promega ®), 0,5  $\mu$ L de cada iniciador (Invitrogen ®), 1  $\mu$ L de ADN y 8,5  $\mu$ L agua libre de nucleasas, este mix se modificó en mínimas cantidades de acuerdo a la visualización de las bandas:

1. La reacción para los genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>PER</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en: *Klebsiella pneumoniae* se preparó en un volumen final de 25  $\mu$ L, conteniendo 2  $\mu$ L de ADN, 12,5  $\mu$ L de GoTaq® Green Supermix 2X y 0,5  $\mu$ L de cada iniciador; y 9,5  $\mu$ L de agua grado molecular.

2. La reacción para los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>PER</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>* en: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, y *Citrobacter diversus* se preparó en un volumen final de 25 µL, conteniendo 3 µL de ADN, 12,5 µL de GoTaq® Green Supermix 2X y 0,5 µL de cada iniciador, y 8,5 µL de agua grado molecular.

Todos los productos utilizados con excepción de los iniciadores o primers fueron manufacturados por Promega ®. Los primers fueron de la marca Integrated DNA Technologies®. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador LabNet modelo MultiGen.

El programa de PCR para *Klebsiella pneumoniae* consistió en un paso de denaturación inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos: denaturación a 94° C por 30 segundos, anillamiento a 54° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 30 segundos, seguidos de un paso de extensión final de 72° C por 10 minutos.

El programa de PCR para *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, y *Citrobacter diversus* consistió en un paso de denaturación inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos: denaturación a 94° C por 30 segundos, anillamiento a 54° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 30 segundos, seguidos de un paso de extensión final de 72° C por 10 minutos.

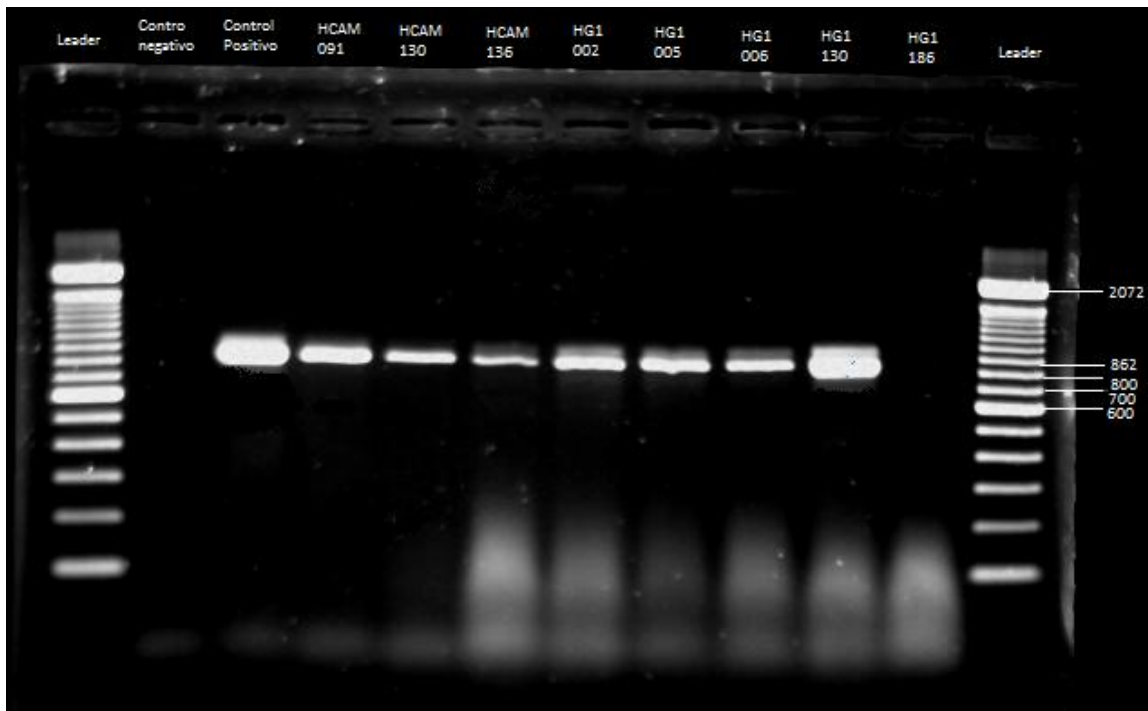
---

**Tabla.5 Primers utilizados en la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

<b>Primers</b>	<b>Secuencia de Primers</b>	<b>Blanco</b>	<b>Referencia</b>
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> F	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	(96)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> R	CCA ATG CTT AAT CAG TAG GG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	(96)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> F	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	(96)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> R	ACC AGA AYV AGC GGB GC	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	(96)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> F	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	(96)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> R	AGC GTT GCC AGT GCT CGA TC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	(96)
<i>Bla</i> <sub>PER</sub> F	TGTGTTTCACCGCTTCTGCTCTG	<i>bla</i> <sub>PER</sub>	(97)
<i>Bla</i> <sub>PER</sub> R	CAGCTCAAACCTGATAAGCCGCTTG	<i>bla</i> <sub>PER</sub>	(97)

---

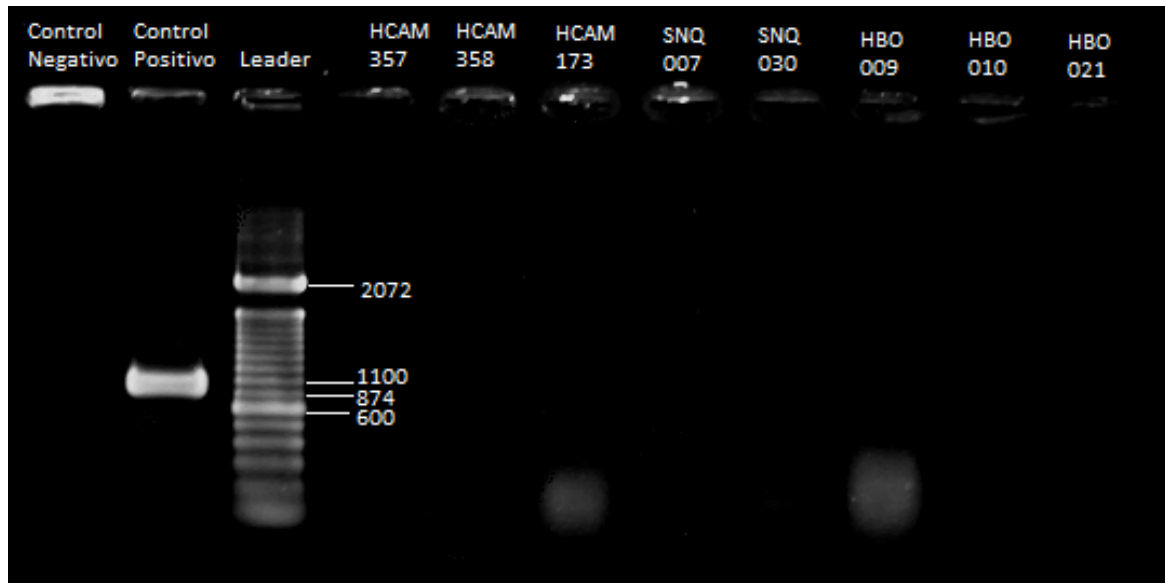
Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TEB (0.089M tris-ClNa, 0.089M ácido bórico, 0.002M EDTA) en un voltaje constante de 125v por 35min. Se empleó como marcador molecular ADN de 100pb (Invitrogen).



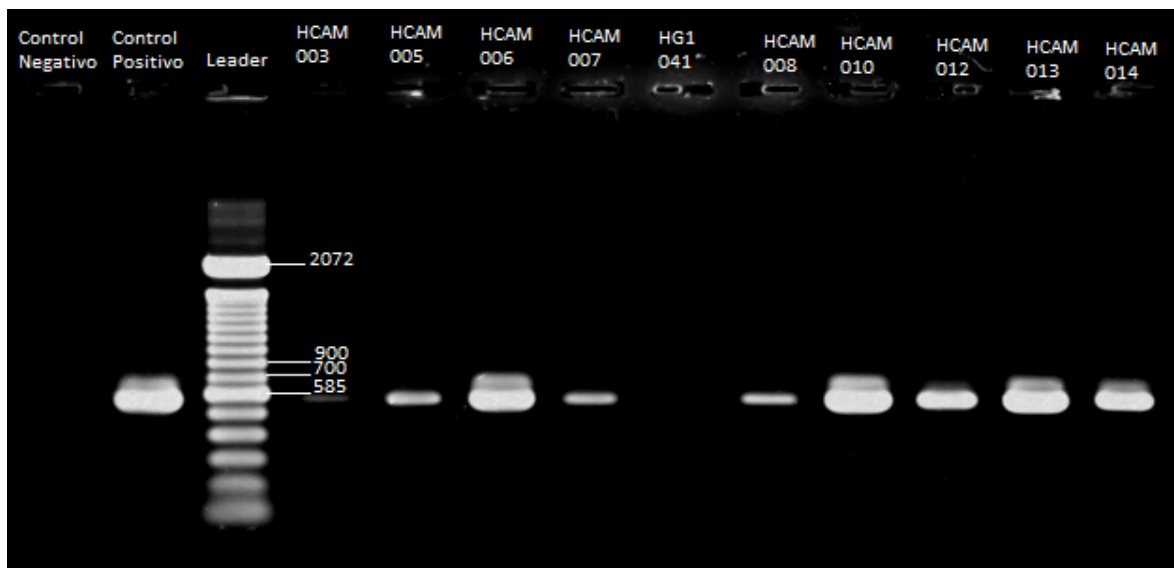
**Figura 8. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen *bla*<sub>SHV</sub>.** Leader: marcador molecular, HCAM: Hospital Carlos Andrade Marín, HG1: Hospital General Fuerzas Armadas N.1. Peso molecular del gen *bla*<sub>SHV</sub>: 862 pb. Tomada durante el desarrollo del estudio, en Safe Imager (Invitrogen) el 10/02/2011, por Diana Muñoz, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

---

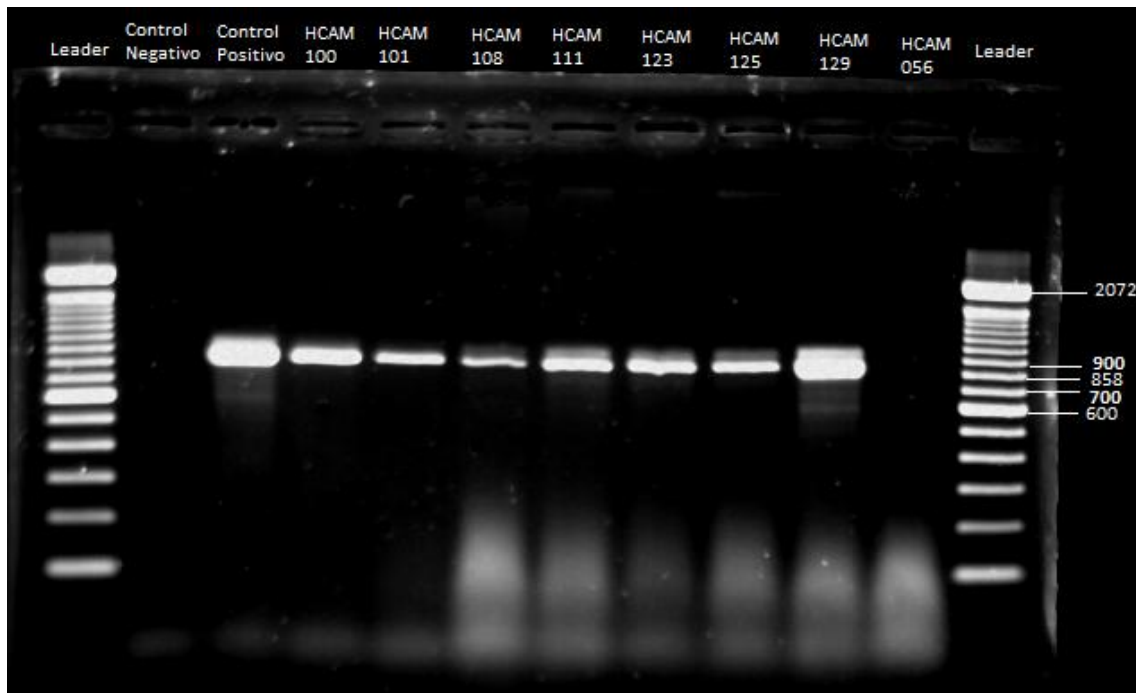
Los gels fueron teñidos empleando syber gold 10.000x (PROMEGA). Los productos de amplificación se analizaron en Safe Imager (Invitrogen) por examen visual considerando todas las bandas visibles, independientemente de su intensidad.



**Figura 9. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen *bla*<sub>PER</sub>.** Leader: marcador molecular, HCAM: Hospital Carlos Andrade Marín, SNQ: Hospital SOLCA Núcleo Quito. HBO: Hospital Baca Ortiz. Peso molecular del gen *bla*<sub>PER</sub>: 874 pb. Tomada durante el desarrollo del estudio, en Safe Imager (Invitrogen) el 20/02/2011, por Diana Muñoz, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.



**Figura 10. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>.** Leader: marcador molecular, HCAM: Hospital Carlos Andrade Marín, HG1: Hospital General Fuerzas Armadas N.1. Peso molecular del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>: 585 pb. Tomada durante el desarrollo del estudio, en Safe Imager (Invitrogen) el 10/02/2011, por Diana Muñoz, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.



**Figura 11. Gel representativo de electroforesis de los amplicones del gen *bla*<sub>TEM</sub>.** Leader: marcador molecular, HCAM: Hospital Carlos Andrade Marín. Peso molecular del gen *bla*<sub>TEM</sub>: 858 pb. Tomada durante el desarrollo del estudio, en Safe Imager (Invitrogen) el 10/02/2011, por Diana Muñoz, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

---

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

Se incluyeron 2.693 aislados bacterianos provenientes de muestras clínicas, de los cuales 820 aislados correspondieron a pacientes hospitalizados que cumplieron criterios de inclusión, en donde se identificó a las siguientes enterobacterias mediante pruebas bioquímicas estándar: *Escherichia coli* en un 69,8% (572 aislamientos), *Klebsiella pneumoniae* en un 15,5% (127 aislamientos), *Klebsiella oxytoca* en un 3,8% (31 aislamientos), *Enterobacter cloacae* en un 3,3% (27 aislamientos), *Proteus mirabilis* en un 2,4% (20 aislamientos), *Citrobacter freundii* en un 1,2% (10 aislamientos), *Enterobacter aerogenes* en un 1,5% (12 aislamientos), *Proteus vulgaris* en un 0,6% (5 aislamientos), *Serratia marcescens* en un 0,7% (6 aislamientos), *Morganella morganii* en un 0,9% (7 aislamientos), *Citrobacter diversus* en un 0,1% (1 aislamiento), *Hafnia alvei* en un 0,1% (1 aislamiento), y *Citrobacter koseri* en un 0,1% (1 aislamiento).

**Tabla.6 Relación: aislados bacterianos con fenotipo BLEE negativos/positivos en la población de estudio**

	Frecuencia	Porcentaje
Aislados fenotipo BLEE negativos	595	72,6
Aislados fenotipo BLEE positivos	225	27,4
<b>Total población de estudio</b>	<b>820</b>	<b>100</b>

**Tabla 7. Enterobacterias identificadas en la población de estudio independientemente del perfil de sensibilidad antibiótica**

<b>Enteribacteria identificada</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Escherichia coli</i>	572	69,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	127	15,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	31	3,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	27	3,3
<i>Proteus mirabilis</i>	20	2,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12	1,5
<i>Citrobacter freundii</i>	10	1,2
<i>Morganella morganni</i>	7	0,9
<i>Serratia marcescens</i>	6	0,7
<i>Proteus vulgaris</i>	5	0,6
<i>Citrobacter diversus</i>	1	0,1
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0,1
<i>Hafnia alvei</i>	1	0,1
<b>Total</b>	<b>820</b>	<b>100,0</b>

Se identificaron 225 enterobacterias productoras de BLEE, lo que corresponde a una prevalencia del 27,4% de la población de estudio, mediante pruebas de difusión con disco según las recomendaciones del CLSI 2009.

De estas enterobacterias productoras de BLEE, el 62,2% (140 aislamientos) fueron *Escherichia coli*, el 27,1% (61 aislamientos) fueron *Klebsiella pneumoniae*, el 4% (9 aislamientos) fueron *Enterobacter cloacae*, el 1,8% (4 aislamientos) fueron *Klebsiella oxytoca*, el 1,3% (3 aislamientos) fueron *Enterobacter aerogenes*, el 0,9% (2 aislamientos) fueron *Citrobacter freundii*, el 0,9% (2 aislamientos) fueron *Morganella morganni*, el 0,9% (2 aislamientos) fueron *Proteus vulgaris*, el 0,4% (1 aislamiento) fue *Citrobacter diversus* y el 0,4% (1 aislamiento) fue *Hafnia alvei*.

**Tabla 8. Géneros y especies bacterianas de enterobacterias productoras y no productoras de BLEE. Análisis fenotípico\***

<b>Enterobacteria</b>		<b>Fenotipo BLEE</b>		
		<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total</b>
<i>Citrobacter</i>	Frecuencia	0	1	1
<i>diversus</i>	% en: género y especie bacteriana	0%	100%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	0%	0,4%	0,1%
	% en: total de población de estudio	0%	0,1%	0,1%
<i>Morganella</i>	Frecuencia	5	2	7
<i>morganni</i>	% en: género y especie bacteriana	71,4%	28,6%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	0,8%	0,9%	0,9%
	% en: total de población de estudio	0,6%	0,2%	0,9%
<i>Proteus mirabilis</i>	Frecuencia	20	0	20
	% en: género y especie bacteriana	100%	0%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	3,4%	0%	2,4%
	% en: total de población de estudio	2,4%	0%	2,4%
<i>Proteus vulgaris</i>	Frecuencia	3	2	5
	% en: género y especie bacteriana	60%	40%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	0,5%	0,9%	0,6%
	% en: total de población de estudio	0,4%	0,2%	0,6%
<i>Serratia</i>	Frecuencia	6	0	6
<i>marcescens</i>	% en: género y especie bacteriana	100%	0%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	1%	0%	0,7%
	% en: total de población de estudio	0,7%	0%	0,7%
<i>Citrobacter</i>	Frecuencia	8	2	10
<i>freundii</i>	% en: género y especie bacteriana	80%	20%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	1,3%	0,9%	1,2%
	% en: total de población de estudio	1,0%	0,2%	1,2%
<i>Citrobacter</i>	Frecuencia	1	0	1
<i>koseri</i>	% en: género y especie bacteriana	100%	0%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	0,2%	0%	0,1%
	% en: total de población de estudio	0,1%	0%	0,1%
<i>Enterobacter</i>	Frecuencia	9	3	12
<i>aerogenes</i>	% en: género y especie bacteriana	75%	25%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	1,5%	1,3%	1,5%
	% en: total de población de estudio	1,1%	0,4%	1,5%
<i>Enterobacter</i>	Frecuencia	18	9	27
<i>cloacae</i>	% en: género y especie bacteriana	66,7%	33,3%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	3%	4%	3,3%
	% en: total de población de estudio	2,2%	1,1%	3,3%

<i>Escherichia coli</i>	Frecuencia	432	140	572
	% en: género y especie bacteriana	75,5%	24,5%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	72,6%	62,2%	69,8%
	% en: total de población de estudio	52,7%	17,1%	69,8%
<i>Hafnia alvei</i>	Frecuencia	0	1	1
	% en: género y especie bacteriana	0%	100%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	0%	0,4%	0,1%
	% en: total de población de estudio	0%	0,1%	0,1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Frecuencia	27	4	31
	% en: género y especie bacteriana	87,1%	12,9%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	4,5%	1,8%	3,8%
	% en: total de población de estudio	3,3%	0,5%	3,8%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Frecuencia	66	61	127
	% en: género y especie bacteriana	52%	48%	100%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	11,1%	27,1%	15,5%
	% en: total de población de estudio	8%	7,4%	15,5%
<b>Total</b>	Aislamientos	<b>595</b>	<b>225</b>	<b>820</b>
	% en: género y especie bacteriana	72,6%	27,4%	100%

Pearson Chi Square 49,546 P:<0,005

\* Prueba confirmatoria de difusión con disco (disco de ceftazidima y de ceftazidima/ácido clavulánico y disco de cefotaxima y cefotaxima/ácido clavulánico) propuesto por el CLSI 2009

El número de aislamientos bacterianos que aportó cada centro, se encuentra en detalle en la tabla 8. El Hospital Enrique Garcés aportó el mayor porcentaje de los aislados confirmados como productores de BLEE: 44,1% (15 aislamientos), seguido por el Hospital Pablo Arturo Suárez: 42,2% (19 aislamientos), y por el Hospital Baca Ortiz: 35,1% (33 aislamientos). Mientras que el menor porcentaje se encontró en el Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora: 21,7% (5 aislamientos), y en el Hospital de La Policía Nacional: 10,8% (4 aislamientos).

**Tabla.9 Relación Centros Hospitalarios con fenotipo BLEE negativo/positivo.**

Centros hospitalarios	Aislamientos			
		BLEE negativos	BLEE positivos	Total
Hospital Carlos Andrade M.	Frecuencia	127	49	176
	Porcentaje	72,2%	27,8%	100%
Hospital General Fuerzas Armadas	Frecuencia	168	50	218
	Porcentaje	77,1%	22,9%	100%
Hospital SOLCA Núcleo Quito	Frecuencia	38	16	54
	Porcentaje	70,4%	29,6%	100%
Hospital Baca Ortiz	Frecuencia	61	33	94
	Porcentaje	64,9%	35,1%	100%
Hospital Vozandes	Frecuencia	105	34	139
	Porcentaje	75,5%	24,5%	100%
Hospital Isidro Ayora	Frecuencia	18	5	23
	Porcentaje	78,3%	21,7%	100%
Hospital Policía Nacional N1	Frecuencia	33	4	37
	Porcentaje	89,2%	10,8%	100%
Hospital Enrique Garcés	Frecuencia	19	15	34
	Porcentaje	55,9%	44,1%	100%
Hospital Pablo Arturo Suárez	Frecuencia	26	19	45
	Porcentaje	57,8%	42,2%	100%
<b>Total</b>	Frecuencia	<b>595</b>	<b>225</b>	<b>820</b>
	Porcentaje	72,6%	27,4%	100%
Pearson Chi-Square: 20,963 P: 0,007				

De acuerdo a servicios hospitalarios, Cirugía General fue el servicio donde se aisló con mayor frecuencia una enterobacteria productora de BLEE, en orden de frecuencia le siguieron: Hospitalización General, Medicina Interna, Urología, Traumatología y Ortopedia, Oncología y Unidad de Cuidados Intensivos. Los servicios con menor frecuencia donde se aisló enterobacterias productoras de BLEE fueron: Cardiología, Cirugía plástica, Endocrinología, y Hematología.

**Tabla 10. Relación: servicios hospitalarios con fenotipo BLEE negativo/positivo.**

		<b>Aislamientos Fenotipo BLEE</b>		
<b>Servicios hospitalarios</b>		<b>Negativos</b>	<b>Positivos</b>	<b>Total</b>
Cirugía General	Frecuencia	51	36	87
	Porcentaje	58,6%	41,4%	100%
Hospitalización General	Frecuencia	119	31	150
	Porcentaje	79,3%	20,7%	100%
UCI	Frecuencia	58	17	75
	Porcentaje	77,3%	22,7%	100%
Oncología	Frecuencia	34	17	51
	Porcentaje	66,7%	33,3%	100%
Traumatología Ortopedia	Frecuencia	32	20	52
	Porcentaje	61,5%	38,5%	100%
Urología	Frecuencia	76	21	97
	Porcentaje	78,4%	21,6%	100%
Medicina Interna	Frecuencia	45	25	70
	Porcentaje	64,3%	35,7%	100%
Pediatría	Frecuencia	65	14	79
	Porcentaje	82,3%	17,7%	100%
Neonatología	Frecuencia	7	7	14
	Porcentaje	50%	50%	100%
Neumología	Frecuencia	19	6	25
	Porcentaje	76%	24%	100%
Gineco-Obstetricia	Frecuencia	28	6	34
	Porcentaje	82,4%	17,6%	100%
Nefrología	Frecuencia	21	5	26
	Porcentaje	80,8%	19,2%	100%
Infectología	Frecuencia	7	5	12
	Porcentaje	58,3%	41,7%	100%
Cirugía Vascular	Frecuencia	3	5	8
	Porcentaje	37,5%	62,5%	100%
Unidad Quemados	Frecuencia	0	2	2
	Porcentaje	0%	100%	100%
Neurología	Frecuencia	6	2	8
	Porcentaje	75%	25%	100%
Neurocirugía	Frecuencia	2	2	4
	Porcentaje	50%	50%	100%
Cardiología	Frecuencia	2	1	3
	Porcentaje	66,7%	33,3%	100%
Hematología	Frecuencia	0	1	1
	Porcentaje	0%	100%	100%
Endocrinología	Frecuencia	4	1	5

	Porcentaje	80%	20%	100%
Cirugía plástica	Frecuencia	1	1	2
	Porcentaje	50%	50%	100%
Proctología	Frecuencia	2	0	2
	Porcentaje	100%	0%	100%
O.R.L	Frecuencia	2	0	2
	Porcentaje	100%	0%	100%
Diálisis	Frecuencia	6	0	6
	Porcentaje	100%	0%	100%
Geriatría	Frecuencia	2	0	2
	Porcentaje	100%	0%	100%
Cirugía Cardiorácica	Frecuencia	3	0	3
	Porcentaje	100%	0%	100%
<b>Total</b>	Frecuencia	<b>595</b>	<b>225</b>	<b>820</b>
	Porcentaje	72,6%	27,4%	100%
Pearson Chi-Square: 52,414 P: 0,001				

De acuerdo al origen de la muestra, la mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE se encontró en muestras de: orina, heridas quirúrgicas, sangre, muestras abdominales, y aspirado traqueal/lavado broncoalveolar. Con menor frecuencia en hisopado rectal, líquido sinovial y prótesis.

**Tabla 11. Relación: origen de la muestra con fenotipo BLEE negativo/positivo.**

Origen de la muestra		Fenotipo BLEE		Total
		Negativo	Positivo	
Orina	Frecuencia	335	105	440
	Porcentaje	76,1%	23,9%	100%
Herida Quirúrgica	Frecuencia	48	26	74
	Porcentaje	64,9%	35,1%	100%
Muestras abdominales	Frecuencia	49	20	69
	Porcentaje	71%	29%	100%
Sangre	Frecuencia	28	20	48
	Porcentaje	58,3%	41,7%	100%
Secreción/Aspirado bronquial	Frecuencia	37	17	54
	Porcentaje	68,5%	31,5%	100%

Hueso	Frecuencia	13	10	23
	Porcentaje	56,5%	43,5%	100%
Esputo	Frecuencia	33	10	43
	Porcentaje	76,7%	23,3%	100%
Escara/Úlcera	Frecuencia	6	6	12
	Porcentaje	50%	50%	100%
Secreción Urogenital	Frecuencia	18	3	21
	Porcentaje	85,7%	14,3%	100%
Punta Catéter	Frecuencia	3	3	6
	Porcentaje	50%	50%	100%
Gastrostomía	Frecuencia	0	1	1
	Porcentaje	0%	100%	100%
Heces	Frecuencia	1	1	2
	Porcentaje	50%	50%	100%
Hisopado Rectal	Frecuencia	17	1	18
	Porcentaje	94,4%	5,6%	100%
Líquido Sinovial	Frecuencia	1	1	2
	Porcentaje	50%	50%	100%
Líquido pleural	Frecuencia	1	0	1
	Porcentaje	100%	0%	100%
Prótesis infectada	Frecuencia	2	1	3
	Porcentaje	66,7%	33,3%	100%
Secreción Ocular	Frecuencia	2	0	2
	Porcentaje	100%	0%	100%
Secreción Oído	Frecuencia	1	0	1
	Porcentaje	100%	0%	100%
<b>Total</b>	Frecuencia	<b>595</b>	<b>225</b>	<b>820</b>
	Porcentaje	72,6%	27,4%	100%
Pearson Chi-Square	29,770	P:0 ,028		

Los resultados de acuerdo al género del paciente donde se aisló una enterobacteria productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), fueron: 56% en pacientes femeninas, y 44% en pacientes masculinos.

**Tabla 12. Relación: género de los pacientes con fenotipo BLEE negativo/positivo.**

Género del paciente		Aislamientos fenotipo BLEE		
		Negativo	Positivo	Total
Masculino	Frecuencia	207	99	306
	%: en total de la población de estudio	67,6%	32,4%	100,0%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	38,8%	44%	37,3%
Femenino	Frecuencia	388	126	514
	%: en total de la población de estudio	75,5%	24,5%	100,0%
	% en: total de aislados con fenotipo BLEE	65,2%	56%	62,7%
<b>Total</b>	Frecuencia	<b>595</b>	<b>225</b>	<b>820</b>
	Porcentaje	72,6%	27,4%	100,0%
Pearson Chi-Square		5,920	P:	0,015
Odds Ratio for Sexo (Masculino / Femenino)		0,679		

Por grupos de edad, la mayor frecuencia de enterobacterias con fenotipo BLEE se encontró en adultos mayores, y la menor prevalencia en neonatos y lactantes.

**Tabla 13. Resultados de acuerdo a grupos de edad de los pacientes donde se aisló enterobacterias productoras de BLEE**

Grupos de Edad		Aislamientos		
		Fenotipo BLEE		Total
		Negativo	Positivo	
1 día-28 días: Neonatos	Frecuencia	12	11	23
	Porcentaje	52,2%	47,8%	100,0%
29 días-2años: Lactantes	Frecuencia	45	12	57
	Porcentaje	78,9%	21,1%	100,0%
3 años-10 años: Prescolares/Escolares	Frecuencia	46	15	61
	Porcentaje	75,4%	24,6%	100,0%
11 años-20 años: Adolescentes	Frecuencia	41	17	58
	Porcentaje	70,7%	29,4%	100,0%
21 años-60 años: Adultos	Frecuencia	241	82	323
	Porcentaje	74,6%	25,4%	100,0%
61 años o más: Adultos mayores	Frecuencia	210	88	298
	Porcentaje	70,5%	29,5%	100,0%

<b>Total</b>	Frecuencia	<b>595</b>	<b>225</b>	<b>820</b>
	Porcentaje	72,6,7%	27,3%	100,0%
Pearson Chi-Square: 7,657				
P: 0,176				

El genotipaje se realizó en los 225 aislamientos confirmados como productores BLEE, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los resultados fueron: el gen *bla*<sub>CTX</sub> estuvo presente en 140 aislamientos confirmados como BLEE, el gen *bla*<sub>SHV</sub> estuvo presente en 104 aislamientos, el gen *bla*<sub>TEM</sub> estuvo presente en 75 aislamientos, y el gen *bla*<sub>PER</sub> no se encontró en ningún aislamiento.

**Tabla 14. Resultados de los genes encontrados en relación con género y especie bacteriana con fenotipo BLEE positivo/negativo**

Enterobacteria	Total aislamientos	Fenotipo BLEE negativo	Fenotipo BLEE positivo	Número de aislamientos productores de:			
				<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>PER</sub>
<i>Escherichia coli</i>	495	355	140	89	43	52	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	109	48	61	43	29	45	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	27	18	9	4	0	4	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	21	4	1	2	2	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12	9	3	2	0	1	0
<i>Morganella morganni</i>	7	5	2	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	5	3	2	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	10	8	2	1	1	0	0
<i>Citrobacter diversus</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	20	20	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	6	6	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>719</b>	<b>494</b>	<b>225</b>	<b>140</b>	<b>75</b>	<b>104</b>	<b>0</b>

## CAPITULO V

### DISCUSIÓN

Las betalactamasas, enzimas producidas con frecuencia en enterobacterias representan un grupo heterogéneo de enzimas con gran relevancia en el aspecto clínico, terapéutico y epidemiológico tanto en pacientes hospitalizados como comunitarios. De estas el grupo de BLEE son las que mayor relevancia clínica presentan desde su primera descripción en 1983. Se han descrito alrededor de 900 betalactamasas y de estas más de 300 corresponden a BLEE (98). Todas ellas muestran una tendencia evolutiva constante al describirse nuevas variantes en distintas áreas geográficas mediadas por mecanismos genéticos aún no conocidos completamente, explicado no solo por la capacidad propia de las células bacterianas de transformar su material genético sino también por el surgimiento de factores condicionantes relacionados con uso de cefalosporinas de amplio espectro, la estadía hospitalaria prolongada, los procesos invasivos, y el uso de quinolonas, entre otros factores (99). La identificación de enterobacterias productoras de BLEE en hospitales de la ciudad de Quito no llega a ser un proceso rutinario en todos los laboratorios de microbiología, por lo que se dispone de información limitada al respecto.

Los pacientes hospitalizados son una población especial debido a que, en general se encuentran gravemente enfermos o cursan con procesos de inmunosupresión, son sometidos a múltiples procedimientos invasivos que favorecen la diseminación endógena y cruzada de enterobacterias resistentes y multiresistentes (100). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* fueron las enterobacterias más frecuentes en los aislamientos de pacientes hospitalizados en este estudio independientemente del perfil

de sensibilidad a betalactámicos. Se determinó una prevalencia del 27,4% de enterobacterias productoras de BLEE, de estas, los fenotipos en género y especie más frecuentes fueron *Escherichia coli*, (62,2%) y *Klebsiella pneumoniae* (27,1%) respectivamente. La prevalencia reportada inicialmente en Ecuador fue del 26% para *Klebsiella pneumoniae*, y 27% para *Escherichia coli* (101), lo que indica una tendencia creciente en la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro en nuestra población. Otros reportes relacionados con las variaciones geográficas en la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE indican que *K. pneumoniae* en América Latina puede llegar a una prevalencia del 45%, seguidos por la Región del Pacífico Occidental con un 25%, Europa 23%, Estados Unidos 8% y Canadá 5% (99). Chow JW. y colaboradores en el estudio Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) reportaron que hasta el 10% de los aislados de *E. coli* eran productores de BLEE, y el 17% en *Klebsiella* spp (102). Reportes iniciales describían mayor prevalencia del fenotipo BLEE en *Klebsiella pneumoniae* que en *Escherichia coli*, y éstas se aislaban con mayor frecuencia en las unidades de cuidados intensivos, en pacientes con factores de riesgo como, cirugía reciente, sondaje urinario, hospitalización prolongada y la utilización previa de cefalosporinas y aminoglucósidos (99). Sin embargo, este panorama ha cambiado y en la actualidad la mayoría de los aislados con fenotipo BLEE expresan enzimas de tipo CTX-M dejando atrás a SHV y TEM, además se reconocen con mayor frecuencia en *E. coli* que en el resto de las enterobacterias, incluida *K. pneumoniae*, lo que se correlaciona con los resultados de este estudio.

Cirugía general fue el servicio con mayor la prevalencia de enterobacterias con fenotipo BLEE, lo que hace evidente la permanente dispersión de bacterias multiresistentes fuera de las unidades de cuidados intensivos considerados lugares

clásicos de aislamiento de enterobacterias con fenotipo BLEE (103). Los factores de riesgo para colonización por enterobacterias BLEE descritos anteriormente parecen haberse modificado y otros grupos de antibióticos, entre los que encuentran las fluoroquinolonas, podrían estar desempeñando un papel relevante en su selección (103).

El grupo de edad predominante donde se aisló enterobacterias productoras de BLEE fue el de mayores de 60 años, un hallazgo clásico en varios estudios, debido a que este grupo de edad es el que presenta gran parte de los factores de riesgo reconocidos para colonización por enterobacterias productoras BLEE (104), le sigue en frecuencia el grupo de adultos entre 20 a 60 años con una frecuencia algo menor lo que puede estar asociado a la diseminación de clones multiresistentes de enterobacterias ampliamente distribuidos en el medio hospitalario independientemente de otros factores (104). El grupo de menor frecuencia fueron los menores de 28 días, neonatos, este resultado se explica porque un solo hospital de todos los participantes en este estudio fue pediátrico lo que representa un sesgo probable para esta variable. En relación con el género de los pacientes, se encontró una diferencia significativa entre mujeres y varones. Los hallazgos en este estudio en relación con el origen de la muestra clínica son la mayor frecuencia en muestras de orina, seguido por el grupo de heridas quirúrgicas, con una frecuencia mucho menor, en concordancia con otros estudios (105).

Los centros hospitalarios muestran grandes diferencias en cuanto a la frecuencia de aislamientos con fenotipo BLEE, esto es un hecho también descrito, inclusive se han descrito importantes diferencias entre servicios hospitalarios de un mismo hospital (106). Este mismo fenómeno se puede observar en este estudio donde

los hospitales: Enrique Garcés (44,1%), Pablo Arturo Suárez (42,2%) y Baca Ortiz: (35,1%) son los que mayor porcentaje de BLEE presentan, este hallazgo puede explicarse porque estos hospitales tienen un mayor volumen de pacientes hospitalizados, los cuales ingresan y egresan de servicios considerados como reservorios de enterobacterias productoras de BLEE, por otro lado los pacientes presentan importante morbilidad, al ser éstos hospitales centros de referencia de atención de mediana a gran complejidad de todas partes del país. El personal de salud podría también estar implicado en la dispersión de enterobacterias con fenotipo BLEE al ser vehículo primordial para la transmisión de bacterias multiresistentes, al no realizar la desinfección de manos y material de trabajo.

A pesar de que el objetivo de esta tesis no fue determinar los factores de riesgo para colonización por enterobacterias productoras de BLEE, los datos encontrados en los diferentes centros hospitalarios indican que, procedimientos invasivos comunes en estos lugares, como: catéter arterial, catéter venoso central y urinario, o el tubo de gastrostomía o yeyunostomía y la ventilación mecánica, se relacionan directamente con la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE. Además, de los 9 hospitales estudiados, 8 cuentan con unidades de cuidados intensivos, constituyendo un factor de riesgo a considerar. También es trascendente señalar factores como la estancia hospitalaria prolongada, algo usual en la mayoría de los hospitales estudiados, y el uso de cefalosporinas de tercera generación como antibioticoterapia de primera línea (107).

El *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, recomienda aislamiento de contacto en pacientes con infecciones por enterobacterias productoras de BLEE (108), este aislamiento debe ser obligatorio, este hecho se comprueba al encontrarse en este estudio, que el único hospital que cumple con esta norma tiene un porcentaje de enterobacterias productoras de BLEE del 24% del frente al 44% o el 42% de los otros hospitales que no cumplen esta norma. Es evidente que el incumplimiento de esta norma es un factor determinante en la diseminación de este tipo de bacterias a través de las manos del personal de salud.

En relación a la variabilidad genotípica, varios estudios reportan la aparición de nuevas variantes de BLEE que no presentan una relación clonal, la difusión de éstas se debe a plásmidos, secuencias de inserción, transposones o integrones, por tanto se considera que uno de los aspectos más importantes para el control de la resistencia bacteriana es conocer los mecanismos de difusión e identificación de los genes causantes de la resistencia (109). Los hallazgos de este estudio fueron, que el gen *bla<sub>CTX-M</sub>* fue el más frecuente en todas las especies bacterianas confirmadas con fenotipo BLEE, revelando la potente resistencia contra cefotaxima, lo que se correlaciona con la descripción genotípica en otras regiones geográficas como Europa central y Canadá (110). Clásicamente, uno de los factores implicados en la evolución de los elementos genéticos ha sido la presión que ejerce el uso de antibióticos, aunque la descripción de estructuras idénticas o similares en hábitats salvajes, donde esa presión es prácticamente nula, o no existe (109) podría suponer otros factores implicados en la resistencia a antibióticos aun no conocidos completamente.

Los genotipos *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> le siguen en frecuencia al genotipo *bla*<sub>CTX-M</sub>, reflejando la actividad hidrolítica contra cefotaxima y ceftazidima por parte de *bla*<sub>SHV</sub>, además la capacidad de hidrolizar a ampicilina y actividad moderada contra cefalosporinas de amplio espectro por parte de *bla*<sub>TEM</sub>. Estos genotipos fueron descritos como los más frecuentes en aislados bacterianos productores de BLEE en los años 80 y 90, este patrón ha cambiado en la actualidad, y estos genotipos ha pasado a un segundo plano reflejando la constante evolución genética del las BLEE, los hallazgos en este estudio se correlacionan con los reportes sobre la frecuencia de los genotipos que codifican las BLEE en otras áreas geográficas (111).

El genotipo *bla*<sub>PER</sub>, no se encontró en ningún aislamiento productor de BLEE, este resultado es esperable hasta cierto punto, debido a que este genotipo se ha descrito en limitadas áreas geográficas: en América únicamente en Argentina y en Corea y Turquía (112). Este genotipo confiere resistencia a penicilinas, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, su actividad se inhibe por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, los resultados de este estudio reflejan que este genotipo aún no se ha disperso en nuestra población hospitalaria, aunque es probable que en nuevos estudios ya se detecte este gen en los aislados bacterianos hospitalarios.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### ***Conclusiones***

1. Las enterobacterias productoras de BLEE en los aislamientos bacterianos de pacientes hospitalizados son en mayor frecuencia *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*.
2. La prevalencia de aislados bacterianos productores de BLEE de pacientes hospitalizados encontrada en la población de estudio, fue del 27,4%.
3. El grupo etáreo que presenta mayor número de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE son los adultos mayores, probablemente, debido a que los factores de riesgo, como estancia hospitalaria prolongada, son comunes en este grupo de edad y promueven el apareamiento de estas enzimas.
4. El aislamiento de enterobacterias productoras de BLEE es clásicamente mayor en unidades de cuidados intensivos. El hecho de encontrar en este estudio mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en servicios hospitalarios tal como cirugía, sugiere la constante dispersión de bacterias multiresistentes entre los distintos servicios hospitalarios. Además procedimientos invasivos como: catéter arterial, catéter venoso central, tubo de gastrostomía o yeyunostomía, catéter urinario, entre otros, favorecen directamente la colonización por enterobacterias productoras de BLEE, hecho que es evidente al encontrar dichas bacterias en pacientes quirúrgicos, correlacionándose con los resultados de este estudio.

5. El mayor número de cultivos realizados en el laboratorio de microbiología son los urocultivos, por tanto era de esperarse que la cifra mayor de bacterias productoras de BLEE se encuentren en los aislamientos de *E. coli* urinario (46,6 %)
6. El hallazgo de cifras como 44,1% de enterobacterias productoras de BLEE en el Hospital Enrique Garcés, o 42,2% en el Hospital Pablo Arturo Suárez, reflejan una alta prevalencia en hospitales donde es común la aglomeración de pacientes evidenciando la fácil transmisión de persona a persona a través de las manos.
7. El genotipo *bla*<sub>CTX-M</sub> se manifestó como el más frecuente en enterobacterias productoras de BLEE en este estudio, revelando la potente resistencia contra cefotaxima y en menor grado contra ceftazidima.
8. Los genotipos *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> encontrados como menos frecuentes que *bla*<sub>CTX</sub>, inicialmente predominaban como codificadores de BLEE en enterobacterias. Al modificarse este hecho es evidente la constante evolución de las betalactamas por distintos mecanismos moleculares.
9. El genotipo *bla*<sub>PER</sub>, no se encontró en ningún aislamiento bacteriano productor de BLEE, este resultado se explica por la reciente descripción de este gen en enterobacterias, siendo muy diseminado en otras especies bacterianas como *Acinetobacter* spp. y en *P. aeruginosa*. Además este genotipo se ha descrito únicamente en un solo país de América, Argentina, y en otras regiones como Turquía y Corea. (112)

10. El hallazgo de enterobacterias productoras de BLEE, indica no solo resistencia a cefalosporinas de amplio espectro. Estudios recientes indican resistencia a otras familias de antibióticos como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, trimetoprim sulfametoxazol y más recientemente a carbapenémicos, lo que plantea un gran problema clínico y terapéutico debido a la escasez de alternativas terapéuticas.

### ***Recomendaciones***

Las BLEE representan un importante modelo en la evolución de las betalactamasas y un escalón más en el incremento de la resistencia a los antimicrobianos, la alta prevalencia del fenotipo BLEE con el genotipo *bla*<sub>CTX-M</sub> detectada en el estudio indica la creciente resistencia al grupo de antibióticos de mayor uso en la práctica clínica, por lo que se hace necesario:

1. Detección rutinaria de aislamientos bacterianos productores de BLEE en todos los centros hospitalarios, en todos los pacientes con procesos infecciosos independientemente de la gravedad del cuadro clínico, u origen hospitalario o comunitario del paciente.
2. Ejecución de programas de vigilancia, lo que permitiría tener un panorama claro sobre las opciones terapéuticas específicas para cada agente

bacteriano, lo cual disminuiría la estancia hospitalaria, y posibles complicaciones al iniciar antibioticoterapia específica temprana.

3. Reconsiderar el uso de monoterapias antibióticas y el uso como primera opción de cefalosporinas de amplio espectro, lo cual disminuiría la presión de selección, reconocido como el factor condicionante más importante para el surgimiento de enterobacterias productoras de BLEE.
4. Siendo evidente la fácil dispersión de enterobacterias productoras de BLEE es necesario un control riguroso del cumplimiento de las normas universales de bioseguridad en todos los centros hospitalarios.
5. El aislamiento de contacto en pacientes donde se ha detectado enterobacterias productoras de BLEE es una norma obligatoria que debe ser implementada en todos los centros hospitalarios para prevenir la dispersión de bacterias multiresistentes en la población.
6. Restringir la realización de procedimientos invasivos como: catéter arterial, catéter venoso central, tubo de gastrostomía o yeyunostomía, catéter urinario, entre otros, debido a que favorecen directamente la colonización por enterobacterias productoras de BLEE.
7. Considerar que al detectarse una enterobacteria productora de BLEE, es posible resistencia a otras familias de antibióticos como fluoroquinolonas,

aminoglucósidos, trimetoprim sulfametoxazol y carbapenémicos, por tanto las opciones terapéuticas son limitadas.

**Tabla 15. Opciones de tratamiento en infecciones por enterobacterias productoras de BLEE**

Opciones terapéuticas	Antibióticos	Consideraciones especiales
1. Carbapenémicos	Imipenem	Aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> han mostrado resistencia a ertapenem (113).
	Meropenem	
	Ertapenem	
	Panipenem	
	Doripenem	
2. Cefamicinas	Cefoxitina	Considerar pérdida de actividad por la presencia de betalactamasas tipo AmpC y porinas OmpF y OmpC (114).
	Cefmetazol	
	Cefminox	
	Cefotetan	
	Cefbuperazona	
3. Aminoglucósidos	Gentamicina	Considerar que gentamicina presenta un espectro menor de actividad contra enterobacterias productoras de BLEE (115).
	Amikacina	
	Kanamicina	
4. Quinolonas	Ciprofloxacina	Considerar asociación de resistencia de quinolonas con BLEE (116).
	Norfloxacina	
	Levofloxacina	
	Gatifloxacina	
	Moxifloxacina	
	Tigeciclina	Evidencia de actividad en casos de

5. Gliciliclinas		infecciones intraabdominales y de tejidos blandos, con el inconveniente que no aporta cobertura para <i>P. aeruginosa</i> y que alcanza bajas concentraciones en orina, por lo que no estaría indicado su uso en infecciones del tracto urinario (117).
6. Fosfonatos	Fosfomicina	Ha mostrado buenos resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> frente a infecciones del tracto urinario provocadas por <i>E. coli</i> productora de BLEE (118).

## ABREVIATURAS

1. **AMC:** Amoxicilina/Clavulánico.
2. **BHI:** Caldo infusión cerebro corazón.
3. **BLEE:** s de espectro extendido.
4. **CAZ:** Ceftazidima.
5. **CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute- 2009.
6. **CTX/CL:** Cefotaxima/Clavulánico.
7. **CTX:** Cefotaxima.
8. **EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético.
9. **EMB:** Eosina azul de metileno.
10. **ETP:** Ertapenem.
11. **FOX:** Cefoxitina.
12. **HBO:** Hospital De Niños Baca Ortiz.
13. **HCAM:** Hospital Carlos Andrade Marín.
14. **HG1:** Hospital General De Las Fuerzas Armadas No. 1.
15. **HGE:** Hospital Enrique Garcés.
16. **HPAS:** Hospital Pablo Arturo Suárez.
17. **HPN:** Hospital De La Policía Nacional.
18. **HVZ:** Hospital Vozandes.
19. **IPM:** Imipenem.
20. **MEM:** Meropenem.
21. **MIA:** Hospital Gineco-Obstétrico Isidro Ayora.
22. **MILI:** Motility, Indole, Lysine.
23. **MIO:** Motility Indol, Ornitina.

24. **PBPs:** Penicillin-binding proteins.
25. **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
26. **REDNARBEC:** Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana - Ecuador.
27. **RPM:** Revoluciones por minuto.
28. **SDS:** Solución de dodecilsulfato de sodio.
29. **SNQ:** Hospital Solón Espinosa, SOLCA-Quito.
30. **TSB:** Tryptic Soy Broth.
31. **TSI:** Triple sugar iron.
32. **UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos.
33. **UFC:** Unidades formadoras de colonias.

## GLOSARIO

- 1. ADNteca:** Lugar de almacenamiento de ADN plasmídico, cromosómico o total en condiciones apropiadas de conservación y mantenimiento de propiedades las físicas, químicas y funcionales.
- 2. Aislado clínico:** Cultivo bacteriano en condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada.
- 3. Alícuotas:** Parte de un volumen para ser usado en una prueba industrial o de laboratorio cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original.
- 4. Bacterioteca:** Lugar de almacenamiento de aislados bacterianos en condiciones apropiadas de conservación y mantenimiento de propiedades físicas, químicas y funcionales.
- 5. Electroforesis:** Técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (p. ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre).
- 6. Tubo Eppendorf:** pequeño tubo contenedor cilíndrico de plástico, con un fondo cónico y típicamente una tapa unida al cuerpo del tubo para evitar su desprendimiento. Son empleados profusamente en biología molecular y bioquímica no sólo para la centrifugación, sino se emplean a menudo como simples viales contenedores de sustancias químicas.
- 7. Fenotipo:** expresión del genotipo, las características observables de una célula bacteriana o un organismo superior.

8. **Gen:** Unidad de la información hereditaria que forma parte del ADN, es la unidad genética capaz de mutar.
9. **Genotipo:** Constitución genética precisa de una célula bacteriana o un organismo superior.
10. **Lísis:** Rotura de la membrana celular bacteriana.
11. **Mutación:** Alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo, y la cual se puede transmitir o heredar a la descendencia.
12. **PCR:** Técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN psinovial, partiendo de un mínimo o una única copia.
13. **Pellet:** Partículas sólidas acumuladas en el fondo del tubo después del centrifugado.
14. **Plásmido:** Moléculas de ADN extra cromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras.
15. **Transposones:** Secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición.

## BIBLIOGRAFIA

1. Wilfredo Hernández Pedroso, Alexander Ramos Godínez, Rafael Nodarse Hernández, Armando Padrón Sánchez, Ernesto De Armas Moreno. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). *Rev Cub de Med Int y Emerg.* 2006; 5(1):1-2
2. Abraham, E. P., and E. Chain. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 1940; 146:837
3. Ghuysen, J. M. Serine - lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 1991; 45:37–67
4. Acuña L G. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Rev Chil Infectol.* 2003; 20 (Supl.): S7-S10
5. Datta, N., and P. Kontomichalou. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature.* 1965; 208:239–244
6. Medeiros, A. A. Beta-Lactamases 1984. *Br. Med. Bull;* 40:18–27.97
7. Kliebe, C., B. A. Nies, J. F. Meyer, R. M. Tolxdorff-Neutzling, and B. Wiedemann. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28:302–307
8. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39:1211–1233
9. Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 1991; 276:269–270
10. Bush, K. and G. A. Jacoby. An updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:969-976

11. Yu WL, Chuang YC, and Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006; 39(4):264-77
12. James S. Lewis II, Monica Herrera, Brian Wickes, Jan E. Patterson, and James H. Jorgensen. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 39:1211–1233
13. Su PA, Wu LT, Cheng KC, KO WC, Chuang YC, Yu WL. Screening extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* using antibiogram-based methods. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010; 43(1):26-34
14. Hajime Kanamori, Hisakazu Yano, Yoichi Hirakata, Shiro Endo. High prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and qnr determinants in *Citrobacter* spp from Japan: dissemination of CTX-M-2. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66 (6): 1-8
15. Li Xu, Sahida Shabir, Thomas Bodah, Claire McMurray, Katie Hardy, Peter Hawkey and Kathryn Nye. Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum {beta}-lactamases among Enterobacteriaceae reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(3): 505-511
16. Franck Danel, Lucinda M. C. Hall and David M. Livermore. Laboratory mutants of OXA-10  $\beta$ -lactamase giving ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 43 (3): 339-344
17. García Rodríguez JA, García Sánchez E. Resistencias bacterianas y antibioterapia. Editorial Doyma, Madrid. 1997; 66 (5):39-50.

18. Murray Patrick R. Rosenthal Ken S. Pfaller Michael A. Bacteriología. *Enterobacteriaceae*. In: Elsevier Inc. Microbiología Médica. 6ta. Edición. Madrid, España; 2009. p. 323-38.
19. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. Introducción a la Microbiología 2007. Ed. Médica Panamericana; P. 1-2
20. Michael Madigan, John Martinko, Jack Parker. Epidemiología y Microbiología Sanitaria, Infecciones adquiridas en el hospital. Brock, Microbiología de los Microorganismos. Prentice Hall. Octava edición. 2006; P. 916-17.
21. Marín M, et al. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21(1):42-55
22. Hardman Joel G., Goodman Gilman Alfred MD., Ph.D., D.Sc. Antibiotics. Penicilins, Cefalosporins and other  $\beta$ -lactams. In: McGraw Hill Interamericana. Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. United States of America. 2001; p. 1207 – 1232.
23. Jacoby GA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- $\beta$ -lactams. Infect Dis Clin North America 1997; 11: 875-87
24. Poole K. Multidrug resistance in gram-negative bacteria. Curr Opin Microbiol 2001; 4:500-8
25. David L. Paterson, Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: A Clinical Update. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 2005, p. 657–686.
26. Bradford P. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-51

27. Lars Bogo Jensen, Henrik Hasman, Yvonne Agerso, Hanne-Dorthe Emborg and Frank M. Aarestrup. First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57 (4): 793-794
28. E. Liebana, M. Batchelor, K. L. Hopkins, F. A. Clifton-Hadley, C. J. Teale, A. Foster, L. Barker, E. J. Threlfall, and R. H. Davies. Longitudinal Farm Study of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Mediated Resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 1630 - 1634
29. George A. Jacoby, M.D., and Luisa Silvia Muñoz-Price. The New  $\beta$ -Lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352:380
30. David L. Paterson, Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: A Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 2005, p. 657–686.
31. Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 1991; 276:269–270
32. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39:1211–1233
33. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (Supl 1): 42-52.
34. Babini, G. S., F. Danel, S. D. Munro, P. A. Micklesen, and D. M. Livermore. Unusual tazobactam-sensitive AmpC beta-lactamase from two *Escherichia coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 41:115–118
35. Nordmann, P., and H. Mhammeri. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* 2007; 2:297–307

36. Kernodle, D. S., C. W. Stratton, L. W. McMurray, J. R. Chipley, and P. A. McGraw. Differentiation of beta-lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. *J. Infect. Dis.* 1989; 159:103–108
37. Zscheck, K. K., and B. E. Murray. Nucleotide sequence of the betalactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal betalactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:1736–1740
38. Karen Bush and George A. Jacoby. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* Mar 2010; 54: 969 - 976
39. Roy, C., A. Foz, C. Segura, M. Tirado, C. Fuster, and R. Reig. Plasmid-determined betalactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1983; 12:507–510
40. Queenan, A. M., B. Foleño, C. Gownley, E. Wira, and K. Bush. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:269–275
41. Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:1–14
42. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
43. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39:1211–1233

44. Marchiaro, P., V. Ballerini, T. Spalding, G. Cera, M. A. Mussi, J. Moran-Barrio, A. J. Vila, A. M. Viale, and A. S. Limansky. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 62:336–344
45. Roy, C., A. Foz, C. Segura, M. Tirado, C. Fuster, and R. Reig. Plasmiddetermined betalactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1983; 12:507–510
46. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros. More extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:1697–1704
47. Marchiaro, P., V. Ballerini, T. Spalding, G. Cera, M. A. Mussi, J. Moran-Barrio, A. J. Vila, A. M. Viale, and A. S. Limansky. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 62:336–344
48. Paterson, D. L., K. M. Hujer, A. M. Hujer, B. Yeiser, M. D. Bonomo, L. B. Rice, and R. A. Bonomo. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:3554–3560
49. Datta, N., and P. Kontomichalou. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature.* 1995; 208:239–241

50. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 54: 69-75.
51. Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros. More extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:1697–1704
52. De Champs, C., D. Sirot, C. Chanal, R. Bonnet, and J. Sirot. A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 3177–3179
53. Steward, C. D., J. K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. Biddle, P. M. Raney, G. J. Anderson, P. P. Williams, K. L. Brittain, A. Oliver, J. E. McGowan, Jr., and F. C. Tenover. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:2864–2872
54. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 54: 69-75.
55. Novais A, Baquero F, Machado E, Cantón R, Peixe L, Coque TM. International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highlypenetrating *Enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 825-34.
56. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9: 466-75

57. Rodríguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 4895-7
58. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 39:1211–1233
59. Luzzaro, Francesco, Mezzatesta, Marilina, Mugnaioli, Claudia, Perilli, Mariagrazia, Stefani, Stefania, Amicosante, Gianfranco, Rossolini, Gian Maria, Toniolo, Antonio. Trends in Production of Extended-Spectrum {beta}-Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 1659-1664
60. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, Anđ O, Bal C, Casellas JM. Characterization of beta-lactamase gene *bla*<sub>PER-2</sub>, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 616-20.
61. Weldhagen, G. F., L. Poirel, and P. Nordmann. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:2385– 2392
62. Fernando Pasterán, Melina Rapoport, Alejandro Petroni, Diego Faccone, Alejandra Corso, and Marcelo Galas. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 September; 50(9): 3222–3224

63. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (Supl 1): 42-52
64. Weldhagen, G. F., L. Poirel, and P. Nordmann. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:2385– 2392
65. Toleman, M. A., K. Rolston, R. N. Jones, and T. R. Walsh. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d\_ beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47:2859–2863
66. Danel, F., L. M. Hall, B. Duke, D. Gur, and D. M. Livermore. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:1362– 1366
67. Munday CJ, Xiong J, Li C et al. Dissemination of CTX-M type b-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates in the People’s Republic of China. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 175–80
68. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:557-84
69. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyiminocephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32:1243-6
70. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:657-86
71. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and

- characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis. 2001; 32 Suppl 2:94-103
72. DiPersio J, Deshpande L, Biedenbach D, Toleman A, Walsh R, Jones R. Evolution and dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;51:1-7
73. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S, Miyazawa Y, et al; SENTRY Asia-Pacific Participants. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 52:323-9
74. Luzzaro, Francesco, Mezzatesta, Marilina, Mugnaioli, Claudia, Perilli, Mariagrazia, Stefani, Stefania, Amicosante, Gianfranco, Rossolini, Gian Maria, Toniolo, Antonio. Trends in Production of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 1659-1664
75. Smith Moland EA, Black JA, Hanson ND, Hossain A, Abdalhamid B, Song W. Prevalence of ESBLs in the United States. Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. 2003; Sep 14-17; 43: abstract no. C2-46
76. Helio S. Sader, Ronald N. Jones, Ana C. Gales, Juliana B. Silva, Antonio C. Pignatari. SENTRY: antimicrobial surveillance program report: 1997 through 2001. Braz J Infect Dis. 2004; 8(1): 25-79
77. Alpuche Acm y col. Infecciones nosocomiales por bacterias gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 21(2):77-82

78. Sánchez, F. Matavay, M. Determinación de prevalencia de cepas productoras de betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) de *Klebsiella pneumoniae* en procesos infecciosos en los Hospitales de la ciudad de Quito. 2003.5-17
79. Mitchell J. Schwaber, and Yehuda Carmelil. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis J. Antimicrob. Chemother. (2007) 60 (5): 913-920
80. Mark Melzer, Irene Petersen. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. Journal of Infection. 2005; 55:2 54-259
81. Menashe G, Borer A, Peled N, Gilad J, Riesenberk K, Schlaeffer F, Alkan M, Yagupsky P. Clinical Significance and Impact on Mortality of ESBL-Producing Gram-Negative Isolates in Nosocomial Bacteremia. J. Clin. Microbiol. 2007; 44: 1659-1664
82. Angles E. Matos E. Yuen A. Pinedo I. Benites C. Valencia J. Martínez L. García L. Florez J. Valencia Ja. Prevalencia de BLEE en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital Nacional Arzobispo loayza – 2009, Lima – Perú. Perfil de País-Perú. Paho 2009. P. 102-106
83. Pedro Martínez, Salim Mattar, Álvaro Villanueva, Delfina Urbina. Perfil fenotípico de cefalosporinas de tercera generación, carbapenems y aztreonam: Prevalencia y métodos para la detección de  $\beta$  -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en *E. coli* y *K. pneumoniae* en el hospital San Jerónimo (HSJ) de Montería. MedUNAB 2005; 8(1):15-22

84. Babini, G. S., and D. M. Livermore. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997–1998. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 45:183–189
85. Bermudes, H., C. Arpin, F. Jude, Z. el-Harrif, C. Bebear, and C. Quentin. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 16:523–529
86. Revathi, G., K. P. Shannon, P. D. Stapleton, B. K. Jain, and G. L. French. An outbreak of extended-spectrum, beta-lactamase-producing *Salmonella* senftenberg in a burns ward. *J. Hosp. Infect.* 1998; 40:295–302
87. French, G. L., K. P. Shannon, and N. Simmons. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and betalactam- beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34:358–363
88. Gaillot, O., C. Maruejous, E. Abachin, F. Lecuru, G. Arlet, M. Simonet, and P. Berche. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:1357–1360
89. Naumovski, L., J. P. Quinn, D. Miyashiro, M. Patel, K. Bush, S. B. Singer, D. Graves, T. Palzkill, and A. M. Arvin. Outbreak of ceftazidima resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 36:1991–1996
90. Paterson, D. L. Looking for risk factors for the acquisition of antibiotic resistance: a 21st-century approach. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34:1564–1567

91. Wiener, J., J. P. Quinn, P. A. Bradford, R. V. Goering, C. Nathan, K. Bush, and R. A. Weinstein. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. JAMA. 1999; 281:517–523
92. Angles E. Matos E. Yuen A. Pinedo I. Benites C. Valencia J. Martínez L. García L. Florez J. Valencia Ja. Prevalencia de BLEE en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital Nacional Arzobispo loayza – 2009, Lima – Perú. Perfil de País-Perú. Paho 2009. P. 102-106
93. Alcocer Negrete Iliana. Manual, Laboratorio de Microbiología. Editorial PUCE- Quito, Ecuador. 2010; 68-80
94. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
95. Alcocer Negrete I. Universidad Estatal de Londrina, Centro de Ciencias Agrarias, Departamento de Tecnología de Alimentos y Medicamentos. Programa de Doctorado en Ciencias de Alimentos: *Salmonella* spp. Patronización de Ensayo Inmunoenzimático para detección en Alimentos. Londrina-Paraná. 1999; 78-80
96. Arnfinn Sundsfjord, Gunnar S, Simonsen, Bjorg C. Haldorsen, Håkon Haaheim, Stig-Ove Hjelmevoll, Pia Littauer And Kristin H. Dahl. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. APMIS. 2004; 112: 815–37
97. Quinteros, M.; Radice, M.; Gardella, N. et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 2864-2867
98. Cantón R et al. Evolución y panorama actual de las BLEE. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25 Supl. 2:2-10

99. Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela M del C, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacter isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1237-43
100. Alpuche Acn y col. Infecciones nosocomiales por bacterias gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 21(2):77-82
101. Mendes C, Rossi A, Prado V, Zurita J, Robledo J, Guzman M, Colichon A, Sifuentes J, Pedreira W, Herrera M, Mejia-Villatoro C, Orantia R. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The resisnet Group. Summaries of the IDSA 37 Annual Meeting Philadelphia, PA, 1999; p57 [Abstract 99]
102. Chow JW, Satishchandran V, Snyder TA, Harvey CM, Friedland IR, Dinubile MJ. *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultative gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2002 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Surg Infect (Larchmt)*. 2005; 6:439-48
103. Hanberger, H., J. A. Garcia-Rodriguez, M. Gobernado, H. Goossens, L. E. Nilsson, and M. J. Struelens. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA*. 1999; 281:67-71.
104. Luzzaro, Francesco, Mezzatesta, Marilina, Mugnaioli, Claudia, Perilli, Mariagrazia, Stefani, Stefania, Amicosante, Gianfranco, Rossolini, Gian Maria, Toniolo, Antonio. Trends in Production of Extended-Spectrum {beta}-

- Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 1659-1664
105. Nicolle, L. E. and M. R. Mulvey. Successful treatment of ctx-m ESBL producing *Escherichia coli* relapsing pyelonephritis with long term pivmecillinam. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 2007; 39:748-749
106. Turner, P. J. Extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Infectious Diseases.* 2005; 41:S273-S275
107. Romo H. El consumo de antibióticos en el Ecuador. En Zurita J. Resistencia bacteriana en el Ecuador. 2011. Editorial PUCE 2011; En prensa 2011
108. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, June 2007; <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
109. Navarro F, Miró E. Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007b; 25 (Supl 2): 11-7
110. Pitout JD, Laupland KB, Church DL, Menard ML, Johnson JR. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005b; 49: 4667-70
111. Lal P, Kapil A, Das BK, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* spp. isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med Res.* 2007 Feb;125(2):173-8
112. Fernando Pasterán, Melina Rapoport, Alejandro Petroni, Diego Faccione, Alejandra Corso, and Marcelo Galas. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 September; 50(9): 3222–3224

113. Jacoby GA, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (Supl. 8): 3203-6
114. Clark B, Hiltz M, Musgrave H, Forward KR. Cephamycin resistance in clinical isolates and laboratory-derived strains of *Escherichia coli*, Nova Scotia, Canada. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1254-9
115. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003; 47: 273-95
116. Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, Catal C, Angkucuker M, Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiol Infec* 2004; 10:72-5
117. Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6: 671-83
118. M. S. Hernández, J. Á. García, J. L. Muñoz. Actividad in vitro de fosfomicina frente a enterobacterias de origen urinario productoras de betalactamasas espectro extendido. *Rev Esp Quimioter* 2009;22(1):25-29



**Anexo 2:** Matriz de recolección de resultados.

Código del hospital y número de cultivo PUCE																			
Identificación de género y especie en el Laboratorio de Microbiología PUCE																			
Lectura antibiograma Amoxicilina-Ácido Clavulánico																			
Lectura antibiograma Cefotaxidima																			
Lectura antibiograma Cefotaxima																			
Lectura antibiograma Imipenem																			
Lectura antibiograma Meropenem																			
Requiere prueba confirmatoria para BLEE																			
Lectura antibiograma Cefotaxidima																			
Lectura antibiograma Cefotaxidima + Ácido Clavulánico																			
Lectura antibiograma Cefoxitina																			
Lectura antibiograma Cefotaxima																			
Lectura antibiograma Cefotaxima+ Ácido Clavulánico																			
Lectura antibiograma Ertapenem																			
BLEE confirmada																			
Presencia del gen <i>blaTEM</i>																			
Presencia del gen <i>blaCTX</i>																			
Presencia del gen <i>blaSHV</i>																			
Presencia del gen <i>blaPER</i>																			