



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el periodo octubre – noviembre 2013.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Malla Bravo, Yomaira Maribel

DIRECTOR: Toledo Barrigas, Zorayda Patricia, Bq.F.

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Bioquímica Farmacéutica

Zorayda Patricia Toledo Barrigas.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el periodo octubre – noviembre 2013 realizado por Malla Bravo Yomaira Maribel, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2014

.....

Zorayda Patricia Toledo Barrigas

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESION DE DERECHOS

Yo, Malla Bravo Yomaira Maribel declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación: Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el periodo octubre – noviembre 2013, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo. Bq. F. Zorayda Patricia Toledo Barrigas director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autor: Yomaira Maribel Malla Bravo

Cédula: 1105139412

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, por haberme dado la oportunidad de cumplir mi sueño más adorado, ante todo por su fidelidad, provisión y presencia en mi vida, sin su amor y sus múltiples bendiciones hubiese sido imposible llegar hasta aquí y ser quien soy hoy en día ¡Te amo Dios;

Para mis padres por su apoyo, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi madre Adela, quien me ha apoyado tanto que no solo en la carrera universitaria si no durante toda la vida, dando amor verdadero, su cariño, y comprensión.

A mi padre Luis, por creer en mí mostrándome su apoyo ilimitado e incondicional en todo momento.

A mis hermanos Paola, Anabel y Luis que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, y palabras de aliento.

Yomaira M.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por las bendiciones por guiar cada paso que he dado en mi vida ya que cada uno de ellos lo ha conducido con la certeza de que está a mi lado alegrando mi corazón con la luz de tu espíritu y es por ello que he alcanzado cada meta propuesta.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón papá y mamá, y a ti en especial mamá por darme la confianza empuje y todo tu amor incondicional, así mismo tu paciencia cuando más la necesite.

Además mi gratitud a la Universidad Técnica Particular de Loja, en donde tuve la oportunidad de formarme profesionalmente y al Hospital Manuel Ygnacio Monteros y, a todas aquellas personas que de múltiples maneras contribuyeron con este trabajo investigativo.

De manera especial quiero agradecer a Bq. F. Zorayda Toledo directora de tesis, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, por la motivación y el apoyo.

A mi grupo de trabajo Jhomar, Vanessa, Cecilia, Lucia, Abigaíl y Bq F. Sofía Ochoa, por compartir conocimientos, por vivir compartir vivencias con nosotros y darnos sentimientos de alegría, amor, cariño que nos dejaran muchas enseñanzas y experiencias.

INDICE DE CONTENIDOS.

CARATULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE GRAFICAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Bacilos Gram negativos.....	6
1.1.1 Enterobacterias.....	6
1.1.2 Bacilos Gram Negativos no fermentadores.....	8
1.2. Resistencia Bacteriana.....	9
1.2.1 Mecanismos de Resistencia.....	10
1.2.1.1. Modificación enzimática del antibiótico.....	11
1.2.1.2. Bombas de salida.....	11
1.2.1.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana.....	12
1.3. Antibióticos.....	12
1.3.1 Antibióticos β -lactámicos.....	13
1.3.1.1. Penicilinas.....	13
1.3.1.2. Cefalosporinas.....	13
1.3.1.3. Carbapenems.....	14
1.3.1.4. Monobactams.....	14
1.3.2. Mecanismos de acción.....	15
1.4. β -lactamasas.....	16
1.4.1. β -lactamasas de espectro extendido BLEE.....	17
1.4.2. β -lactamasa AmpC.....	18
1.4.2.1. AmpC cromosómicas inducibles.....	19
1.4.2.2. AmpC cromosómicas no inducibles.....	19
1.4.2.3. AmpC plasmídicas inducibles y constitutivas.....	19
1.4.3. Carbapenemasas.....	20
CAPITULO II.....	22
METODOLOGÍA.....	22
2.1 Recolección de muestras.....	23
2.2. Identificación bacteriana.....	23
2.2.1. Siembra.....	23
2.2.2. Pruebas bioquímicas.....	24
2.3 Antibiograma.....	24
2.3.1. Método de Difusión en agar.....	24
2.4. Detección Fenotípica de β -lactamasas.....	24

2.4.1. Detección de β -lactamasas de espectro extendido BLEE.....	24
2.4.1.1. Prueba de sinergia de doble disco.....	24
2.4.1.2. Prueba de discos combinados con inhibidor.....	24
2.4.2. Detección fenotípica de AmpC.....	25
2.4.2.1. Detección de β -lactamasas tipo AmpC Constitutiva.....	25
2.4.2.2. Detección de β -lactamasas tipo AmpC Inducible.....	25
2.4.3. Detección fenotípica de carbapenemasas.....	25
2.4.3.1. Test de Hodge modificado.....	25
2.5. Análisis Estadístico.....	26
CAPITULO III.....	27
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	51

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Porcentaje de tipo de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013 28

Gráfica 2 Porcentaje de cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013 30

Gráfica 3 Porcentaje de resistencia antimicrobiana en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013 32

Gráfica 4 . Frecuencia de mecanismos de resistencia en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013 34

Gráfica 5. Porcentaje de betalactamasas BLEE de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013 37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013.....	28
Tabla 2. Frecuencia de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013.	30
Tabla 3. Frecuencia resistencia antimicrobiana en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013.....	32
Tabla 4. Frecuencia de mecanismos de resistencia en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013	34
Tabla 5. Frecuencia de betalactamasas BLEE de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013	37
Tabla 6. Frecuencia de betalactamasas tipo AmpC, de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013	39

ABREVIATURAS

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

BNF: Bacilos gram negativos no fermentadores

CAZ: Ceftazidima

CAZ/CLA: Ceftazidima/ácido clavulánico

CIM: Concentración mínima inhibitoria

CLSI: Clinical Laboratory and Standards Institute

CTX: Cefotaxima

CTX/CLA: Cefotaxima/ácido clavulánico

C3G: Cefalosporinas de tercera generación

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LIA: Agar Hierro Lisina

LPS: Lipopolisacáridos

IMP: Imipenem

ITU: Infección del tracto urinario

PBPs: Proteínas de anclaje de penicilinas

SIM: Sulfhídrico Indol Movilidad

TSI: Triple Azúcar Hierro

WHONET: World Health Organization

RESUMEN

Se estudió un total de 117 cepas aisladas, verificando que la muestra clínica más prevalente fue orina (79,48%), las cepas estuvieron determinadas mediante pruebas bioquímicas, siendo la cepa más frecuente *Escherichia coli* (72,64%). La susceptibilidad bacteriana se estableció por el método de difusión en disco en agar Mueller Hinton mediante la técnica de Bauer y Kirby. Se consideró como sospechosas las cepas que presentaron halos <21mm para las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima), cefoxitina (<15 mm) y carbapenemicos (<20 mm). Estas cepas fueron sometidas a las pruebas confirmatorias, mediante el método de discos combinados con inhibidor, según recomendaciones del CLSI 2012. Se encontró que el 64,51% corresponde a cepas productoras de BLEE, siendo la más frecuente *Escherichia coli* (12,25%).

Se evaluó la presencia de β -lactamasas tipo AmpC, mediante la técnica prueba de aproximación de discos, verificándose que el 15,78% corresponde a cepas productoras de AmpC, detectándose en: *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, y *Pseudomonas aeruginosa*. En igual forma se analizó el test de Hodge para carbapenemasas, pero en nuestro estudio no se observó la producción de este mecanismo de resistencia.

Palabras Claves: β -lactamasas, antibiótico, resistencia bacteriana, β -lactamasas de espectro extendido.

ABSTRACT

It was studied 117 isolated strains, verifying that urine sample was the most frequent sample (79,84%), the strains were determinate by biochemical test, founding that the most common sample was the *Escherichia coli* (72,64%) To determinate the bacterial susceptibility it was used the disk diffusion in Muller Hinton agar method using the Bauer and Kirby technique. It was considerate that the strains that shows bacterial resistance to the third generation cephalosporin (ceftazidime and cefotaxime), cefoxitin and carbapenems. These strains were exposed to the confirmatory tests, using the combined disk with inhibitor method, according to recommendations of the CLSI 2012. It was found 20 strains ESBL and the most frequent was the *Escherichia coli* (23.72%) found in outpatients.

The same way, it was evaluated the presence of type AmpC beta-lactamases producers strains, using the approaching disks technique, By the use of that technique was identified 3 AmpC producer strains in *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Beta-lactamases, antibiotic, bacterial resistance, ESBL.

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico (García, *et al.* 2005).

En las bacterias Gram negativas la resistencia a los β -lactámicos está originada por varios mecanismos, pero el más importante, por su frecuencia y eficacia, es la producción de β -lactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos y se producen de manera constitutiva o inducible. De todas las β -lactamasas descritas hasta el momento, cabe destacar, por su interés e implicaciones clínicas, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las β -lactamasas tipo AmpC y las carbapenemasas. El incremento de la resistencia mediante la producción de β -lactamasas restringe el empleo de los antibióticos β -lactámicos como tratamiento empírico en las infecciones ocasionadas por estos microorganismos (Lindsay, 2011).

La aparición y propagación de las bacterias que producen las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se han descrito en todo el mundo como punto crítico de urgencia debido a la alta dispersión de estas cepas en diferentes tipos de infecciones, investigaciones demuestran que se presenta mayormente en las *enterobacteriaceae* y confieren resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenemes ni a las cefamicinas, siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Por ello las BLEE son un problema de salud pública con proporciones alarmantes de prevalencia en Latinoamérica que alcanza tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil (Máttar & Martínez, 2007).

A través del tiempo los patrones de resistencia han ido en aumento, inicialmente relacionados al ambiente hospitalario, estos mecanismos de resistencia están emergiendo en la comunidad, tal es el caso de las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y AmpC, aisladas en espacios extrahospitalarios (Park-Leung, *et al.* 2007).

Estudios han demostrado que una buena parte (18,1%) de bacterias BLEE positiva, fueron aislados de pacientes ambulatorios; probablemente debido a que, este grupo de bacterias producen infecciones y están ampliamente distribuidos en la población, lo que facilita el proceso de recombinación y transferencia de material genético entre bacterias, haciendo posible que microorganismo como *Escherichia coli* presenten una gran diversidad de patrones de resistencia (Rodríguez, *et al.* 2009).

Considerando la importancia que ha adquirido en las últimas décadas el problema de resistencia bacteriana, no se cuenta con información real de la prevalencia de la resistencia antimicrobiana en bacterias Gram negativas a nivel local y nacional; desde este punto de vista nos proponemos hacer un estudio, el cual tiene como objetivo determinar los posibles mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos y su frecuencia en nuestra localidad en pacientes ambulatorios del “Hospital Manuel Ygnacio Monteros” durante el periodo octubre-noviembre 2013, con la finalidad de obtener datos reales, confiables y actuales que sirvan para el tratamiento oportuno y eficaz previniendo la morbilidad por infecciones resistentes y evitar su diseminación al ser tratadas oportunamente y eficazmente.

Para la obtención de resultados se consideró sospechosas a las cepas que presentaron halos menores para las cefalosporinas de tercera generación (<21 mm), cefoxitina (<15 mm) carbapenémicos (<21 mm), para luego proceder a la confirmación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), AmpC y Carbapenemasas, según recomendaciones del CLSI 2012. Se realizó un análisis de resistencia, de todas las cepas para todos los antibióticos β -lactámicos a través del programa WHONET 5.4, así mismo se realizó el análisis del grado de significancia de las cepas estudiadas y los mecanismos de resistencia mediante la prueba de Pearson en el programa SPSS 21.0.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Bacilos Gram negativos

El gran grupo de bacilos Gram negativos incluye diferentes familias y géneros, muchos de ellos muy frecuentes en patología médica.

Los bacilos Gram negativos se caracterizan por tener coloración roja al realizar la tinción de gram, su pared está formada por un lipopolisacárido que es responsable importante de la patogenicidad.

Los bacilos Gram negativos poseen una pared celular relativamente compleja que consiste en una rígida pero delgada capa (2-3 nm) de mucopéptido (también denominado peptidoglicano) y por encima una capa adicional trilaminar compuesta por lipopolisacáridos de 6-18 nm de espesor (contienen el lípido A o endotoxina) y proteínas. Algunas de estas últimas ofrecen, por su peculiar estructura química, un canal hidrofílico de intercambio metabólico con el exterior, que atraviesa toda la membrana externa.

En la membrana citoplasmática o también llamada membrana celular, están localizadas unas proteínas (PBPs) que se encargan de varias funciones, que pueden ser vitales o no para la bacteria, y a las cuales se fijan los antibióticos betalactámicos de acuerdo a su farmacodinamia específica.

Los bacilos Gram negativos se dividen en oxidasa positivo y oxidasa negativos:

- Oxidasa positivos a su vez se dividen en fermentadores (*Vibrio spp*) y no fermentadores (*Pseudomonas spp*, *Campilobacter spp*)
- Oxidasa negativos se incluyen las enterobacterias que son responsables de un elevado número de infecciones nosocomiales (Cwi, *et al.* 2008).

1.1.1. Enterobacterias.

Son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, que habitan en el tracto intestinal de los seres humanos y de otros animales. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm y con un diámetro de 0.3 a 1.5 micras. Además fermentan la glucosa con formación de ácido y algunas también gas, todas son oxidasa negativas, en su gran mayoría reducen nitratos a nitritos y crecen en medios usuales (Prats, 2007).

Como en otras bacterias Gram negativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa

de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos β -lactámicos) y otras proteínas de la membrana externa (Puerta y Mateos, 2010).

Diferentes factores han contribuido al incremento de las infecciones por enterobacterias, como la casi totalidad de las bacterias Gram negativas disponen en su superficie de varias fimbrias, organelas indispensables para poder adherirse a las superficies mucosas y para la colonización bacteriana. Producen toxinas, que es una característica propia de las cepas patógenas de este grupo, dentro de ellas está la hemolisina que potencia la acción de las fimbrias, una amplia variedad de citotoxinas (la toxina enteropatógena) y de enterotoxinas causantes de los diferentes síndromes diarreicos (Romero, 2007).

Es importante conocer, las bacterias más importantes en el grupo, pues estos microorganismos difieren considerablemente en su patogenicidad y respuesta a los antimicrobianos. Entre las especies más relevantes por su importancia clínica tenemos:

Escherichia coli siendo el uropatógeno predominantemente más aislado, seguido en un orden variable por *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, (Ochoa, et al. 2005).

a) *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, con una sola espiral de ADN, móvil, aerobio y aerobio facultativo, con flagelos peritricos. La mayoría forman fimbrias y pilis, muchas cepas producen una pequeña microcápsula. Tienen información genética en los plásmidos, que son responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos.

Es la especie predominante de la flora anaeróbica facultativa del colon humano. Cuatro síntomas pueden resultar de la infección por cepas patogénicas: infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica (Romero, 2007).

b) *Klebsiella*

Este género incluye la especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*. Los miembros de este género son bacilos no flagelados, y por lo tanto son inmóviles, pero posee una gran cápsula que les caracteriza. Los factores de patogenicidad de este género son: la cápsula,

que es un factor antifagocitario, y la endotoxina de pared, que es un lipopolisacárido como los otros bacilos de esta familia. Dicho género puede infectar diversos tejidos, pero mencionaremos especialmente las infecciones de aparato respiratorio producidas por *Klebsiella pneumoniae*, que se manifiestan por neumonías de alta gravedad (Romero, 2007).

c) *Proteus*.

El género *Proteus* se encuentra en el suelo, el agua y los materiales con contaminación fecal. Las especies de *Proteus* muestran el rasgo característico de la motilidad ascendente, que se observa en agar no inhibitorio, como una propagación ondulante del microorganismo a través de la totalidad de la superficie del mismo. *Proteus mirabilis* es la especie aislada con mayor frecuencia en los seres humanos, sobretodo como agente causal tanto de las infecciones urinarias como de las heridas. *Proteus vulgaris* se recupera más comúnmente de sitios infectados en huéspedes inmunosuprimidos, sobre todo los que reciben regímenes de antibióticos (Giovanniello, et al. 2008).

1.1.2. Bacilos Gram Negativos No Fermentadores

La gran mayoría de las bacterias Gram negativas no fermentadoras (BNF) se ubican en los ambientes naturales y húmedos de los hospitales, representando aproximadamente el 15% de todos los aislamientos en los laboratorios de microbiología. Los BNF desempeñan un importante papel no sólo por las infecciones adquiridas en el hospital, sino por su frecuente resistencia a los agentes antimicrobianos, comportándose como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, sometidos a terapia antimicrobiana, a instrumentación o a intubación.

Dentro del grupo bacilos Gram negativos no fermentadores (BNF), se encuentran muchos géneros y especies, pero los más frecuentemente aislados de muestra clínicas, son: *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* El reservorio de estos microorganismos se encuentra en el medio ambiente y en múltiples fuentes (suelo, agua, plantas, animales) y ocasionalmente forman parte de la flora humana normal (Ferrero, 2005).

a) *Pseudomonas aeruginosa*

Es un patógeno oportunista, es la especie de mayor importancia clínica en el género *Pseudomonas*. Puede causar una gran variedad de infecciones tanto de ámbito comunitario como pueden ser de vías respiratorias, urinarias, oculares oticas etc., como de ámbito hospitalario. Estas son las causantes de gran número de problemas debido a que son

pacientes inmunodeprimidos hospitalizados durante largos periodos de tiempo, teniendo la mayoría de ellos antecedentes de uso previo de antibióticos de amplio espectro, graves quemaduras o haberse sometido a distintos tipos de manipulaciones (Casal, *et al.* 2012).

b) Acinetobacter baumannii

Es causa importante de morbilidad infecciosa y mortalidad, que afecta mayormente a pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). *Acinetobacter baumannii* la especie más frecuentemente aislada y la de mayor importancia clínica, se ha implicado en una variedad de infecciones, tales como bacteriemia, infecciones del tracto urinario y meningitis, pero su papel predominante es como agente causal de neumonía, particularmente las asociadas a ventilación mecánica, dichas infecciones son difíciles de tratar por la amplia resistencia de esta bacteria a la mayoría de los antibióticos. Las dificultades terapéuticas, en conjunto con la gran capacidad que tiene *Acinetobacter* de sobrevivir por largo tiempo en el ambiente hospitalario, aumentan las oportunidades para que se transmita entre pacientes, ya sea por medio del reservorio humano o por materiales inanimados contaminados (Salazar & Nieves, 2005).

1.2. Resistencia bacteriana

Durante los últimos años la frecuencia y la variedad de infecciones resistentes a antibióticos aumentaron tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad. La frecuencia creciente de resistencia a los fármacos se atribuyó a combinaciones de las características de los antibióticos, la presión selectiva sobre las bacterias secundarias al uso de antibióticos y los cambios sociales y tecnológicos que estimulan la transmisión de la resistencia a los fármacos.

La resistencia a los antibióticos también depende de la duración y cantidad de antibióticos utilizados, tiende a aumentar en forma proporcional a la duración del tratamiento. En cambio la reducción de la duración de la terapia y de la cantidad del fármaco utilizado puede determinar el resurgimiento de cepas más susceptibles (Cwi, *et al.* 2007).

El mal uso y el abuso de antibióticos son la causa más directa, pero es muy importante reconocer a la resistencia bacteriana como un problema multicasual, de enorme complejidad. La alta prevalencia de enfermedades infecciosas, el incremento de la pobreza, el alto costo de los medicamentos, las tarifas de los servicios, la ausencia de los controles de calidad, la venta libre de los medicamentos en las tiendas, farmacias y la presión de la publicidad en los medios de comunicación, son factores que han contribuido al mal uso y

abuso de los antibióticos y consecuentemente al incremento de la resistencia a estos (Quizhpe, *et al.* 2011).

La aparición de resistencia se produce por dos factores fundamentales: a) existencia de genes determinantes de la aparición de un mecanismo de resistencia, que pueden ser transferidos entre células bacterianas de una misma cepa o cepas diferentes, convirtiendo la resistencia en un fenómeno transferible, y b) uso amplio de antibióticos que ejercen una presión de selección que favorece la supervivencia de cepas que portan y expresan genes determinantes de resistencia (Sanabria, 2003).

Los antibióticos β -lactámicos son los compuestos más ampliamente usados para tratar infecciones adquiridas en el hospital o en la comunidad. Sin embargo, la resistencia a estos antibióticos en bacterias Gram negativas se ha incrementado, lo cual limita su eficacia terapéutica. Se debe estar alerta a este fenómeno y seleccionar la terapia de acuerdo con el mecanismo de resistencia probable del germen aislado (Arias, *et al.* 2003).

1.2.1. Mecanismos de resistencia.

La resistencia que presentan las bacterias contra los antibióticos se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. El desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos, su uso indiscriminado e irracional y la presión evolutiva ejercida por el uso terapéutico ha favorecido el incremento de cepas resistentes.

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico.

La resistencia bacteriana tanto natural como adquirida se puede abordar desde el punto de vista molecular y bioquímico:

Resistencia natural

La resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico. Algunos ejemplos de esto podemos mencionar a la resistencia que presenta *Klebsiella pneumoniae* que por su producción natural de β -lactamasas es resistente a las penicilinas (ampicilina y amoxicilina) y también podemos mencionar a los bacilos Gram

negativos aeróbios resistentes a la clindamicina debido a que no cuentan con un sitio blanco.

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). Son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos (Forbes, *et al.* 2009).

La resistencia se puede clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico, bombas de salida. Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente

1.2.1.1. Modificación enzimática del antibiótico.

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes, son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar a los β -lactámicos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación.

1.2.1.2. Bombas de salida.

Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar una amplia gama de compuestos estructuralmente diferentes (incluidos los antibióticos de múltiples clases), estas bombas se pueden asociar con la resistencia hacia múltiples antibióticos (MDR). La bomba existe como un sistema tripartita que consiste en un transportador de la membrana citoplasmática, una proteína de fusión a la membrana periplasmática y un factor de membrana externa, este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Lister, *et al.* 2009).

1.2.1.3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa.

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son

proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Tafur, *et al.* 2008)

1.3. Antibióticos

Los antibióticos, se derivan del griego anti (=contra) y bios (=vida), son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos (acción bacteriostática), u originan su destrucción (acción bactericida).

Constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo.

Actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. El uso inadecuado de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes es un problema mundial, ya que esto contribuye a que exista un alto índice de automedicación por parte de la comunidad (Guerrero & Raigoza, 2009).

Dentro de los antibióticos más numerosos y utilizados en la práctica clínica se encuentran a los antibióticos β -lactámicos que son un amplio grupo de antibióticos, cuya característica compartida es contener en su estructura molecular un anillo común de cuatro carbonos denominado anillo β -lactámico.

Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones (Quizhpe, *et al.* 2011).

1.3.1. Antibióticos betalactámicos.

Los β -lactámicos, que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la

práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones clásicas, las cefalosporinas en las profilaxis quirúrgicas y en infecciones comunitarias graves, las carbapenemasas en infecciones nosocomiales mixtas y por bacterias multirresistentes y los inhibidores de β -lactamasa permiten el uso eficaz de las amino y ureido penicilinas en infecciones de gran relevancia.

La presencia de un anillo β -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas (Merino & Losch, 2005).

1.3.1.1. Penicilinas.

Grupo de antibióticos que contienen un anillo β -lactámico 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 β -lactámico y que es la que define sus propiedades (Merino & Losch, 2005).

1.3.1.2. Cefalosporinas.

Las cefalosporinas o cefems son antibióticos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, un antibiótico natural producido del hongo *Cephalosporium acremonium*. El núcleo activo, ácido 7-aminocefalosporánico, está muy estrechamente relacionado con el ácido 6-aminopenicilánico, por poseer ambos un anillo β -lactámico. Son bactericidas que inhiben la síntesis de la pared bacteriana al igual que las penicilinas y se clasifican por generaciones, en base a la similitud de sus actividades antibacterianas y de cuando fueron introducidas en el mercado. Las más modernas han ido incrementando su actividad contra las bacterias Gram negativas. Se distribuyen ampliamente en la mayoría de los líquidos y los tejidos corporales y las concentraciones que se alcanzan son suficientes para el tratamiento de la infección, especialmente si hay inflamación, la cual facilita su difusión. Sin embargo, la penetración en

el humor vítreo del ojo y el líquido cefalorraquídeo (LCR) es relativamente baja, aunque las de tercera generación pueden alcanzar niveles bastante altos en el LCR para el tratamiento de la meningitis (Manguña, 2006).

1.3.1.3. **Carbapenems**

Son los β -lactámicos de más amplio espectro. Sólo carecen de actividad frente a los *estafilococos* resistentes a meticilina, *enterococos* resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y son poco activos frente a *Clostridium difficile*. ertapenem es poco activo frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Merino & Losch, 2005).

Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) son antibióticos relacionados con la penicilina en los cuales el átomo de azufre del anillo A del ácido penicilánico fue reemplazado por el carbón. Los carbapenémicos inducen β -lactamasas, pero también son resistentes a estas enzimas; este fenómeno explica su eficacia contra más del 90% de las especies de bacterias gram negativas. Algunas ventajas de los carbapenémicos son una mayor actividad contra numerosas cepas de *S. pneumoniae* y bacterias aerobias Gram negativas resistentes a las penicilinas, sobre todo *Enterobacter* (Romero, 2007).

1.3.1.4. **Monobactams**

Fueron los primeros antibióticos β -lactámicos monocíclicos obtenidos de bacterias, aunque en la actualidad son producidos sintéticamente. El aztreonam fue el primero disponible comercialmente. Es también bactericida y actúa sobre la síntesis de la pared celular. Sin embargo, su actividad difiere de las nuevas cefalosporinas y del imipenem en que se restringe a microorganismos aerobios Gram negativos, es muy efectivo contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se administra por vía parenteral y puede producir hipersensibilidad con otros antibióticos β -lactámicos. Otros monobactámicos como el carumonam y el tigemonam pueden ser suministrados oralmente, pero no son activos contra la *Pseudomonas aeruginosa* (Manguña, 2006).

1.3.2. Mecanismo de acción.

Las bacterias Gram negativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos, proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglucano.

El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (Gram negativos) o mediante un pentapéptido de glicina (gram positivos). Los β -lactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los β -lactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.

Los β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la CIM de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes. Se define el fenómeno de tolerancia como la necesidad de una concentración al menos 32 veces mayor a la CIM para que un antimicrobiano destruya una cepa bacteriana.

La producción de enzimas inactivantes es el mecanismo más importante de las bacterias, como la adquisición de β -lactamasas (plasmídicas o cromosómicas), es la causa más frecuente de resistencias, y algunas son de espectro ampliado y confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos, desde que se puso de manifiesto la importancia de las β -lactamasas, se buscaron inhibidores de estas enzimas, incluyéndose en este término diferentes compuestos químicos, entre los que destacan ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam, sin embargo ya se han detectado una nueva clase de β -lactamasas que confiere resistencia a estos inhibidores (Barcelona, *et al.* 2008).

1.4. β -lactamasas.

La resistencia bacteriana a los β -lactámicos puede ser mediada por la destrucción enzimática de los antibióticos, por la modificación de sus sitios de acción o por la disminución de la captación intracelular del fármaco.

Estas tres vías cumplen una función importante en la resistencia a los antibacterianos de relevancia clínica pero la destrucción bacteriana de los β -lactámicos por producción de β -lactamasas es por lejos el método más frecuente de resistencia. Las β -lactamasas abren el anillo betalactámico y la modificación de la estructura del fármaco impide su unión eficaz a las PBP, de modo que la síntesis de la pared celular puede continuar.

Las bacterias Gram negativas, incluidos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y especies de *Acinetobacter*, producen docenas de diferentes tipos de β -lactamasas que median la resistencia a uno o más de los antibióticos β -lactámicos.

Las β -lactamasas producidas por las bacterias Gram negativas permanecen dentro de la célula, en el espacio periplasmático, donde están ubicadas de una manera estratégica para hidrolizar a los betalactámicos cuando atraviesan la membrana externa a través de los canales de porinas llenos de agua y revestidos por proteínas.

Se han desarrollado diversas modificaciones moleculares en la estructura de los β -lactámicos para proteger al anillo β -lactámico contra la hidrólisis enzimática. Este avance condujo a la producción de antibióticos más efectivos de esta clase. Se han aplicado estrategias similares para desarrollar penicilinas y cefalosporinas más resistentes a la variedad de β -lactamasas producidas por los bacilos gram negativos.

Otra estrategia terapéutica consiste en combinar dos fármacos β -lactámicos diferentes. Uno de ellos se une con avidéz y de forma irreversible a la β -lactamasas y la incapacita para la hidrólisis, mientras que el segundo β -lactámico, que es sensible a la actividad de la β -lactamasas, ejerce su actividad antibacteriana. Entre los ejemplos de combinaciones de β -lactámicos/ inhibidor de la β -lactamasas.

La modificación de los sitios de acción también cumple una función importante en la resistencia a los β -lactámicos de relevancia clínica. Por esta vía el microorganismo cambia o adquiere de otro microorganismo los genes que codifican enzimas para la síntesis de la pared celular con modificaciones (Forbes, *et al.* 2009).

Las β -lactamasas son la principal causa de resistencia a estos antibióticos. Estas enzimas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de manera que pueden inactivar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos o distintas combinaciones de estos antibióticos.

La nueva presión selectiva de estos antimicrobianos provocó que aparecieran nuevos tipos de β -lactamasas, llamadas BLEE, que inactivan a las cefalosporinas de tercera generación,

así como otras que inactivan selectivamente a los carbapenémicos y a los inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico y el sulbactam, entre otros.

La existencia de estas enzimas limita de forma importante el uso empírico de antibióticos β -lactámicos. Además, la fácil transferencia de unos organismos a otros, su prevalencia cada vez mayor, resultan especialmente problemáticas en la práctica clínica (Carrillo & García, 2008)

1.4.1. β -lactamasas de espectro extendido BLEE

Las β -lactamasas de espectro extendido, son enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, fundamentalmente enterobacterias frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros.

La aparición de resistencias a cefalosporinas de tercera generación a principios de los años 80 que se denominaron β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Éstas derivan de β -lactamasas ya existentes que han sufrido mutaciones aleatorias por presión selectiva al introducir las cefalosporinas de tercera generación. Inicialmente estaban restringidas a *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, organismos que contenían las tres β -lactamasas progenitoras de las BLEEs (TEM-1, TEM-2 y SHV-1).

Inicialmente la detección de BLEE estaba limitada a cepas aisladas de pacientes hospitalarios, sin embargo, la situación se ha complicado, debido a que el mecanismo se está detectando en bacterias causantes de infecciones a nivel comunitario, lo que trae como consecuencia una complicación terapéutica desde el punto de vista clínico y agrava el problema desde el punto de vista de salud pública.

Las BLEEs pertenecen al grupo 2be y a la clase molecular A. Deben su nombre a que confieren resistencia a un amplio espectro de antibióticos β -lactámico como las amino-, carboxi- y ureidopenicilinas (ampicilina, ticarcilina y piperacilina respectivamente), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (excepto cefamicinas) y monobactámicos (aztreonam) pero no carbapenemas (imipenem, meropenem). Esta acción hidrolítica es inhibida por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (inhibidores de β -lactamasas).

Las BLEEs se encuentran codificadas en plásmidos lo que permite su amplia y fácil diseminación no sólo entre cepas de la misma especie sino también entre cepas de distintas especies. Por tanto, los únicos β -lactámicos que se pueden utilizar frente a estos

microorganismos son las cefamicinas como la cefoxitina, las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores (ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam) o las carbapenemas (Carrillo & García, 2008).

En la década de los 90 estas enzimas se encontraron en distintas especies de *Enterobacteriaceae* produciendo brotes nosocomiales, pero a partir del 2000 se han convertido en las más frecuentes en la mayor parte del mundo, tanto en infecciones hospitalarias como de la comunidad, habiendo casi sustituido a las BLEE de los tipos TEM y SHV. Si bien la prevalencia de las diferentes enzimas CTX-M es variable en diferentes países; es interesante destacar la diseminación a nivel mundial del clon ST131 de *Escherichia coli* O25:H4 portador de la CTX-M-15.

La detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica, y esto viene condicionado por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia (Navarro, *et al.* 2011).

1.4.2. β -lactamasas tipo AmpC

Las β -lactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros). Las AmpC hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefoxitina y cefotetán) y, en menor medida, las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y los carbapenémicos (imipenem y meropenem). La cloxacilina y el aztreonam, así como el ácido borónico y sus derivados (ácido fenil-borónico), inhiben a las β -lactamasas de tipo AmpC, mientras que el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam no son buenos inhibidores (Navarro, *et al.* 2011).

Ciertas enterobacterias poseen de manera natural β -lactamasas tipo AmpC, tal es el caso de *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei*; al igual que bacilos gramnegativos no fermentadores de importancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa*. Las AmpC producidas por los microorganismos antes mencionados, son de naturaleza cromosómica inducible y explican la resistencia natural a las aminopenicilinas, cefalosporinas de 1ra generación, cefamicinas (cefoxitina, cefotetán) y aminopenicilinas combinadas con inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam), expresada por estos agentes bacterianos. *E. coli*, *Shigella spp.* y *Acinetobacter baumannii*, también poseen β -lactamasas

AmpC cromosómicas pero constitutivas (no inducibles). Existen AmpC de codificación plasmídica que pueden ser inducibles o no.

La presencia simultánea de otros mecanismos de resistencia a β -lactámicos, como la producción de BLEE o la pérdida de porinas, dificulta enormemente la interpretación de las pruebas fenotípicas de detección de AmpC plasmídica. Un marcador fenotípico muy utilizado para diferenciar la producción de AmpC de la de BLEE es la cefoxitina (Calvo, *et al.* 2011).

Las β -lactamasas tipo AmpC se han clasificado según la localización y expresión del gen AmpC.

1.4.2.1. AmpC cromosómicas inducibles.

Se producen a bajos niveles de manera natural y aumentan su síntesis en presencia de inductores (β -lactámicos).

1.4.2.2. AmpC cromosómicas no inducibles (constitutivas).

Su expresión es a niveles muy bajos sin mostrar resistencia. Cuando se encuentran hiperproducidas pueden conferir resistencia a todos los β -lactámicos a excepción de cefalosporinas de 4ta generación y carbapenémicos. La bacteria representativa es *Escherichia coli* (Valle, 2009).

1.4.2.3. AmpC plasmídicas inducibles y AmpC plasmídicas constitutivas.

La evidencia molecular sugiere que los genes que codifican a estas enzimas, derivan de los genes AmpC cromosómicos que naturalmente poseen las enterobacterias antes mencionadas. Estos genes han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando la diseminación a diferentes microorganismos. Los genes AmpC mediados por plásmidos han sido encontrados en bacterias como *Salmonella spp.*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* que naturalmente no poseen estos genes (Valle, 2009).

1.4.3. Carbapenemasas

En los últimos años se ha producido una gran alarma y preocupación por la dispersión de los bacilos Gram negativos resistentes a los carbapenémicos en los que el mecanismo implicado es la producción de β -lactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos transferibles (Navarro, *et al.* 2011).

Las carbapenemasas son un grupo heterogéneo de β -lactamasas distribuidas en las clases moleculares A, B y D que presentan actividad hidrolítica sobre los carbapenémicos y la práctica totalidad de los antibióticos β -lactámicos clínicamente relevantes (Calvo, *et al.* 2011).

Los carbapenem han sido los antibióticos β -lactámicos de mayor actividad evadiendo la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana y, generalmente, se reservan para el tratamiento de infecciones graves o para aquéllas causadas por organismos resistentes a los otros antibióticos.

La resistencia múltiple en Gram negativos es producto de una combinación de mecanismos de resistencia, algunos de ellos inherentes a la especie (resistencia intrínseca o natural) y otros adquiridos (resistencia adquirida por elementos móviles como plásmidos y transposones), que finalmente se manifiestan como resistencia a una amplia gama de antibióticos.

Se han descrito dos tipos de carbapenemasas con base en estudios moleculares. Las primeras son enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual se han denominado carbapenemasas tipo serina. El segundo grupo son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática; éstas últimas son las denominadas metalo- β -lactamasas.

Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Los carbapenem llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión. Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenem. De esta manera, la velocidad de acumulación de los carbapenem en el espacio periplasmático disminuye notablemente. Normalmente, la pérdida de porinas no confiere una resistencia franca y sólo eleva los valores de la CIM para carbapenem sin superar los puntos de corte que determinan resistencia (Suárez, *et al.* 2006).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Recolección de muestras

Se realizó un estudio descriptivo de los cultivos obtenidos de muestras clínicas de pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros”, durante el periodo octubre - noviembre 2013. Por tal razón se determinó los mecanismos de resistencia, en las siguientes muestras: orina, secreción vaginal, heces, secreción faríngea, secreción uretral y líquido abdominal. Una vez obtenidas se las traslado al laboratorio de microbiología de la UTP, para su posterior análisis.

Criterio de Inclusión

- Cultivos de paciente ambulatorios realizados en el período octubre - noviembre de 2013 en el Hospital Manuel Ygnacio Monteros.
- Cultivos Gram negativos de origen: urinario, heces, secreciones vaginales, secreciones traqueales, secreciones uretrales y líquido abdominal.

Criterio de Exclusión

- Cultivos de pacientes hospitalizados.
- Cultivos que se realicen fuera del período octubre -noviembre de 2013.
- Cultivos de muestras clínicas Gram positivos.
- Muestras clínicas contaminadas.

2.2. Identificación Bacteriana

2.2.1. Siembra

El primer paso a seguir en la identificación de un microorganismo es proceder a la obtención en cultivo puro.

Se realizó la siembra en agar Macconkey y se procedió a seleccionar únicamente bacilos Gram negativos, para luego proceder a su identificación.

2.2.2. Pruebas Bioquímicas

Se procedió a identificar el germen a través de pruebas bioquímicas como: Citrato, Urea, SIM, LIA, TSI, y luego de 24 horas de incubación, se procedió a la respectiva lectura.

2.3. Antibiograma

2.3.1. Método de Difusión en Agar

La susceptibilidad bacteriana se determinó mediante el método de difusión en disco en agar Mueller Hinton mediante la técnica de Bauer y Kirby con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland a una temperatura $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2012).

Los antibióticos analizados fueron: amoxicilina más ácido clavulánico, aztreonam, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, netilmicina, ácido nalidixico, piperacilina/tazobactam, amikacina y ampicilina.

Se consideró sospechosas a las cepas que presentaron halos ($<21\text{mm}$) para las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima), ($<15\text{mm}$) en ceftazidima y ($<20\text{mm}$) en carbapenémicos, fueron sometidas a las pruebas confirmatorias respectivas.

2.4. Detección Fenotípica de β -lactamasas.

2.4.1. Detección de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

2.4.1.1. Prueba de sinergia de doble disco

La prueba de sinergia de doble disco se fundamentó en situar un disco con amoxicilina-ácido clavulánico próximo a discos de ceftazidima (30 μg), cefotaxime (30 μg) y aztreonam (30 μg). La presencia de BLEE se determinará por el efecto sinérgico del inhibidor y de los discos, observándose un efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano.

2.4.1.2. Prueba de discos combinados con inhibidor (prueba confirmatoria)

Este método consiste en comparar los halos de inhibición de las cefalosporinas de tercera generación, con y sin inhibidor de betalactamasas, ceftazidima (30 μg), ceftazidima /ácido clavulánico (30/10 μg) y cefotaxima (30 μg), cefotaxima /ácido clavulánico (30/10 μg).

Se consideró que la prueba es positiva si es que observó un incremento de diámetro de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en presencia de ácido clavulánico > 5mm respecto al de cefotaxime o ceftazidima sin ácido clavulánico.

2.4.2. Detección fenotípica de AmpC.

2.4.2.1. Detección de β -lactamasas tipo AmpC constitutiva.

Para la detección de betalactamasas tipo AmpC se realizó la prueba de sinergia de doble disco; se situó un disco con ceftriaxone (30 μ g) y un disco con ceftazidima (30 μ g) a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con ácido borónico (30 μ g).

La producción de AmpC se demuestra por la ampliación del halo de inhibición de cualquiera de los indicadores por la acción del inhibidor.

2.4.2.2. Detección de β -lactamasas tipo AmpC Inducible.

Para la detección fenotípica de betalactamasa tipo AmpC inducible se realizó la prueba de aproximación de discos; que consiste en situar un disco betalactámico inductor débil (cefotaxima, ceftazidima y aztreonam) cercano a un betalactámico inductor fuerte (imipenem, cefoxitina). El achatamiento del halo del betalactámico inductor débil en la zona adyacente al del inductor fuerte demuestra la expresión inducible de la betalactamasa.

2.4.3. Detección fenotípica de carbapenemasas.

2.4.3.1. Test de Hodge modificado

El test de Hodge modificado es la técnica que el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para la detección fenotípica de carbapenemasas.

Inoculamos la placa de Mueller-Hinton con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 siguiendo las recomendaciones para técnica de difusión en disco recomendadas por el CLSI 2012.

Colocamos en el centro de la placa un disco de imipenem, luego estriamos la muestra estudio desde el borde a la placa hacia el centro de la misma sin llegar a tocar el disco. Se considera positivo por el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 en la parte de intersección entre el halo de inhibición que genera la difusión del antibiótico y la estría de la cepa que era objeto de nuestro estudio, formándose así una hendidura en la parte próxima al disco. Esto pone en evidencia la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que han sido liberadas al medio permitiendo así el crecimiento de *Escherichia coli*.

2.5. **Análisis Estadístico.**

Para el análisis de datos se realizó un proceso de recopilación, análisis de la información relacionada con la resistencia a los agentes antimicrobianos más relevantes.

Para la determinación de los porcentajes de resistencia y sensibilidad se utilizó el programa WHONET (World Health Organization. Net. Versión 5.4), que nos permitió establecer las resistencias a los antibióticos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba del Chi-Cuadrado (X^2) de Pearson, utilizando el programa SPSS para Windows.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

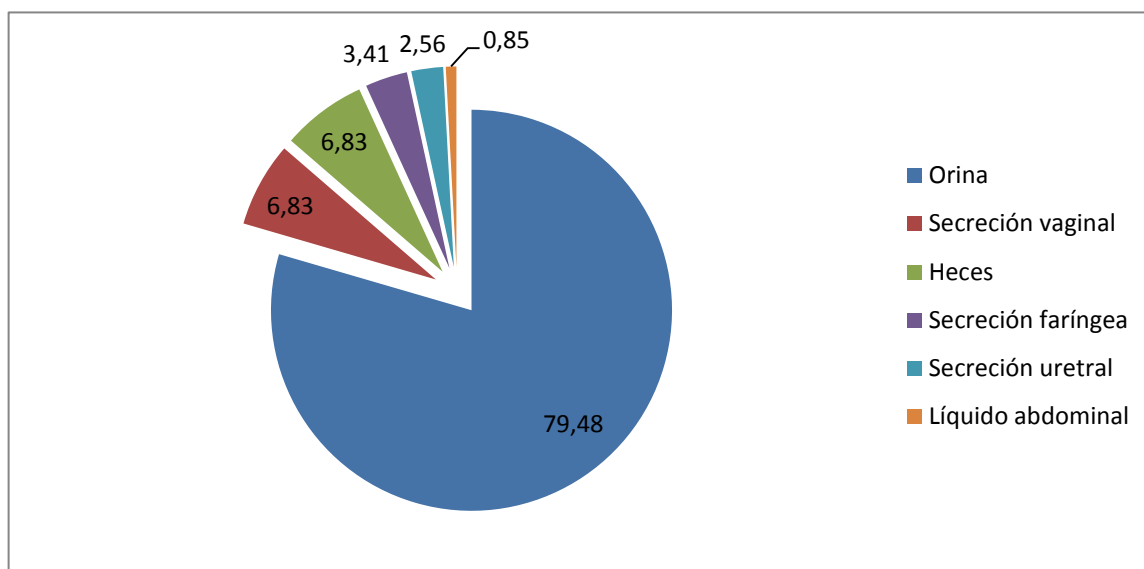
El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la frecuencia de los mecanismos de resistencia en nuestra localidad, en el cual se analizaron 117 cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros”, durante el período octubre-noviembre de 2013. Según las muestras analizadas se determinó que el 79,48% corresponde a orina, seguido de 6,83% secreción vaginal y heces, 3,41% secreción uretral, 2,56% secreción faríngea y 0,85% líquido abdominal (Tabla y gráfica 1).

Tabla 1. Frecuencia de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013

MUESTRAS	FRECUENCIA	%
Orina	93	79,48
Secreción vaginal	8	6,83
Heces	8	6,83
Secreción uretral	4	3,41
Secreción faríngea	3	2,56
Líquido abdominal	1	0,85
TOTAL	117	100

Elaborado por: Yomaira Malla

Gráfica 1 Porcentaje de tipo de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013



Elaborado por: Yomaira Malla

Las características epidemiológicas de las infecciones urinarias contribuyen a que este tipo de afecciones sean foco de investigación constante, así como también considerando que es la causa de muchas hospitalizaciones, prescripción de medicamentos y complicaciones de

pacientes con enfermedades crónicas. Por su incidencia elevada, estas infecciones son importantes por su morbilidad, puesto que la infección evoluciona, por el fracaso diagnóstico y/o terapéutico que puede conducir a la aparición de una pielonefritis crónica (Novoa, 2012).

Alvarado (2014) en Loja, realizó un estudio en dos instituciones, Hospital del Día (IESS), y Clínica Maternidad Julia Esther González encontrando una frecuencia de urocultivos del 95% y 90% respectivamente.

En un estudio similar realizado en Cuenca por Sanchez *et al.* (2010), en dos instituciones, Hospital Vicente Corral Moscoso se encontró: que 52,0% corresponde a orina, seguido de secreción vaginal y heces, del mismo modo en el Hospital José Carrasco Arteaga, la muestra de orina corresponde 56,8%, seguido de secreción vaginal y heces.

En investigaciones a nivel de Latinoamérica se encontraron resultados similares, como en Perú en un estudio realizado por Paredes (2013), en donde reportó: orina 86,4%, secreción vaginal 11,7%, heces 0,6%. De manera semejante en Guatemala, Nájera (2005), identificó que los urocultivos son la muestra más frecuente (n= 349), seguido por secreciones vaginales (n=14), secreciones uretrales (n=1) y secreciones faringéas (n=10).

Por otra parte en España, en una investigación realizada por García, *et al.* (2005), determinaron que la infección urinaria es la más frecuente con un porcentaje de 92,4%. Por tal razón es evidente que la gran mayoría de las infecciones del tracto urinario son causadas por bacterias que se originan de la flora intestinal normal del mismo individuo. Sin embargo, el espectro de los agentes etiológicos depende, en gran parte, si la infección es de origen comunitario o de origen nosocomial.

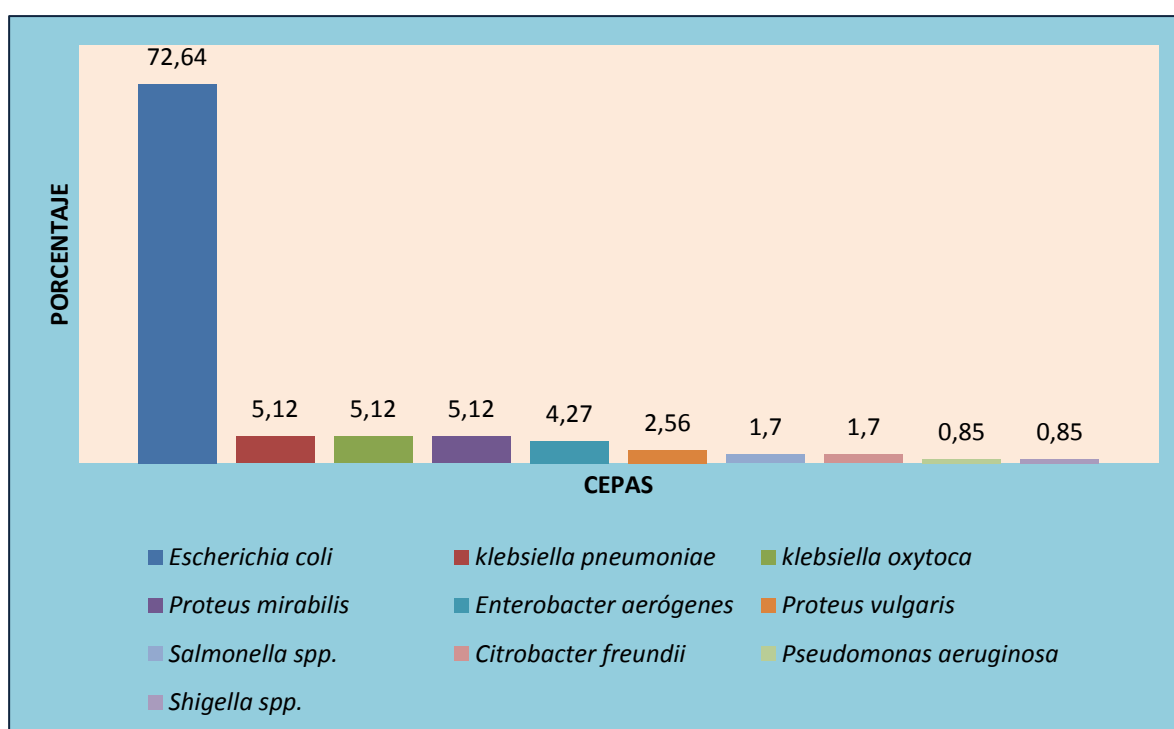
Por ende las cepas aisladas con mayor frecuencia de muestras clínicas que encontramos en este estudio fueron:

Tabla 2. Frecuencia de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013.

CEPA	FRECUENCIA	%
<i>Escherichia coli</i>	85	72,64
<i>klebsiella pneumoniae</i>	6	5,12
<i>klebsiella oxytoca</i>	6	5,12
<i>Proteus mirabilis</i>	6	5,12
<i>Enterobacter aerógenes</i>	5	4,27
<i>Proteus vulgaris</i>	3	2,56
<i>Salmonella spp.</i>	2	1,7
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,85
<i>Shigella spp.</i>	1	0,85
TOTAL	117	100

Elaborado por: Yomaira Malla

Gráfica 2 Porcentaje de cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013



Elaborado por: Yomaira Malla

La cepa aislada con mayor frecuencia fue *Escherichia coli* 72,64%, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis* 5,12%, *Enterobacter aerógenes* 4,27%,

Proteus vulgaris, 2,56%, posteriormente *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii* 1,7%, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella* 0,8% (Gráfica 2) (Tabla 2).

Estudios realizados en Loja por Alvarado (2014), en el Hospital del Dia (IESS), identificó: *Escherichia coli* 87%, *Klebsiella pneumoniae* 3%, *Proteus vulgaris* 2,5%, *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter freundii* 2%, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerógenes* 1% y *Pseudomonas aeruginosa* 0,4%, mientras que en la clínica maternidad Julia Esther González, determinó: *Escherichia coli* 95%, y *Proteus vulgaris* 5%. En Cuenca en un estudio similar realizado por Alvarado *et al.* (2011), identificó que en el Hospital Vicente Corral la cepa más prevalente fue *Escherichia coli*, 35,5% y en el Hospital José Carrasco fue de 49,7%.

De la misma manera Farfán, (2012) en Perú reportó que el 76,5%, correspondía a *Escherichia coli* mientras que una investigación realizado por Gómez, *et al.* (2009) en Colombia, fue aislado en un 62,58%.

Estudios similares por Muñoz, *et al.* 2008, en Cuba, identificaron: *Escherichia coli* 71,5 %, *Proteus* sp. 9,3 %, *Enterobacter* sp. 8,8 %, *Klebsiella* sp. 5,7 % y *Citrobacter* sp. 4,7 %. Estos resultados nos revelan una alta frecuencia de *Escherichia coli*, que puede ser atribuido a la capacidad que poseen estas cepas para causar los distintos tipos de enfermedades intestinales y extraintestinales que procede de la expresion de multiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideroforos y sistemas de secrecion, entre otros. Estos factores contribuyen al aumento de eficacia en la colonizacion de superficies especificas del hospedador, evasion de las defensas inmunologicas, y daño directo a sus celulas que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Kaper, *et al.* 2004).

Las bacterias Gram negativas confieren multirresistencia a ciertos antibióticos, de las cepas aisladas se determinó el perfil de resistencia, mediante el método de difusión con discos, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012.

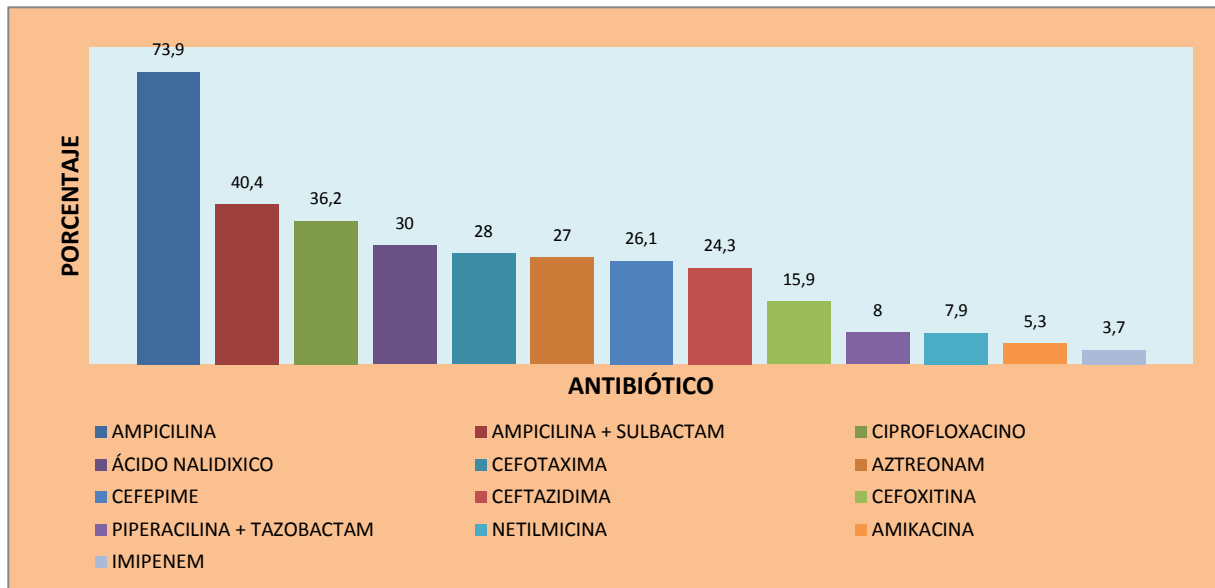
Tabla 3. Frecuencia resistencia antimicrobiana en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013

CÓDIGO	ANTIBIOTICO	PUNTOS DE CORTE	FRECUENCIA	%R
AMP	Ampicilina	16 -18	86	73,9
SAM	Ampicilina + Sulbactam	12 - 14	47	40,4
CIP	Ciprofloxacino	16 - 20	42	36,2
NAL	Ácido Nalidixico	14 - 18	35	30
CTX	Cefotaxima	23 - 25	34	29,1
ATM	Aztreonam	18 - 20	33	28,1
FEP	Cefepime	15 - 17	32	27,6
CAZ	Ceftazidima	18 - 20	30	25,4
FOX	Cefoxitina	15 - 17	19	15,9
TZP	Piperacilina + Tazobactam	18 - 20	9	8
NET	Netilmicina	13 - 14	8	7
AMK	Amikacina	15 - 16	7	5,8
IMP	Imipenem	20 - 22	4	3,7

Elaborado por: Yomaira Malla

Fuente: WHONET 5.6

Gráfica 3 Porcentaje de resistencia antimicrobiana en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013



Elaborado por: Yomaira Malla

Fuente: WHONET 5.6

Los porcentajes de resistencia obtenidos fueron: ampicilina (73,9%), seguida por ampicilina/sulbactam (40,4%), ciprofloxacino (36,2%), cefotaxima (28%), aztreonam (27%), cefepime (26,1%), ceftazidima (24,3%), cefoxitina (15,9 %), piperacilina/tazobactam (8%), netilmicina (7,9%), amikacina (5,3%), imipenem (3,7%). De los antibióticos analizados, nos

enfocamos en el porcentaje de resistencia de las cefalosporinas de tercera generación, ceftazidima (24,3%) y cefotaxima (28%), para el análisis posterior de BLEE, de la misma manera se analizó la resistencia a ceftioxitina (15,9%) para el análisis de AmpC, se observó un bajo porcentaje de resistencia a imipenem (3,7%), para el análisis de carbapenemasas mediante el test de Hodge.

En un estudio realizado en Colombia por Pérez *et al*, (2011), observaron que la resistencia más frecuente en pacientes ambulatorios fue para ampicilina (70,7 %), ciprofloxacina (41,0%). Navarro y col, (2013) en México reportó que la resistencia frente a las cefalosporinas de 3ª generación fue de 14,0%- 15,7%.

En nuestro estudio se observó resistencia a los carbapenémicos, en 4 aislamientos, resultados relacionados fueron publicados por Leal, *et al*. (2011), en Colombia en el cual se identificó 3 aislamientos resistentes a los carbapenémicos encontrándose en la comunidad respectivamente.

Sin duda los β -lactámicos son el grupo de antibióticos de mayor relevancia clínica para tratar infecciones por bacilos Gram negativos, debido a su amplio espectro, baja toxicidad y su acción principalmente bactericida, generando de esta manera un aumento en las tasas de resistencia frente a los antimicrobianos que se utilizan habitualmente, no sólo en el medio hospitalario sino también en la comunidad.

Las bacterias logran hacerse resistentes a las cefalosporinas por diferentes mecanismos, estos pueden deberse a la incapacidad del antibiótico para llegar al sitio donde ejerce su acción, o por cambios que sufren las proteínas de unión, las cuales son blanco de las cefalosporinas, y por lo tanto disminuye enormemente la afinidad del antibiótico a estas proteínas (Martínez, 2006).

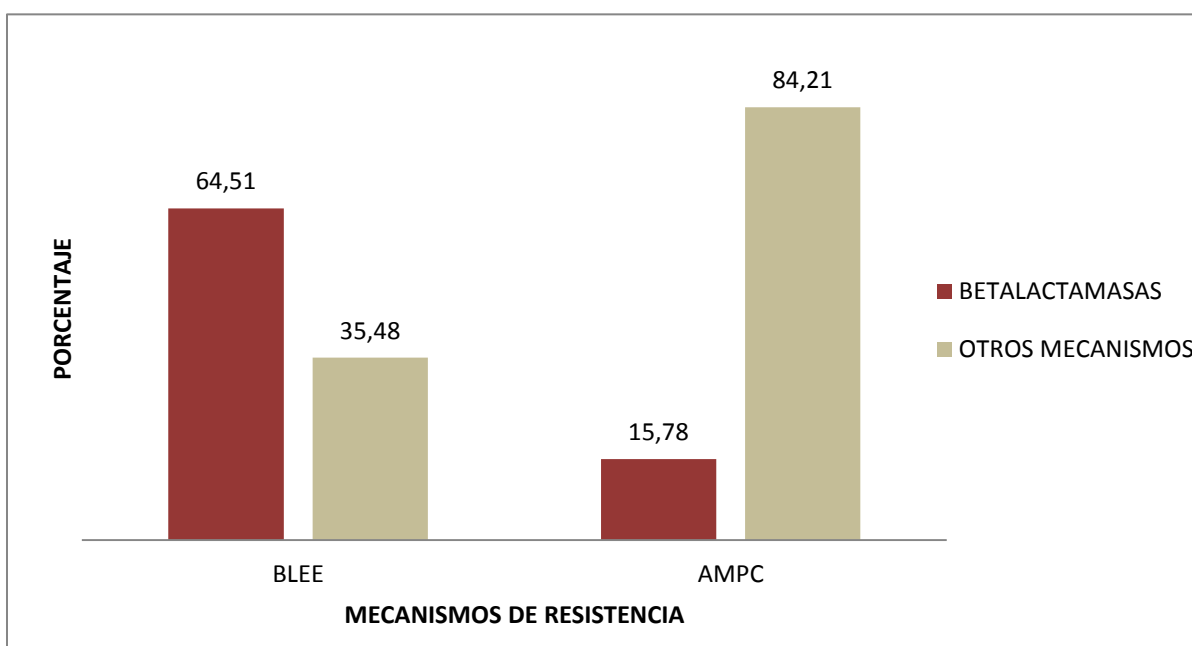
Estos determinantes de resistencia entre las poblaciones bacterianas, es consecuencia de la fuerte presión selectiva originada como resultado de la terapia antibiótica causando mecanismos de resistencia a los β -lactámicos siendo más frecuente la producción de β -lactamasas.

Tabla 4. Frecuencia de mecanismos de resistencia en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013

BETALACTAMASAS	BLEE		AMPC	
	FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%
MECANISMOS DE RESISTENCIA	20	64,51	3	15,78
OTROS MECANISMOS	11	35,48	17	84,21
TOTAL	31	100	19	100

Elaborado por: Yomaira Malla

Gráfica 4 . Frecuencia de mecanismos de resistencia en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013



Elaborado por: Yomaira Malla

En nuestro estudio se determinó que el 64,51% corresponde a β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y el 35,48% que pueden deberse a otros mecanismos de resistencia. De la misma manera se identificó que el 15,78% corresponde a β -lactamasas tipo AmpC y el 84,21% corresponde a otros mecanismos de resistencia (Gráfica 4) (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con estudios reportados por Alvarado, (2014), en el Hospital del Día (IESS), se encontró que el 63% corresponde a β -

lactamasas de tipo (BLEE), 47% que corresponde a β -lactamasas tipo AmpC y el 53% restante a otros mecanismos de resistencia.

De igual forma en la clínica Julia Esther González, se observó que 75% corresponde a cepas productoras de β -lactamasas tipo BLEE, y el 25% se puede deber a otros mecanismos de resistencia.

En un estudio similar en el Hospital Vozandes en Quito realizado por Pacheco & León, (2011), encontraron (n=56) aislamientos positivos para BLEE, el 51,8% corresponde al 2009, 23,2%, al 2007, y 7,1%, 12,5%, 5,36% a los siguientes años 2008, 2006 y 2005 respectivamente. La frecuencia de BLEE obtenida en este estudio es similar a los obtenidos en otros estudios realizados en Latinoamérica como:

En Perú en un estudio realizado por Paredes (2013) encontró una mayor proporción de enterobacterias productoras de BLEE en el medio extrahospitalario en un 91,5%.

Según Marcano y col (2011) en Venezuela reportaron que el 21,6% fueron de aislamientos positivos de BLEE de pacientes ambulatorios. Por otra parte González y col, (2013) identificaron que el 33,7% de las bacteriemias por enterobacterias productoras de BLEE son de origen comunitario, de igual manera en un estudio multicéntrico español realizado por Díaz y col, (2009), en donde el 31,5% corresponde a *Escherichia coli* productora de BLEE comunitaria. De la misma manera Villegas, *et al.* (2011) en América Latina confirmaron la frecuencia de cepas productoras de BLEE encontrándose en un 31,4% en la comunidad.

Sin embargo el incremento de BLEE en otros países europeos, como en España ha ido aumentando la aparición de enterobacterias productoras de BLEE adquiridas en la comunidad, como por ejemplo García, (2013) encontró una incidencia de BLEE de origen extrahospitalario del 64,70%.

Otro mecanismo de resistencia a esta familia de antibióticos es el mediado por betalactamasas cromosómicas AmpC, que en nuestro medio alcanza un porcentaje de 15,78%. Resultados que se encuentran altos para los encontrados en España por García, *et al.* (2005) identificaron un 0,56% de cepas productoras de AmpC en la comunidad.

Los carbapenemes son los únicos antimicrobianos que aún conservan casi total actividad sobre cepas BLEE (+), aunque ya se han aislado en nuestro país, cepas con resistencia a estas drogas, esta situación es sumamente grave ya que los carbapenemes son muchas veces las únicas alternativas frente a cepas multirresistente.

Puesto que las β -lactamasas en Gram negativos producen alto nivel de resistencia y están muy extendidas sobre todo entre las enterobacterias, algunas son de espectro ampliado y confieren resistencia a la práctica totalidad de los antibióticos β -lactámicos.

La aparición de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), determinan fenotípicamente una resistencia frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como también la presencia de β -lactamasas tipo AmpC.

Desde que se puso de manifiesto la importancia de las β -lactamasas, se buscaron inhibidores de estas enzimas, incluyéndose en este término diferentes compuestos químicos, entre los que destacan ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam, sin embargo ya se han detectado una nueva clase de β -lactamasas que confiere resistencia a estos inhibidores.

La aparición de cepas bacterianas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) constituye un problema de salud pública que afecta a todo tipo de instituciones y a la comunidad en general.

La prevalencia de microorganismos productores de BLEE es desconocida y probablemente este subestimada por las dificultades de su detección en el laboratorio. Sin embargo, queda claro que las cepas productoras de BLEE están distribuidas mundialmente y su prevalencia en aumento se ha ampliado al ámbito comunitario siendo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* los microorganismos productores de BLEE y son causa frecuente de infecciones hospitalarias y comunitaria, es importante estudiar su epidemiología ya que representan un problema creciente en las instituciones de salud (Navarro, *et al.* 2011).

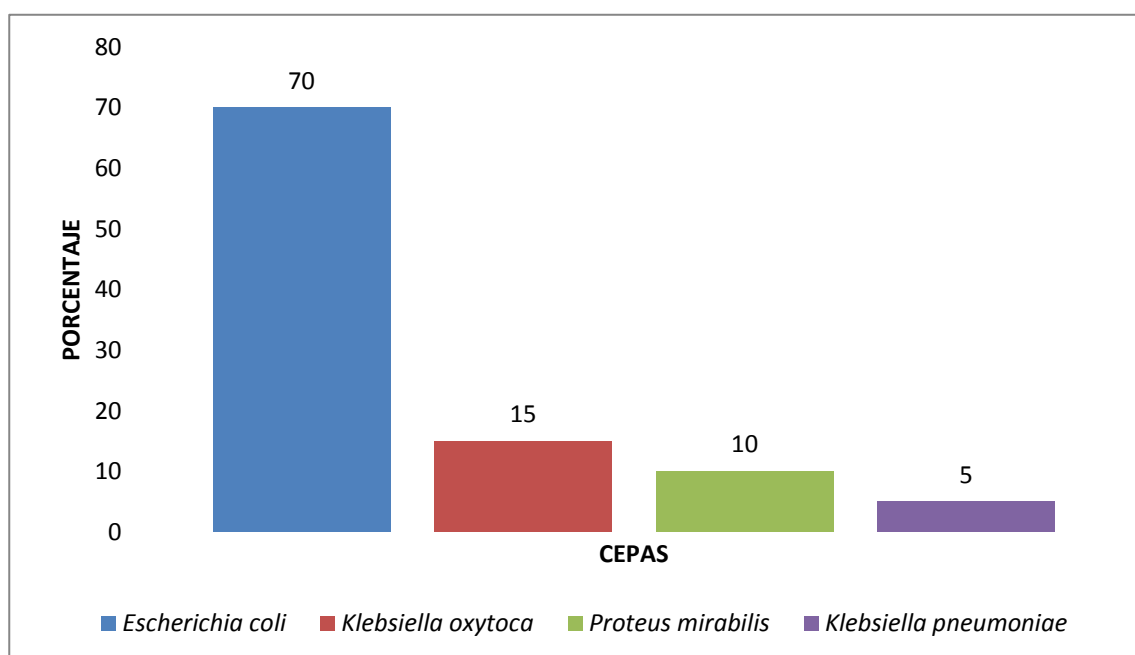
Es evidente la importancia clínica que tienen estas cepas en la comunidad, por tal razón se determinó la frecuencia de cepas productoras de BLEE, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5. Frecuencia de betalactamasas BLEE de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre-noviembre 2013

CEPA	FRECUENCIA	%
<i>Escherichia coli</i>	14	70
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	15
<i>Proteus mirabilis</i>	2	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	5
TOTAL	20	100

Elaborado por: Yomaira Malla

Gráfica 5. Porcentaje de betalactamasas BLEE de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros” durante el período octubre- noviembre 2013



Elaborado por: Yomaira Malla

Se encontró 20 cepas productoras de β -lactamasas tipo BLEE las cuales fueron sometidas a pruebas confirmatorias mediante el método de discos combinados con inhibidor, según recomendaciones del CLSI 2012, encontrándose un 70% que corresponde a *Escherichia coli*, seguido por *Klebsiella oxytoca* 15%, *Proteus mirabilis* 10 % y *Klebsiella pneumoniae* 5% (Gráfica 5) (Tabla 5), siendo estadísticamente significativos para las cepas y los mecanismo de resistencia BLEE obteniendo un valor de ($p < 0,03$).

El estudio realizado en Loja por Alvarado, (2014), en el Hospital del Día (IESS), identificó la prevalencia de cepas productoras de BLEE, siendo más frecuente *Escherichia coli* 48,7%, *Klebsiella pneumoniae* 8,6%, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerógenes* 2,8%, de manera semejante en la clínica maternidad Julia Esther González, se encontró: *Escherichia coli* 80%.

En Guatemala, en un estudio realizado por Nájera, (2005) reportó que *Escherichia coli* fue el microorganismo que se aisló con mayor frecuencia y el que presentó los mayores porcentajes de resistencia debidos a BLEE (14%) y *Klebsiella pneumoniae* (1%) encontrados en el area de consulta externa. Tal como se establece en la literatura, *Escherichia coli* puede obtener una resistencia más compleja, por medio de plásmidos provenientes de otras especies, o por mutación.

En un estudio similar realizado por Paredes (2013), en Perú reportó 80,2% corresponde a *Escherichia coli*, seguido *Klebsiella pneumoniae* 11,1%, *Proteus mirabilis* 3,7%, *Klebsiella oxytoca* 0,9%.

En España en un estudio realizado por Martin y col, (2006) reportaron que la frecuencia de BLEE en cepas de *Escherichia coli* fue de 1,8%, mientras que el 0,5% de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* fueron productores de este tipo de β -lactamasas.

Mientras que en Pakistán en un estudio realizado por Ríaz ,et al. (2012), encontró que de un total de 300 cepas bacterianas se encontró 260 *Escherichia coli* y 40 *Klebsiella spp*, de éstas el 39,27% de *Escherichia coli* y 26,10% de *Klebsiella spp* fueron productores de BLEE. Si bien la frecuencia de BLEE en enterobacterias a nivel comunitario fue relativamente alta, representa un signo de alarma ya que este tipo de mecanismo convierte a las cepas portadoras en multirresistentes debido a que afecta a todos los betalactámicos, disminuyendo así las opciones terapeuticas.

Desde el punto de vista clínico, la detección de una BLEE es importante para el éxito del tratamiento, ya que los pacientes infectados, no se les debe administrar cefalosporinas de tercera generación ni aztreonam porque conducen a un fracaso terapéutico (Scheutz , et al. 2005).

El aumento de enterobacterias productoras de BLEE ha producido a nivel local y global una selección y expansión recientes de distintos clones y elementos de transferencia horizontal; Estas enzimas se han diseminado peligrosamente en amplias regiones geográficas y el éxito de esta propagación se debe probablemente a que el gen de resistencia (blaTEM, blaSHV, entre otros) es frecuentemente transportado en plásmidos auto-transmisibles o móviles,

capaces de diseminarse horizontalmente en especies principalmente: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes*.

Esta distribución de BLEE (TEM, SHV, CTXM) refleja un cambio epidemiológico caracterizado por: a) un aumento de aislados de origen extrahospitalario, b) la asociación a infecciones urinarias y c) selección de distintas variantes de BLEE. (Silva, 2009).

A través del tiempo los patrones de resistencia han ido en aumento, inicialmente relacionados al ambiente hospitalario, estos mecanismos de resistencia están emergiendo en la comunidad, tal es el caso de las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y AmpC, aisladas en espacios extrahospitalarios como en hogares geriátricos y centros de rehabilitación. Existen ciertas enterobacterias que poseen de manera natural β -lactamasas AmpC tales como: *Enterobacter spp*, *Providencia spp*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei*. También en bacilos gramnegativos no fermentadores de lactosa como *Pseudomonas aeruginosa*, las AmpC de estos microorganismos son de naturaleza cromosómica (Flores, et al. 2013).

Tabla 6. Frecuencia de betalactamasas tipo AmpC, de cepas aisladas en pacientes ambulatorios del Hospital "Manuel Ygnacio Monteros" durante el período octubre- noviembre 2013

CEPAS	FRECUENCIA	%
<i>Proteus vulgaris</i>	1	33,3
<i>Citrobacter freundii</i>	1	33,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	33,3
TOTAL	3	100

Elaborado por: Yomaira Malla

Se estableció el porcentaje de cepas aisladas, que presentaron el mecanismo de resistencia tipo AmpC, las cuales fueron confirmados mediante la prueba de aproximación de discos, según las recomendaciones del CLSI 2012.

Se evidenció que el 33,3% corresponde a *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 7), siendo estadísticamente significativa la relación entre la presencia del mecanismo enzimático y las especies aisladas ($p < 0,04$).

En un estudio realizado por Alvarado, (2014), en Loja, en el Hospital del Día, se verificó cepas productoras de β -lactamasas tipo AmpC: *Escherichia coli* 26,9%, *Citrobacter freundii* 6,7%, *Enterobacter cloacae* 6,7%, *Proteus vulgaris* 6,7%.

En Colombia en un estudio realizado por Hoyos, y col. (2010), reportaron que de 47 aislamientos, el 4,27% se encontró en cepas de *Citrobacter freundii* productor de AmpC en la comunidad.

Marcano *et al.* (2011), en Venezuela, encontró que de 1 235 aislamientos, la frecuencia de mecanismos enzimáticos capaces de hidrolizar β -lactámicos de amplio espectro, el 4,3% corresponde a AmpC.

La detección es importante para el monitoreo de bacterias con AmpC natural que durante el tratamiento con cefalosporinas se tornan resistentes, o en casos de cepas productoras de BLEE conjuntamente con AmpC.

La inducción de la producción de AmpC, está relacionada con las vías de reciclaje del peptidoglicano; los antibióticos β -lactámicos producen rupturas en la pared, al ser su sitio blanco, obligando a las bacterias a activar la expresión de AmpC.

En las enterobacterias la expresión de AmpC se produce en baja cantidad, pero algunas mutaciones del promotor o del atenuador del gen *bla_{ampC}* causan una hiperproducción de trascendencia clínica. En *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y en otros bacilos Gram negativos no fermentadores AmpC se produce habitualmente en gran cantidad, además las mutaciones que conducen a su hiperproducción son tan frecuentes, que estas especies son naturalmente resistentes a muchos betalactámicos.

Los genes *bla_{AmpC}*, que se encuentran en el cromosoma de algunos bacilos Gram negativos, se han integrado en elementos genéticos transferibles, lo que ha permitido su difusión a microorganismos que carecen de forma natural de AmpC cromosómico o lo expresan a bajo nivel (Martínez, 2006)

Tomando en cuenta la importancia de su identificación se deberían implementar en todas las instituciones hospitalarias, métodos que permitan una manera confiable de detectar estas enzimas para evitar fracasos terapéuticos cuando se usan cefalosporinas de tercera generación, ya que ellas parecen sensibles in vitro y solo se inactivan cuando la bacteria produce la β -lactamasa de tipo inducible durante el tratamiento, aumentando la mortalidad en pacientes con cepas productoras de estas enzimas.

En nuestro estudio la prevalencia de microorganismos productores de BLEE fue de 17,09%, representado por 20 aislamientos de cultivos BLEE positivos de un total de 117 cepas, resultados que se encuentran muy elevados a los encontrados por Alvarado, (2014) en el Hospital del Día (IESS) en donde su prevalencia fue de 9,2% a nivel comunitario.

Existiendo en nuestro estudio un incremento de la prevalencia comparando con una investigación en Ecuador, en el Hospital Vozandes, señaló que la prevalencia es del 3%, con un incremento gradual, 1,1% en el 2005, 5,7% en el 2009 (Pacheco y León, 2011). Mientras que en Latinoamérica, en Colombia (2013) se detectó una prevalencia de 2,6% existiendo una diferencia geográfica comparando con países europeos muestran prevalencias de BLEE en pacientes ambulatorios de 0,2 a 3,5 % (Calderón & Keller, 2013).

CONCLUSIONES

En el estudio realizado se analizó un total de 117 cepas aisladas de pacientes ambulatorios del Hospital “Manuel Ygnacio Monteros”, al finalizar el presente trabajo investigativo se pudo concluir lo siguiente:

- Los bacilos Gram negativos que se determinaron en este estudio fueron: *Escherichia coli* 72,64%, seguido de *Klebsiella pneumoniae* 5,12%, *Klebsiella oxytoca* 5,12%, *Proteus mirabilis* 5,12%.
- El fenotipo presente fue la producción de betalactamasas entre las cuales se encontró: BLEE 64,51%, y betalactamasas AmpC 15,78%.
- Los mecanismos de resistencia encontrados fue BLEE determinándose en *Escherichia coli* 70%, de la misma manera se verificó betalactamasas AmpC, en *Proteus vulgaris*, 33,3% *Citrobacter freundii* 33,3% y *Pseudomonas aeruginosa* 33,3%.

RECOMENDACIONES

- Se debe evitar el uso de antibióticos en forma empírica o de manera irracional porque favorece la resistencia bacteriana, en especial en la población ambulatoria, dado que, nuestra investigación demuestra que las enterobacterias BLEE (+) son más frecuentes de lo que se creía entre los pacientes que no están hospitalizados y por ende, suponemos que reciben tratamiento con antibióticos inadecuados.
- Se deberían implementar métodos confiables en todas las instituciones hospitalarias y centros de salud para confirmar la producción de betalactamasas de espectro extendido y betalactamasas inducibles AmpC; conocer su prevalencia e implementar las medidas necesarias que ayuden a controlar la emergencia de cepas productoras de estas enzimas que portan resistencia a múltiples antibióticos betalactámicos y no betalactámicos.
- Proveer información que se pueda utilizar en la formulación de protocolos de vigilancia epidemiológica para resistencia antimicrobiana dentro de la institución, con el fin de concientizar al personal hospitalario para que colaboren a disminuir la resistencia antimicrobiana dentro de la comunidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, C. (2014). Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes del Hospital del Día y Clínica Maternidad Julia Esther Gonzales durante el periodo agosto-noviembre 2013. Tesis de grado no publicada. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.
- Alvarado, S. Guzmán, F. Saquipa, W. 2011. Caracterización y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos en los Hospitales Vicente Corral Moscoso y José Carrasco Arteaga. Cuenca, 2008-2009. Tesis de grado obtenido no publicada. Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Arias, C., Panesso, D., Zúñiga, M., (2003). Guías para el uso racional de antibióticos β -lactámicos: mecanismos de resistencia y su interpretación clínica. *Biomédica*, junio, año/vol. 23, número 002.
- Barcelona, L., Marin, M., Stamboulia, D., (2008). Betalactámicos con inhibidores de Betalactamasas Amoxicilina- Sulbactam. Fundación Centro de Estudios Infectológicos (FUNCEI); *Buenos Aires* 68:65-74.
- Benavides Plascencia, Lilia. Aldama, A. Vázquez, H. 2005. Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 47(3), 219-226.
- Blanco, M & Carmona, A. (2009). Manejo de las infecciones por organismos multirresistentes. Manejo de las infecciones por organismos multirresistentes. CicSati2009.
- Blango, M & Mulvey, M. (2010) Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 1855-1863.
- Cabrera, C. Gómez, R. Zúñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.* vol.38 no.2 Cali Jan./Mar. 2007. ISSN 1657-9534.
- Carrillo, A. & García, A., (2008). Betalactamasas De Espectro Extendido Importancia Clínica. *Comité de Formación Continuada Asociación Española de Biopatología Médica*.
- Cars, O., (2008). “La resistencia bacteriana, una amenaza subestimada contra la salud pública” Taller-Seminario Internacional Restablecer la salud de los ecosistemas para contener la resistencia bacteriana, 12-21.
- Casal, M., Causse, M., Rodriguez, F., Casal, M., (2012). Resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Hospital Reina Sofía. *Servicio de Microbiología y Parasitología, Córdoba (España)*.

- Cwi, S. Mikkelsen, K. Patrone, U. Rondinone, S. 2007. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9a Edición. Madrid- España.
- Cwi, S., Frydman, J., Klajn, D., Rondinone, S., Tzal, K., 2008. Urología. Editorial Médica Panamericana. 9a Edición. Buenos Aires- Argentina.
- Díaz, A., Hernández, R., Martínez, L., Rodríguez, A. (2009) Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE2006) Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27(9):503–5106. European Centre for Disease
- Faleiro, P. (2009). Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis de grado obtenido no publicada. Madrid.
- Farfán Ochoa, M. (2012). Etiología y sensibilidad antimicrobiana de gérmenes causantes de infecciones del tracto urinario en pacientes ambulatorios del Hospital Octavio Mongrut-Es Salud en el periodo enero - diciembre 2010. Tesis de grado obtenido no publicada. Universidad Nacional mayor de San Marcos facultad de medicina humana. Perú.
- Ferrero, S., (2005). Incidencia y resistencia de bacilos gram negativos no fermentadores. Hospital Escuela José F. de San Martín - Rivadavia 1250 – Corrientes (3400) Argentina.
- Flores, A., Gómez, C., Beltran, J., (2013). Factores de Riesgo para Infección de Vías Urinarias por enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido O AmpC adquiridas en la Comunidad. Tesis de grado no publicada. Fundación Cardioinfantil – Instituto De Cardiología Departamento De Medicina Interna E Investigaciones Bogotá, Colombia 2013.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., (2009) .Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 12a Edición. España.
- Garcia, M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia Sanidad Militar. Vol. 69 no 4. España.
- García López, M., Gallardo, M., Rodríguez, R., Roperio, F. Granados, V., Ramos, M., Gutiérrez, A., Pinedo, A. (2005). Distribución de los patrones de sensibilidad de *Escherichia coli* intrahospitalario y extrahospitalario y los fenotipos de resistencia asociados durante el año 2005. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21(3):157-165.
- Gómez, C., Plata, M., Sejnauí, J., Rico., C. Vanegas, S. (2009). Resistencia de la *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes con sospecha de infección urinaria intra

- y extra-hospitalaria en la Fundación Santa Fe de Bogotá. *urol.colomb.* Vol. XVIII, No. 1: pp 53-58, 2009.
- González, F., Castón, J., Porras, L., Ros, J., Portillo, J., Martínez, J., Romero, M., Rocha, I., Clemente, I., Monroy, C., Gijón, J., (2013, 21 de diciembre). Epidemiología, características clínicas y factores pronósticos de los episodios de bacteriemia causados por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Apuntes de Ciencia. Boletín científico del HGUCR.*
 - Giovanniello, O., Klajn, D., Pertierra, A., Preciado, M., Rondinone, S., (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico.* Editorial Médica Panamericana. 6ta Edición. Buenos Aires- Argentina.
 - Guerreiro, S & Raigoza, M. (2009). Conocimientos, actitudes y prácticas sobre antibióticos por parte de la población adulta del barrio Nuevo Kennedy, Bogotá, primer semestre, 2009. Tesis de grado no publicada. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
 - Guevara, A., Machado, S., Manrique, E., (2011). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: epidemiología, resistencia a los antimicrobianos y opciones terapéuticas. *Kasmera (2): 87 - 97, 2011.* Venezuela.
 - Guirao X., Arias J., Badía J., García J., Mensa J. Álvarez F. Borges M. Barberán J., Maseda E., Salavert M., Linares P., Gobernado M., García C. 2009. Recomendaciones en el tratamiento antibiótico empírico de la infección intra-abdominal. España. *Rev Esp Quimioter.* 2009, vol. 22, nº3, p. 151–172.
 - Hoyos, A., Serna, L., Atehortúa, P., Ortiz, G., Calderón, J., (2010, 27 de septiembre). Infección urinaria de la comunidad en pacientes pediátricos de la Clínica Universitaria Bolivariana. Etiología, presentación clínica, factores de riesgo y respuesta clínica a la terapia empírica inicial. *Medicina UPB* 29(2): 89-98.
 - Leal, A., Cortés, J., Arias, G., Ovalle, M., Saavedra, S., Buitrago, G., Escobar, J., Castro, B., & GREBO. (2012, 11 de abril). Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacteriaceae* causantes de infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. © 2011 Elsevier España, S.L.
 - Lindsay, N. (2011) Antimicrobial Resistance. USA. *European Infectious Disease.* 2011, vol. 5, nº 2, p. 927.
 - Lister, P., Wolter, D., Hanson, N. 2009. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *American Society for Microbiology.* 582-610.

- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature 2004, 2:123-140.
- Keller, L & Calderón, C. (2013). Prevalencia de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorios. Fares Taie Instituto de Análisis. ISO 9001- iso 14001. Argentina.
- Manguiña, C., Ugarte, C., Montiel, M., (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Med Per.* 23(1).
- Marcano, D., Jesús, A., Hernández, L, Torres, L. (2011). Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Publica* 30(6), 2011.
- Marín, M. Gudiol, F. 2002. Antibióticos Betalactámicos. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.
- Martín, C., Gil, A., Mazón, A. (2006). Etiología y sensibilidad antibiótica de las infecciones extrahospitalarias más frecuentes. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2006; 29 (1): 27-36.
- Martínez, L. (2006, octubre). Mecanismos de adquisición de resistencia a los antibióticos. *Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.* España
- Mattar S., & Martínez P. (2007). Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE): Detección, impacto clínico y epidemiología. Colombia. *Infectio.* 2007, vol.1, nº 1, p. 23-35.
- Merino, L & Losch, L. (2005). Familia *Enterobacteriaceae*. Universidad Nacional del Nordeste- Facultad de Medicina- Microbiología e Inmunología. 2280-5061, 8938-0730.
- Morales, G., Bolaños, C., Larrazábal, T. (2011, 27 de mayo). Enterobacterias aisladas en un centro Hospitalario de la ciudad de Valledupar y Frecuencia de Betalactamasas de espectro extendido y Betalactamasas Inducibles. *Biociencias Volumen 6, Número 2 , 33 - 40 , Julio-Diciembre 2011.* Universidad Libre Seccional Barranquilla.
- Muíñoz, J., Alvarez, E., Caravia, I., Peña I., (2008, 22 de agosto). Resistencia a antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario inferior adquiridas en la comunidad: diferencias en relación con la edad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 39, No. 3, 2008.*

- Muzachiodi, M & Ferrero, S. (2005). Incidencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Universidad nacional del nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005.
- Nájera Ceron, M. (2005). Determinación de β -lactamasas de amplio espectro (BLEA) y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias provenientes de la unidad periférica del instituto guatemalteco de seguridad social de la zona 1. Tesis de grado obtenido no publicado. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Navarro, F. Calvo, J. Cantón, R. Fernández, F. Mirelis, B. Navarro, F. 2011. Detección Fenotípica de mecanismos de resistencia en gram negativos. Procedimientos en Microbiología Clínica.
- Navarro M., Robles R., Garibay A., Ruiz E. (2011) *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de beta-lactamasas en hospitales de Hermosillo. Mexico. Sonora.salud pública de México. 2011, v. 53, n° 4, p. 341-344.
- Novoa, R. (2012, Noviembre). Patrones de resistencia bacteriana en infecciones urinarias en pacientes ambulatorios. JAVESALUD IPS. 2011-2012. Tesis de grado no publicada. Universidad del Rosario.
- Ochoa, C., Eiros, J., Pérez, M., (2005). Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. 18(2).
- Pacheco, M & León, E., (2011). Epidemiología de las infecciones por microorganismos productores de BLEE en el Hospital Vozandes Quito entre los años 2005 – 2009. Ecuador. Revista Médica Vozandes. 2011, vol. 22, n° 1, p. 15-21.
- Paredes Gago, R., (2013). Prevalencia de *enterobacteriaceas* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en la clínica Good Hope durante el periodo marzo – agosto del 2012. Tesis de grado obtenido no publicado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima- Perú.
- Pak-Leung H., River, W., King-Sun, Y., Shee-Loong, L. (2007). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates from women: emerging multidrug resistance phenotypes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2007; 59: 439–445.
- Pérez, N., Pavas, N., Rodríguez, E., (2011, 3 de agosto). Resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* con betalactamasas de espectro extendido en un Hospital de la Orinoquia colombiana. *Facultad de Medicina, Villavicencio, Colombia. Infectio*. 2011; 15(3): pp 147-154.

- Prats, G. (2007). Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España.
- Puerta, A & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete. *España.Medicine*. 2010; 10 (51):3426-31.
- Quizhpe, A., Murray, M., Muñoz, G., Peralta, J., Calle, K., (2011). Recuperar la salud integral y la armonía de los ecosistemas, para contener la resistencia bacteriana a los antibióticos. *ReAct Acción frente a la resistencia bacteriana latinoamericana*.
- Riaz, S., Faisal, M., Hasnain, S. (2012). Prevalence and comparison of Beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp from clinical and environmental sources in Lahore, Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*. 2012, v. 6, n° 2, p. 465- 470.
- Rivas, K., Rivas, M., Dávila, E., Rodríguez, M. 2006. Cefalosporinas de la primera a la cuarta generación. RFM v.25 n.2 Caracas dic. 2006.
- Rodriguez, J., Arslan, H., Pitout, J., Quentin, C., Calbo, Esther. A. 2009. Multinational Survey of Risk Factors for Infection with Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Enterobacteriaceae* in Nonhospitalized Patients. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49:000–000.
- Romero Cabello, R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana. Editorial Médica Panamericana. 3^{era} Edición. México.
- Salazar, E & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter* spp: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v.25 n.2 Caracas feb. 2005
- Sanabria, G. (2003). Evolución de la resistencia en el *Staphylococcus*. Departamento de Investigación y Docencia del IMT. Asunción – Paraguay. *Rev. Inst. Med. Trop.* Vol 3(2) 27-39.
- Sánchez Alvarado, D. Carrasco, M. Campoverde, M. 2010. “Caracterización y resistencia de *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter* en 1000 cultivos primarios en pacientes de los hospitales Vicente corral Moscoso y José Carrasco Arteaga. Cuenca, 2008-2009.” Tesis de grado obtenido no publicado. Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Scheutz, F., Strockbine, N., Genus, I. (2005) *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941TAL In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., Bergey's Manual Trust USA 2005, 607-624.
- Schwaber, M., Navon, S., Schwartz, D., Carmeli, Y. (2005). High levels of antimicrobial coresistance among extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2137-9.

- Silva Novais, A. (2009, Diciembre). Unidades de captura y dispersión génica en la evolución de las betalactamasas de espectro extendido. Departamento de microbiología. Hospital universitario Ramon y Cajal. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Suárez, C., Kattán, J., Guzmán, A., Villegas, M., (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM, Avenida 1N # 3-03, Cali, Colombia.*
- Tafur, J., Torres, J., Villegas, M., (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Centro Internacional de Investigaciones Médicas, *CIDEIM, Cali. Colombia.*
- Valle, D., (2009). Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología- ISSN 1315-2556.*
- Villarroel Flores, Y. (2012). Frecuencia de Aislados de *Escherichia Coli* productoras de Betalactamasas de Espectro Expandido en secreciones vaginales de pacientes que acuden a la consulta externa de la Maternidad San José, San Félix, Estado Bolívar. Tesis de grado no publicada. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre. Venezuela.
- Villegas M., Guzman B., Sifuentes O., Rossi F. (2011). Increasing prevalence of extended-spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America – 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011, vol. 15, n° 1. P. 34-39.

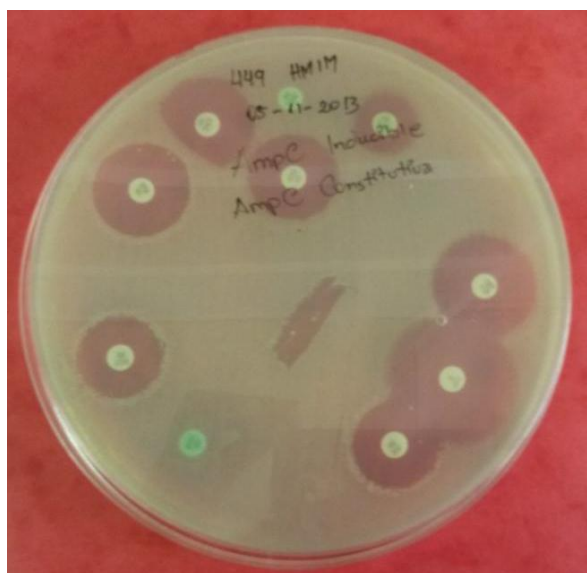
ANEXOS



Anexo 1. Prueba de confirmación de BLEE.
CAZ 18 mm; CAZ-CLA 22 mm
CTX 12 mm; CTX-CLA 20 mm



Anexo 2. Prueba de confirmación de BLEE.
CAZ 20 mm; CAZ-CLA 25 mm
CTX 12 mm; CTX-CLA 23 mm



Anexo 3. Prueba de aproximación de discos AmpC
Inducible.
IMP: imipenem (10µg), CAZ: ceftazidima (30µg).