



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

**Frecuencia y subtipos del gen blaCTX-M en
enterobacterias productoras de BLEE aisladas de
urocultivos en el Instituto Nacional de Enfermedades
Neoplásicas de enero a diciembre del 2017**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Delia Consuelo CHÁVEZ HIDALGO

ASESOR

Carlos Raúl SEVILLA ANDRADE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Chávez, D. Frecuencia y subtipos del gen blaCTX-M en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de enero a diciembre del 2017 [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor: 0000-0002-2771-421X

Código ORCID del asesor o asesores: 0000-0001-9938-9922

DNI del autor: 73621961

Grupo de investigación: Resistencia a los antimicrobianos-MICRESIS-VRIP-UNMSM

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: Círculo para la Investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer en Perú financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC)

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas:

Av. Angamos Este 2520, Surquillo 15038, Lima-Perú

12° 6' 45.802" S 76° 59' 53.179" W

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2017



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
 Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica



"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN E IMPUNIDAD"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

- Presidente: Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas
 Miembros: Lic. Boris Moisés Valdivia Vizarraga
 Lic. Pilar Fernanda Alva Betalleluz
 Asesor : Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 09 de diciembre del 2019, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"FRECUENCIA Y SUBTIPOS DEL GEN BLACTX-M EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE AISLADAS DE UROCULTIVOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS DE ENERO A DICIEMBRE DEL 2017"**, para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Señorita:

DELIA CONSUELO CHÁVEZ HIDALGO

Habiendo obtenido el calificativo de:

..... 18
 (En números)

..... DIECIOCHO
 (En letras)

Que corresponde a la mención de: MUY BUENO

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....
 Presidente
 Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas

.....
 Miembro
 Lic. Boris Moisés Valdivia Vizarraga

.....
 Miembro
 Lic. Pilar Fernanda Alva Betalleluz



.....
 Asesor (a) de Tesis
 Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade

Dedicatoria

A mi familia,

A mis padres por su arduo trabajo

A mis hermanos por su inmutable afecto

A ellos va dedicado todo.

Agradecimientos

A mis padres por todo el apoyo brindado, por su amor, paciencia y comprensión. Gracias a mis hermanos por el aliento inquebrantable.

A mi familia y amigos por su confianza en mí.

Al Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade, por su asesoría, tiempo, confianza y apoyo para el desarrollo y culminación de este trabajo.

Al Dr. Jorge Alarcón Villaverde, Director Ejecutivo del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM.

A la Mg. Milagros Zavaleta Apéstegui, Coordinadora del CITBM y a todo el equipo del laboratorio de Epidemiología y Genética –LEMYG, por sus recomendaciones, sugerencias y facilidades para la realización de este trabajo.

A la Lic. Laura Jara Vidalon, por su amistad y apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Miguel Sandoval, Lic. Pilar Alva y Lic. Boris Valdivia, miembros del jurado de sustentación, por sus recomendaciones para la mejora del presente trabajo de investigación.

A la Srta. Ortiz Huiza Renatta Rebeca Rafaella, estudiante de Lingüística de la Facultad de Letras de la UNMSM, por las sugerencias en la redacción de esta tesis.

Y a cada persona que me ayudó en la ejecución de este trabajo.

Al Proyecto “Vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes en infecciones asociadas a la atención en salud en los servicios de hospitalización del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas” del “Círculo para la Investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer en Perú” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).

Al Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM, por el apoyo brindado a través de sus investigadores y soporte tecnológico.

Al Grupo de Investigación “Resistencia a los antimicrobianos- MICRESIS” del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el apoyo brindado en asesoría y recursos.

ÍNDICE

RESUMEN	IX
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 DESCRIPCIÓN DE ANTECEDENTES	3
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.3 OBJETIVOS	6
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	6
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
1.4 BASES TEÓRICAS	6
1.4.1 BASE TEÓRICA	6
1.4.1.1 GENERALIDADES DE INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO	6
1.4.1.2 INFECCIONES URINARIAS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS	7
1.4.1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA	7
1.4.1.4 B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO	8
1.4.1.5 BLEE TIPO CTX-M	11
1.4.1.6 DETECCIÓN DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO	17
1.4.1.7 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	23
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	26
1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	26
CAPÍTULO II: MÉTODOS.....	28
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO	29
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACION	29
2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	29
2.1.3 POBLACIÓN	29
2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO	29
2.1.5 VARIABLES	30
2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	31
2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	31
2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS	33

CAPÍTULO III: RESULTADOS	35
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	48
4.1 DISCUSIÓN	49
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
5.1 CONCLUSIONES	56
5.2 RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	64

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación de las enzimas β -lactamasas según Bush-Jacoby.
- Tabla 2.** Principales familias y grupos de β -lactamasas de espectro extendido, tipo de BLEE y país de emergencia.
- Tabla 3.** Subtipos *bla*_{CTX-M} y sus principales enzimas.
- Tabla 4.** Criterios para tamizaje de β -lactamasas de espectro extendido en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *P. mirabilis*.
- Tabla 5.** Clasificación de antibióticos betalactámicos.
- Tabla 6.** Distribución de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según sexo.
- Tabla 7.** Distribución de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según grupo etario.
- Tabla 8.** Distribución de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según servicio de procedencia.
- Tabla 9.** Frecuencia de neoplasias según sitios de origen de los pacientes hospitalizados del INEN.
- Tabla 10.** Distribución del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según género bacteriano.
- Tabla 11.** Distribución de los subtipos *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según género bacteriano.
- Tabla 12.** Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de enterobacterias productoras de BLEE gen *bla*_{CTX-M} negativo.
- Tabla 13.** Relación entre la presencia del gen *bla*_{CTX-M} y el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN.

Gráfico 2. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de enterobacterias productoras de BLEE portadoras del gen *bla*_{CTX-M}.

RESUMEN

Introducción: Las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en particular las BLEE tipo CTX-M, se han extendido rápidamente por todo el mundo y representan una gran amenaza para las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), principalmente para las infecciones del tracto urinario que causan complicaciones en la condición clínica de pacientes hospitalizados, así como la prolongación de la estancia hospitalaria y los gastos que esta representa. Debido a que las infecciones urinarias provocadas por enterobacterias productoras de BLEE son comunes y significativas en la práctica clínica, es esencial una correcta identificación; por lo tanto, es importante determinar la frecuencia del gen *bla*_{CTX-M} y sus subtipos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9} en las enterobacterias aisladas de las orinas de pacientes hospitalizados del INEN durante el 2017. **Diseño:** Observacional, descriptivo y de corte transversal. **Objetivo:** Determinar la frecuencia y subtipos del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos en el INEN de enero a diciembre del 2017. **Métodos:** Se estudiaron un total de 57 aislados de enterobacterias productoras de BLEE de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN durante enero a diciembre del 2017. A todos los aislados se les realizó la detección de los genes *bla*_{CTX-M} y los subtipos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9} mediante un PCR convencional. **Resultados:** De las 57 enterobacterias productoras de BLEE de urocultivos que fueron analizadas el 63,2% correspondieron a *E. coli* (36/57); 33,3%, a *K. pneumoniae* (19/57) y 3,5%, a *P. mirabilis* (2/57). Por otro lado, el 87,7% de las enterobacterias productoras de BLEE presentaron el gen *bla*_{CTX-M}; entre estas: el 82% perteneció al subtipo *bla*_{CTX-M-1}; 16%, al subtipo *bla*_{CTX-M-9} y el 2%, al subtipo *bla*_{CTX-M-2}. Respecto al perfil de susceptibilidad a los antibióticos, se observó una alta resistencia a la CRO (98,2%), CIP (91,2%) y CAZ (59,6%); se encontraron 4 aislados resistentes a carbapenémicos. Se observó mayor sensibilidad para amikacina (98,2%). **Conclusiones:** Se demostró una alta frecuencia (87,7%) del gen *bla*_{CTX-M} entre las enterobacterias productoras de BLEE, siendo el subtipo predominante el subtipo *bla*_{CTX-M-1}, seguido del subtipo *bla*_{CTX-M-9} y subtipo *bla*_{CTX-M-2} con menor frecuencia. Se observó asociación entre la presencia del gen *bla*_{CTX-M} con el perfil de susceptibilidad a gentamicina, ceftriaxona y ciprofloxacina. **Palabras clave:** Enterobacterias, urocultivo, paciente oncológico, BLEE, *bla*_{CTX-M}, subtipos CTX-M.

ABSTRACT:

Introduction: ESBL-producing enterobacteria, particularly CTX-M type ESBLs, have spread rapidly throughout the world and represent a major threat to health-associated infections, mainly urinary tract infections that cause complications in the clinical condition in hospitalized patients, as well as the length of hospital stay and the expenses it represents. Because urinary infections caused by ESBL-producing enterobacteria are common and significant in clinical practice, a correct identification is essential; therefore, it is important to determine the frequency of the *bla*_{CTX-M} gene and its *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-9} subtypes in the enterobacteria isolated from the urine of hospitalized patients of the National Institute of Neoplastic Diseases during 2017. **Design:** Observational, descriptive and cross-sectional. **Objective:** To determine the frequency and subtypes of *bla*_{CTX-M} gene in ESBL-producing enterobacteria isolated from urine cultures at the National Institute of Neoplastic Diseases from January to December 2017. **Method:** A total of 57 strains of ESBL-producing enterobacteria isolates from urine cultures of hospitalized patients of the National Institute of Neoplastic Diseases during January to December 2017 were studied. All isolates were screened for *bla*_{CTX-M} gene and *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-9} subtypes by conventional PCR. **Results:** Of the 57 ESBL-producing enterobacteria in urine cultures that were analyzed, 63,2 % corresponded to *E. coli* (36/57); 33,3% to *K. pneumoniae* (19/57) and 3,5% to *P. mirabilis* (2/57). On the other hand, 87,7% of the ESBL-producing enterobacteria presented the *bla*_{CTX-M} gene; among these: 82% belonged to the *bla*_{CTX-M-1} subtype, 16% to the *bla*_{CTX-M-9} subtype and 2% to the *bla*_{CTX-M-2} subtype. Regarding the antibiotic susceptibility profile, a high resistance to CRO (98,2%), CIP (91,2%) and CAZ (59,6%) was observed; 4 strains resistant to carbapenems were found. Greater sensitivity was observed for amikacin (98,2%). **Conclusions:** A high frequency (87.7%) of the *bla*_{CTX-M} gene was demonstrated among the ESBL-producing enterobacteria, the predominant subtype being the *bla*_{CTX-M-1} subtype, followed by the *bla*_{CTX-M-9} subtype and *bla*_{CTX-M-2} subtype less frequently. An association was observed between the presence of the *bla*_{CTX-M} gene with the profile of susceptibility to gentamicin, ceftriaxone and ciprofloxacin.

Key words: Enterobacteria, urine culture, cancer patient, ESBL, *bla*_{CTX-M}, CTX-M subtype.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE ANTECEDENTES

En los últimos años, se ha incrementado el interés por el estudio de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), debido a que este grupo de enzimas confieren resistencia a las oximino-cefalosporinas, así como a los monobactámicos. Las BLEE han generado un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en Latinoamérica; se diseminan con facilidad debido a que es mediada por plásmidos, tienen implicancias clínicas y terapéuticas que las convierte en un desafío en el tratamiento de pacientes hospitalizados⁽¹⁾.

La frecuencia de BLEE entre los aislados clínicos varía de un continente a otro; Reinert et al.⁽²⁾ reportan que la tasa más alta de producción de BLEE fue encontrada en aislamientos provenientes de América Latina (44%), comparado con Europa (13,3%) y Norte América (7,5%).

Las infecciones bacterianas se encuentran entre las complicaciones más frecuentes en pacientes con cáncer inmunosuprimidos, y están asociadas a una considerada morbilidad, mortalidad y altos costos económicos⁽³⁾. En el paciente oncológico, ciertas condiciones como obstrucción de la vía urinaria por el tumor, pacientes sometidos a procedimientos terapéuticos como radioterapia o cirugía, los hacen susceptibles a desarrollar infecciones urinarias⁽⁴⁾.

Entre los gérmenes aislados más frecuentes en pacientes oncológicos se encuentran los gramnegativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Proteus* spp.^(4,5). Estas bacterias presentan distintos mecanismos de resistencia a los antibióticos, de los cuales la modificación enzimática del antibiótico es la más importante por su fácil diseminación entre las enterobacterias. Respecto a este mecanismo de resistencia, las enzimas BLEE tipo cefotaximasas (CTX-M) son más frecuentes en la familia *Enterobacteriaceae*, siendo endémicas y predominantes en Sudamérica⁽⁶⁾.

La distribución de BLEE tipo CTX-M y sus subtipos es compleja; según Bevan et al.⁽⁷⁾ y D'Andrea et al.⁽⁸⁾ en China, Sudeste Asiático, Corea del Sur, Japón y España, el subtipo *bla*_{CTX-M-9} es frecuente, y en Sudamérica, el subtipo *bla*_{CTX-M-2} aún es significativo; pero es claro que el subtipo *bla*_{CTX-M-1} (*bla*_{CTX-M-15}) ha aumentado con el tiempo en la mayoría de los países y predomina en la mayoría de las regiones⁽⁹⁾.

En Perú se reportó sobre la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en urocultivos; Díaz et al. 2015⁽¹⁰⁾ encontró 121 aislados BLEE positivas, de los cuales el 69,5% fueron *E. coli*, 9,2%, *Klebsiella* spp., 8,6%, *Citrobacter* spp., 2,3%, *Enterobacter* spp. y 1,7%, *Proteus* spp. En cuanto a los tipos de BLEE reportados, Galván et al. 2016⁽¹¹⁾ encontraron en 53 aislamientos de *E. coli* procedentes de urocultivos que el tipo de gen *bla* más frecuente fue el gen *bla*_{CTX-M} (55%), seguido por la coexistencia de los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{TEM} (24%), gen *bla*_{TEM} (13%) y gen *bla*_{SHV} (6%).

Acerca de la frecuencia y subtipos del gen *bla*_{CTX-M} se han realizados estudios en Etiopía, Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾ encontraron que el gen *bla*_{CTX-M} estaba presente en el 95,5% (64/67) de enterobacterias productoras de BLEE provenientes de aislados clínicos y el subtipo *bla*_{CTX-M-1} fue el más frecuente con 96,9% (62/64). Así también, Xia et al. 2014⁽¹³⁾ encontraron el gen *bla*_{CTX-M} en el 98,1% (313/319) de aislamientos de urocultivos de pacientes hospitalizados en China y el 52,4% pertenecía al subtipo *bla*_{CTX-M-9} (164/313).

En Argentina, Sennati et al. 2012⁽⁹⁾ realizaron un estudio multicéntrico donde analizaron aislados clínicos de pacientes hospitalizados y ambulatorios, encontraron que el 94% (47/50) de enterobacterias productoras de BLEE poseían el gen *bla*_{CTX-M} y el 55% pertenecía al subtipo *bla*_{CTX-M-2} seguido por el subtipo *bla*_{CTX-M-1} (40%).

En Perú, los estudios realizados sobre la frecuencia de BLEE tipo CTX-M y subtipos en enterobacterias aisladas de urocultivos son pocos; a pesar de la importancia de la determinación de los subtipos *bla*_{CTX-M}, Paciel et al. 2011⁽¹⁴⁾ han reportado que en zonas endémicas del gen *bla*_{CTX-M-2} el 25% de los casos pueden ser falsos positivos para la confirmación de producción de carbapenemasas mediante el test modificado de Hodge; así mismo, inutiliza el uso de ertapenem como método de tamizaje para la detección de carbapenemasas.

Del mismo modo, reportó al subtipo *bla*_{CTX-M-1}, específicamente la variante CTX-M- 15, asociado a la clona ST131, la cual es de alto riesgo por ser de mayor diseminación, así como conferir alta tasa de resistencia a antibióticos no β-lactámicos, como quinolonas y sulfas⁽¹⁴⁾.

En el 2007 Pallecchi et al.⁽¹⁵⁾ reportaron en muestras de hisopado rectal de niños peruanos sanos: 18 aislados de *E. coli* CTX-M positivo; 12 pertenecían al subtipo *bla*_{CTX-M-9}, 4, al subtipo *bla*_{CTX-M-1} y 2, al subtipo *bla*_{CTX-M-2}. Así también, García et al. 2016⁽¹⁶⁾ encontró que, en aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE causantes de sepsis neonatal, el 57,4% (74/129) poseían el gen *bla*_{CTX-M}; secuenciaron aleatoriamente 37 aislados y encontraron que 24 pertenecían *bla*_{CTX-M-2}, 20, al subtipo *bla*_{CTX-M-1} y 4 al subtipo *bla*_{CTX-M-9}.

La necesidad de conocer la distribución del gen *bla*_{CTX-M} y sus subtipos, lleva a plantear la siguiente pregunta ¿Cuál es la frecuencia y subtipos del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de enero a diciembre del 2017?

1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Determinar la frecuencia y subtipos del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE procedentes de urocultivos de pacientes oncológicos nos permitirá obtener información que servirá para orientar el tratamiento oportuno y eficaz en dichos pacientes, lo que disminuirá la estancia hospitalaria y los gastos que esta representa; por otro lado, debido a que existen diferencias entre la prevalencia de BLEE tipo CTX-M alrededor del mundo, es necesario determinar la situación en Perú para mejorar la implementación de medidas de control de infecciones impidiendo así la diseminación del gen *bla*_{CTX-M}^(7,17).

Asimismo, es importante en la vigilancia epidemiológica de los mecanismos de resistencia, con lo cual se cumpliría con una de las directivas propuestas por la Organización Mundial de la Salud contra la resistencia a los antibióticos⁽¹⁸⁾.

De igual manera, determinar la distribución de los principales subtipos del gen *bla*_{CTX-M}: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9}, en enterobacterias en Perú que a la actualidad es escasa^(15,16), permitirá optimizar la implementación de medidas de control de infecciones entre los pacientes hospitalizados⁽¹⁴⁾.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia y subtipos del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de enero a diciembre del 2017.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia de los subtipos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9} del gen *bla*_{CTX-M} en los aislados de urocultivos.
- Determinar la distribución del gen *bla*_{CTX-M} y subtipos según sexo, edad, servicio de procedencia y diagnóstico oncológico.
- Determinar la distribución del gen *bla*_{CTX-M} y subtipos según género bacteriano.
- Evaluar el perfil de susceptibilidad de los aislados de los urocultivos para observar resistencia acompañante.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 BASE TEÓRICA

1.4.1.1 INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son uno de los problemas de salud más comunes en la actualidad. Se considera como causa más frecuente a la infección por bacterias y se estima que alrededor de 150 millones de pacientes son diagnosticados con infecciones del tracto urinario anualmente en los Estados Unidos^(19,20). La infección del tracto urinario se refiere a la respuesta inflamatoria del urotelio debido a la presencia de patógenos microbianos a lo largo del tracto urinario; implica una serie de condiciones clínicas que van desde la presencia asintomática de bacterias en el tracto urinario hasta la infección severa de los riñones que puede llevar a una sepsis⁽²¹⁾. El diagnóstico de las ITU descansa principalmente en dos pilares: los diagnósticos clínico y laboratorio; siendo el uronálisis y la confirmación con el urocultivo, las herramientas que permiten definir una ITU⁽²²⁾.

Según Grabe⁽²²⁾, el tracto urinario puede ser alcanzado por el ascenso de los microorganismos desde la uretra, la cual es la vía más frecuente que conlleva a una ITU, principalmente organismos como *E. coli* y *K. pneumoniae*. Por diferencias anatómicas se explica la mayor frecuencia de infecciones urinarias en mujeres que en hombres, así como el incremento del riesgo de infección después del cateterismo u otras formas de instrumentación de la vejiga⁽²²⁾. Otras vías de colonización e infección del tracto urinario son por diseminación linfática o hematológica⁽²³⁾.

1.4.1.2 INFECCIONES URINARIAS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS

Las complicaciones infecciosas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con cáncer^(4,5). Las alteraciones en las defensas del organismo, bien sean producidas por la propia enfermedad o por los tratamientos a los que son sometidos, van a producir un incremento significativo en el riesgo de sufrir infecciones; así mismo, los factores de riesgo son diversos en los pacientes con cáncer y cada uno de ellos puede facilitar la colonización e infección por diferentes agentes infecciosos⁽⁴⁾.

En el paciente oncológico, los principales factores que predisponen al desarrollo de una infección son: neutropenia, disfunción de la inmunidad celular, disfunción de la inmunidad humoral, alteraciones en las barreras anatómicas, y procedimientos invasivos⁽⁵⁾.

Los microorganismos más frecuentes en estos pacientes son los gramnegativos *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus*^(5,19).

1.4.1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA

La resistencia a los antibióticos es un tema en continua revisión y los diversos estudios publicados cada año con nuevos datos pueden modificar o redefinir la perspectiva sobre este problema. Teniendo en cuenta que las enterobacterias tienen una variedad de mecanismos de resistencia y que la selección de estos mecanismos podría conllevar a una falla en el tratamiento, es esencial conocer los mecanismos de resistencia con mayor prevalencia en las enterobacterias⁽²⁴⁾.

Los mecanismos de resistencia podrían clasificarse en distintas categorías:

- **Modificación enzimática del antibiótico:** Consiste en la producción de enzimas con capacidad de cambiar la estructura del antibiótico lo que conlleva a la pérdida de funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes, estas hidrolizan el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos β -lactámicos. De la misma manera, las enzimas modificadoras de los antibióticos aminoglucósidos pueden modificar estos antibióticos a través de reacciones de fosforilación, adenilación y acetilación^(24,25).
- **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** Las bacterias son capaces de alterar la bicapa lipídica; por lo tanto la permeabilidad de la membrana resulta afectada, esencialmente, a nivel de las porinas, las cuales son proteínas que forman canales embebidos de agua en la membrana externa que regulan la entrada de ciertos elementos, como, los antibióticos; las alteraciones en la membrana externa pueden evitar el paso de antibióticos al espacio periplásmico^(24,25).
- **Bombas de expulsión:** Funcionan obteniendo el antibiótico del espacio periplasmático y expulsándolo al exterior, para evitar que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es usualmente empleado por las bacterias gramnegativas⁽²⁴⁾.
- **Alteraciones del sitio de acción:** Ciertas bacterias tienen la capacidad de modificar el sitio donde el antibiótico se fija en la bacteria para suspender una función vital de ésta. Este mecanismo es principalmente utilizado por las bacterias grampositivas⁽²⁴⁾.

1.4.1.4 β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

A. SURGIMIENTO Y DESARROLLO

En 1940 se relacionó el uso de las penicilinas con el hallazgo de la resistencia bacteriana, Chain y Abraham observaron, en algunos cultivos de *E. coli* que dichas bacterias producían sustancias que inactivaban soluciones de penicilinas; más adelante, identificaron aislados de *Staphylococcus aureus* que producían una sustancia capaz de inactivar a las penicilinas, denominadas penicilinasas.

Posteriormente, con la aparición de la ampicilina fue descrita una nueva enzima que inactivaba penicilinas, fue denominada betalactamasa, concretamente TEM-1; luego, fue reportado un aislado de *K. pneumoniae* productor de una betalactamasa con la capacidad de inactivar a las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación, ureidopenicilinas y las carboxipenicilinas, se le denominó SHV-1. Las enzimas resistentes a los betalactámicos continuaron desarrollándose hasta que surgieron las BLEE que a la actualidad se conocen, como producto de las mutaciones de los genes que codificaban las betalactamasas tipo TEM-1 y TEM-2⁽²⁶⁾.

Alrededor de 1983, se describió la betalactamasa SHV-2 en un aislado de *K. ozonae* con la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y el aztreonam. Se denominó por primera vez como betalactamasas de espectro extendido (BLEE) por Philippon y colaboradores⁽²⁷⁾. En Francia, se reportaron aislados de *K. pneumoniae* con un fenotipo semejante fueron las TEM-3, producto de una mutación de las TEM-2. Hasta fines de los años 90, la mayor proporción de las BLEE descubiertas correspondían a las familias SHV y TEM; que procedían, principalmente, de brotes epidémicos hospitalarios^(26,27). A la fecha se han reportado alrededor de 193 tipos de SHV y 223 tipos de TEM; dichas enzimas son de codificación plasmídica y transferibles por conjugación a otras bacterias, lo que favoreció su acelerada dispersión^(26,28).

En 1989 aparece simultáneamente en enterobacterias aisladas en Argentina, Francia y Alemania, un diferente tipo de BLEE, fueron nombradas CTX-M; se demostró que no se relacionaban con alguna de las BLEE reportadas hasta ese entonces, presentaban características filogenéticas distintas a las SHV y TEM^(26,29). Se van describiendo enzimas BLEE, algunas similares a las anteriores y otras con escasas homología genética a las ya conocidas. En la actualidad se han reportado más de 500 tipos, entre las que se encuentran las PER, SFO, VEB, BEL, GES, BES, TLA y OXA^(29,30).

Las β -lactamasas se han estudiado desde muchos aspectos diferentes, incluida la clasificación, las propiedades cinéticas y los perfiles hidrolíticos, la plasticidad, la frecuencia y la diseminación, además, se han utilizado como ejemplo de la evolución acelerada siguiendo el paradigma darwinista, donde la fuerte presión selectiva de los antibióticos favorece la supervivencia de los más adaptados⁽³¹⁾.

B. CLASIFICACIÓN DE LAS β -LACTAMASAS

Debido al desarrollo de las betalactamasas surgen diversas clasificaciones, estas se originan cuando se separan las cefalosporinasas de las penicilinasas⁽²⁶⁾. Actualmente las clasificaciones de mayor uso son dos: la clasificación de Ambler fundamentada en el peso molecular, estructura molecular y grado de homología en secuencias de aminoácidos; y la clasificación de Bush-Jacoby basada en los sustratos que hidrolizan las enzimas betalactamasas y la inhibición de su actividad por el aztreonam, EDTA, ácido clavulánico u oxacilina^(26,32,33).

La clasificación Ambler agrupa las enzimas betalactamasas en cuatro clases: las clases A, C y D son serin- β -lactamasas y la clase B metalo- β -lactamasas dependientes de zinc. Por otro lado, Bush - Jacoby, definen tres grupos: grupo 1 (clase C de Ambler) cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico, grupo 2 (clases A y D de Ambler) representa a las β -lactamasas de amplio espectro, de espectro extendido y serin-carbapenemasas; y el grupo 3 (clase B de Ambler) corresponde a las metalo- β -lactamasas⁽³¹⁾. Así mismo, describen varios subgrupos de cada grupo principal, basados en características específicas de ciertas enzimas para caracterizarlas mejor^(26,31).

Las BLEE pertenecen al grupo *2be* de Bush y la clase A de Ambler, siendo las más frecuentes las enzimas tipo SHV, TEM y CTX⁽³¹⁾. Se resume en la Tabla 1 la clasificación de las enzimas β -lactamasas.

Tabla 1. Clasificación de las enzimas β -lactamasas según Bush-Jacoby

Según Bush-Jacoby	Según Ambler (Clase molecular)	Sustratos	Enzimas representativas
1	C	Cefalosporinas	CMY-2, ACT-1, MIR-1, FOX-1
1e	C	Cefalosporinas	CMY-37,GC1
2a	A	Penicilinas	PC1
2b	A	Penicilinas,cefalosporinas	SH1,TEM-1,TEM-2
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido,monobactámicos	SHV-2,TEM-3,PER-1, VEB-1,CTX-M (CTX-M-15)
2br	A	Penicilinas	SHV-10,TEM-30
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	CARB-3,PSE-1
2ce	A	Carbenicilina,cefepime	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	CepA
2f	A	Carbapenémicos	SME-1,IMI-1,KPC-2
3a	B	Carbapenémicos	VIM-1,IMP-1,IND-1
3b	B	Carbapenémicos	FEZ-1,GOB-1,CAU-1,L1

Fuente: Karen Bush, George A. Jacoby, Clasificación funcional actualizada de las β -lactamasas⁽³¹⁾.

1.4.1.5 BLEE TIPO CTX-M

A. ORIGEN Y DESARROLLO

Dentro de las β -lactamasas, las BLEE tipo CTX-M se consideran un paradigma en la evolución de los mecanismos de resistencia; la incorporación de diferentes genes cromosómicos relacionados con el gen *bla*_{CTX-M} de diferentes especies de *Kluyvera* se ha derivado en diferentes subtipos de CTX-M^(7,27). La primera publicación que reconoció una BLEE tipo CTX-M informó sobre un aislado de *E. coli* susceptible a la ceftazidima, pero resistente a la cefotaxima aislado del oído de un niño de 4 meses que padecía otitis media en Múnich, Alemania. La enzima responsable de este fenotipo de BLEE particular que no afecta a la ceftazidima fue nombrada como CTX-M-1 en referencia a su acción hidrolítica preferencial sobre la cefotaxima (CTX como su acrónimo y M de Múnich)⁽³⁴⁾. Estas enzimas están confinadas no

solo al entorno hospitalario, sino también a la comunidad, siendo *E.coli* el patógeno más importante que produce estas enzimas^(7,34).

Las BLEE tipo CTX-M están incluidas en el grupo *2be* de la clasificación funcional de Bush - Jacoby perteneciente a las β -lactamasas de clase A molecular de la clasificación de Ambler⁽³¹⁾. Se han descrito diferentes grupos o subtipos de BLEE CTX-M, clasificados según sus secuencias de aminoácidos^(8,16,27,34), que se muestran en la Tabla 2.

Estudios realizados en diferentes países durante los años 90, revelaron que una vez que una β -lactamasa CTX-M penetra en un área geográfica específica, se convierte en prevalente con el desplazamiento o la superposición sobre las BLEE tipo TEM y BLEE tipo SVH⁽³⁴⁾. Esta característica se ha demostrado en América del Sur con los subtipos *bla*_{CTX-M-2}, los subtipos *bla*_{CTX-M-1} (CTX-M-3) en Polonia y los subtipos *bla*_{CTX-M-9} (CTX-M-14) en España, Taiwán y China; también fue el caso del subtipo *bla*_{CTX-M-1} (CTX-M-15) en el Reino Unido^(8,9,27,28).

Un estudio polaco retrospectivo en *Enterobacteriaceae* resistentes a las cefalosporinas de espectro extendido reveló la presencia del subtipo *bla*_{CTX-M-1} (CTX-M-15) en *Serratia marcescens* y *E. coli* desde 1998; curiosamente, el análisis de plásmidos sugirió que esta enzima podría haber evolucionado directamente desde CTX-M-3 en lugar de ser importado de otro país⁽³⁴⁾.

Tabla 2. Principales familias y grupos de β -lactamasas de espectro extendido, tipo de BLEE y país de emergencia

BLEE	Progenitor β -lactamasa (% homología de secuencia de aminoácidos)	País de emergencia	Especie bacteriana donde fue detectada por 1 ^o vez
Alta prevalencia			
SHV	SHV-1/LEN (>90%)	Alemania (1983) ^a	<i>Enterobacteriaceae</i>
TEM	TEM-1, -2	Francia (1985) ^a	<i>Enterobacteriaceae</i>
Subtipo CTX-M 1	KLUC <i>Kluyvera cryocrencens</i> (85%)	Alemania (1989) ^b	<i>Escherichia coli</i>
Subtipo CTX-M 2	KLUC <i>Kluyvera ascorbata</i> (80-100%)	Japón (1986) ^b / Argetina (1989) ^b	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp
Subtipo CTX-M 8	KLUC <i>Kluyvera georgiana</i> (95%)	Brazil (1996-1997) ^b	<i>Enterobacter</i> spp <i>Citrobacter amalonaticus</i>
Subtipo CTX-M 9	KLUC <i>Kluyvera georgiana</i> (80%)	España (1994) ^b	<i>Escherichia coli</i>
Subtipo CTX-M 25	ND	Canadá (2000) ^b	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: Cantón et al.2008⁽¹⁶⁾ ND: No determinado; a:Fecha de publicación; b:Fecha de aislamiento.

El modelo de diseminación de la variante CTX-M-15, perteneciente al subtipo *bla*_{CTX-M-1}, podría haber sido diferente en países en los que otras variantes CTX-M estaban bien establecidas antes de la detección y diseminación de esta enzima; este es el caso de España y Sudamérica⁽³⁴⁾. En España, la variante CTX-M-10 fue detectada por primera vez en 1990 en *K. pneumoniae* y en 1991, en *E. coli*. La primera detección de la variante CTX-M-9 fue hallada en *E. coli* (1996) y en *K. pneumoniae* (1999); las variantes CTX-M-14 y CTX-M15, en *E. coli* (2001) y en *K. pneumoniae*, durante el 2001 y 2002, respectivamente^(7,27). En el año 2000, una investigación en España que involucró a 40 centros, no se encontró la variante CTX-M-15; sin embargo, en 2006 un estudio similar encontró CTX-M-15 en diferentes regiones y fue una de las enzimas más frecuentes después de SHV-12 y CTX-M-14⁽³⁴⁾. Posteriormente, se determinó que CTX-M-15 representa el 34% del total de *E. coli* productoras de BLEE, el 37% de CTX-M-14 y el 20% de SHV-12, lo que denota la prevalencia creciente de CTX-M-15 pero todavía coexiste con otras enzimas CTX - M⁽³⁴⁾.

Los datos ilustran que cuando CTX-M-15 ingresa en un territorio donde están presentes otras BLEE, el incremento de esta enzima y el desplazamiento de las otras BLEE es un proceso lento^(7,27,34), puede ser el caso de América del Sur donde CTX-M-2 ha sido el CTX-M más prevalente; sin embargo, en los últimos años se reporta que CTX-M-15 está aumentando, esto se ha informado en Brasil, Colombia, Uruguay y Perú^(8,14,15,27,34).

Las BLEE tipo SHV y tipo TEM predominaron durante los años 80 y 90, principalmente asociados con brotes en hospitales con *K. pneumoniae* y, en menor frecuencia, con *E. coli* y el resto de enterobacterias, mientras que las BLEE tipo CTX-M fueron menos prevalentes; a pesar de ser descubierto en 1989, las enzimas tipo CTX-M no alcanzaron predominancia sobre las otras enzimas BLEE hasta la primera década de la década de 2000 cuando se observó una evolución acelerada y una extraordinaria dispersión de estas enzimas⁽³⁴⁾.

Dos estrategias principales de la evolución de la BLEE han sido utilizadas por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Salmonella enterica* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*: (i) la selección de mutantes con especificidad de sustrato expandido a partir de las betalactamasas de tipo SHV y TEM mediadas por plásmidos, que ya eran prevalentes entre enterobacterias desde la década de 1970; y (ii) la captura de genes de β -lactamasas nuevas a partir del metagenoma ambiental, que codifican enzimas que están naturalmente dotadas de actividad de BLEE⁽⁸⁾. Entre las últimas enzimas, las β -lactamasas de tipo CTX-M han demostrado ser de lejos las más exitosas en la diseminación en el entorno clínico y se han ubicado como las BLEE más prevalentes mundialmente^(7,8,27).

La distribución de las BLEE tipo CTX-M en el mundo es compleja, a pesar de haber sido descritas inicialmente en Europa; América del Sur fue el primer continente en el que se volvieron prevalentes^(6,8). En 1989, las cepas de *Salmonella* no tifoideas que producen la enzima CTX-M-2 comenzaron a diseminarse desde unidades neonatales, inicialmente en las ciudades de La Plata y Buenos Aires (Argentina). A partir de ahí, estas enzimas se extendieron a los países vecinos de América del Sur, como Paraguay, Uruguay y Brasil⁽⁶⁾.

En 1994, se informó la presencia de CTX-M-2 en aislamientos de *Klebsiella* en Paraguay y aislados de *E. coli* y *P. mirabilis* en Argentina. Otras bacterias que se sabe que albergan a esta enzima en Sudamérica son *Shigella sonnei*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio cholerae* y *Aeromonas hydrophila*. En el 2002, CTX-M-2 era la enzima presente en el 75% de las enterobacterias productoras de BLEE en Buenos Aires, por lo que es claramente la BLEE predominante en ese país; CTX-M-31 (variante del subtipo *bla*_{CTX-M-2}) también se ha informado en Argentina. Otras enzimas CTX-M, incluyendo CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-16, se han descubierto en enterobacterias en Brasil desde 1996⁽⁶⁾.

B. SUBTIPOS DE CTX-M

Las β -lactamasas de tipo CTX-M pertenecen a un linaje bastante heterogéneo de serina β -lactamasas de clase molecular A de Ambler, que incluye principalmente cinco grupos o subtipos que difieren entre sí por $\geq 10\%$ de residuos de aminoácidos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25/26); aunque publicaciones recientes informan al menos otros dos subtipos adicionales^(7,8,27). Cada subtipo, contiene una serie de variantes alélicas menores que se diferencian entre sí por una o pocas sustituciones de aminoácidos, alrededor de $\leq 5\%$ de residuos de aminoácidos⁽⁸⁾.

Así mismo, hay al menos cuatro variantes de CTX-M que exhiben una estructura híbrida: CTX-M-45 (anteriormente Toho-2) que es un híbrido de CTX-M-14 con una proteína de origen desconocido; así como CTX-M-64, CTX-M-123 y CTX-M-132 que son híbridos de CTX-M-15 con diferentes segmentos de CTX-M-14. La mayoría de las variantes se encuentran dentro de los subtipos *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-9}, lo que sugiere una mayor plasticidad para estos grupos; sin embargo, esto también podría reflejar la mayor prevalencia general de miembros de estos grupos que podría haber permitido una oportunidad más amplia para evolucionar⁽⁸⁾.

Tabla 3. Subtipos *bla*_{CTX-M} y sus principales enzimas

Subtipo	Principales enzimas
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M: 1, 3, 10, 12, 15, 22, 23, 28, 55, 64, 123, 101, 132 y FEC-1
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M: 2, 4, 4L, 5, 6, 7, 20, 31, 44 y Toho-1
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M: 9, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 24, 27, 45(Toho-2) 65, 104 y 125
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-M: 8
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	CTX-M: 25 y 26

Fuente: Bonnet R.2004⁽²⁷⁾, D'Andrea et al.2013⁽⁸⁾, Bevan et al.2017⁽⁷⁾

Los árboles filogenéticos de CTX-M sugieren una diversificación explosiva de los genes *bla* originales en un tiempo corto cuando llegaron al escenario clínico. Los primeros CTX-M identificados pudieron conferir resistencia a la cefotaxima, aunque sus capacidades para hidrolizar eficazmente la ceftazidima fueron muy bajas o nulas, pero hoy en día más del 60% de las variantes de CTX-M pueden conferir simultáneamente resistencia a cefotaxima y ceftazidima; por lo tanto, la ceftazidima podría haber sido una de las principales fuerzas selectivas que contribuyen a la diversificación de los CTX-M⁽³⁴⁾. Los eventos de recombinación aceleran la evolución; estos eventos también se han descrito entre los genes *bla*_{CTX-M}. Como ejemplo, la enzima CTX-M-64 es el resultado de la recombinación entre los miembros de los genes derivados *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-1}, probablemente *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-15}, ya que son las variantes más prevalentes en el mundo⁽¹⁶⁾. La recombinación requiere la presencia simultánea de ambos *bla*_{CTX-M} en un mismo hábitat, la presencia concomitante de diferentes β -lactamasas CTX-M en la misma bacteria, actualmente no es un evento inusual, otras enzimas recombinantes podrían surgir en un futuro cercano^(8,29).

C. IMPORTANCIA CLÍNICA DE BLEE TIPO CTX-M

En general, la producción de β -lactamasas de tipo CTX-M tiene las mismas implicaciones clínicas que otros tipos de BLEE: dejar a los carbapenémicos como los únicos β -lactámicos para el tratamiento de infecciones graves causadas por agentes patógenos productores de estas enzimas⁽³³⁾. Similar a lo que se observó con cepas de enterobacterias que producen BLEE de tipo TEM y SHV, también se han notificado altas tasas de co-resistencia a fármacos potencialmente activos, por ejemplo, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, en las cepas productoras de enzimas

CTX-M; aunque los carbapenémicos son estables a su acción, se ha informado de la aparición de resistencia durante el tratamiento con carbapenem en una cepa de *K. pneumoniae* que produce la enzima CTX-M-15 tras la pérdida de una porina de membrana externa⁽¹²⁾. Tales mutaciones tienden a perderse rápidamente en ausencia de una presión selectiva; sin embargo, la posibilidad de selección de mutantes resistentes a carbapenémicos en enterobacterias productoras de BLEE durante el tratamiento con dichos antibióticos es motivo de preocupación, debido a la creciente prevalencia de estas enzimas y al número limitado de alternativas terapéuticas⁽³⁵⁾. Las bacterias productoras de enzimas betalactamasas tipo CTX-M son las más prevalentes en infecciones del tracto urinario (ITU) de aparición en los entornos hospitalarios y comunidad⁽⁸⁾; la *E. coli* productora de BLEE tipo CTX-M también es una causa importante de infecciones del torrente sanguíneo de inicio en la comunidad, que a menudo son secundarias a una ITU⁽³⁴⁾. Los estudios sobre infecciones del torrente sanguíneo causados por enterobacterias productores de BLEE tipo CTX-M han revelado tasas de mortalidad entre 20-30%, con factores de riesgo comunes como diabetes, antecedentes recientes de infecciones del tracto urinario o enfermedades renales y el uso reciente de antibióticos, principalmente fluoroquinolonas⁽⁸⁾.

1.4.1.6 DETECCIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Una de las principales funciones del laboratorio de microbiología es reportar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de los aislados bacterianos de muestras clínicas. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se proporcionan a los clínicos para orientar su elección de la terapia antimicrobiana para los pacientes con infecciones⁽³⁶⁾. El papel de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas se está volviendo cada vez más importante a medida que la resistencia continúa propagándose entre una amplia variedad de especies bacterianas, impactando tanto en la terapia empírica como en la definitiva⁽³⁷⁾. Los dos métodos fenotípicos principales para determinar la susceptibilidad de un aislado bacteriano a un agente antimicrobiano son la difusión de disco, basada en la técnica de Kirby-Bauer, y la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI)⁽³⁸⁾.

El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorios (CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) ha brindado indicaciones para el tamizaje y confirmación de BLEE en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, y *P. mirabilis*; sin embargo, estas recomendaciones han sido acondicionadas para otros gram negativos de importancia clínica⁽³⁸⁾. Los procedimientos de laboratorio para la detección de BLEE se asocian en las de tamizaje y las de confirmación mediante las metodologías difusión de disco y CMI^(37,38). En los últimos años, se han introducido métodos moleculares para detectar genes de resistencia a los antibióticos y mutaciones asociadas con fenotipos resistentes, la prueba molecular ampliamente usada es la reacción en cadena de polimerasa (PCR)⁽³⁶⁾.

La técnica de difusión de disco es la técnica fenotípica más utilizada para determinar la presencia de las BLEE; la cual consiste en colocar discos de papel saturados con concentraciones estandarizadas de antibióticos sobre el crecimiento bacteriano en una placa con agar Muller-Hinton, se incuba durante 16 a 18 horas a 35 °C y se mide el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos^(36,39). Del mismo modo, puede ser utilizado la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual proporciona un resultado cuantitativo junto a una interpretación categórica: susceptible (S), intermedia (I) o resistente (R), guía la terapia antimicrobiana con mayor precisión, particularmente para infecciones en sitios corporales donde los antibióticos alcanzan concentraciones más bajas que en el suero. La CMI se define como la concentración mínima de antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo^(36,39).

A. MÉTODO DE TAMIZAJE INICIAL DE BLEE SEGÚN CLSI 2017

El CLSI⁽³⁹⁾ recomienda como pruebas de tamizaje buscar la disminución de la inhibición en aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona o cefpodoxima que permitan sospechar la presencia de BLEE en *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *E. coli*. Cuando el aislado muestra halos de inhibición iguales o menores a los diámetros mencionados en la Tabla 4, se considera como sospechoso de BLEE.

Tabla 4. Criterios para tamizaje de β -lactamasas de espectro extendido en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *P. mirabilis*

Prueba Método	Tamizaje Inicial	
	Disco Difusión	Concentración mínima inhibitoria
Resultados	Para <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>K. oxytoca</i> :	
	Zona Cefotaxima (30 μ g)	≤ 27 mm
	Zona Ceftriaxona (30 μ g)	≤ 25 mm
	Zona Ceftazidima (30 μ g)	≤ 22 mm
	Zona Aztreonam (30 μ g)	≤ 27 mm
	Zona Cefpodoxima (10 μ g)	≤ 17 mm
	Para <i>P. mirabilis</i> :	
Zona Ceftazidima (30 μ g)	≤ 22 mm	
Zona Cefotaxima (30 μ g)	≤ 27 mm	
Zona Cefpodoxima (10 μ g)	≤ 22 mm	

Crecimiento en o por encima de las concentraciones de *screening* puede indicar la producción de BLEE.(p.e, para *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *K. oxytoca*, CMI ≥ 8 μ g/ml para cefpodoxina o CMI ≥ 2 μ g/ml para aztreonam, ceftazidima, ceftriaxona o cefotaxima; y para *P. mirabilis*, CMI ≥ 2 μ g/ml para cefopodoxima, cefotaxima o ceftazidima)

Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Estándares de rendimiento para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: vigésimo quinto suplemento. 2017⁽³⁹⁾.

Las enterobacterias productoras de BLEE tipo CTX-M pueden exhibir distintos perfiles fenotípicos de resistencia. La resistencia reversible por inhibidores a la cefotaxima junto con la sensibilidad a la ceftazidima en un aislado de *E. coli* o *K. pneumoniae* es altamente sugestiva para la producción de una BLEE tipo CTX-M. Por otro lado, no se puede excluir la producción de enzimas CTX-M en caso de resistencia a ceftazidima y/o resistencia a inhibidores, dada la presencia de variantes de CTX-M con mayor actividad de ceftazidimasa y la posibilidad de producción de betalactamasas adicionales, como OXA-1 o carbapenemasas, en la misma cepa⁽⁸⁾.

B. MÉTODOS CONFIRMATORIOS DE BLEE

• Método Americano (BLEE-CLSI)

El método consiste en sembrar placas con agar Mueller Hinton con las cepas sospechosas, se coloca discos de susceptibilidad antimicrobiana de CAZ (30 μ g), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) (30/10 μ g), CTX (30 μ g) y cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CXT-CLA) (30/10 μ g). Se interpreta como resultado positivo si se observa una diferencia mayor o igual

a 5 mm de los diámetros de los halos de inhibición entre los discos de cefotaxima-ácido clavulánico y cefotaxima sola o ceftazidima-ácido clavulánico y ceftazidima sola⁽³⁹⁾. Ver Figura 1.

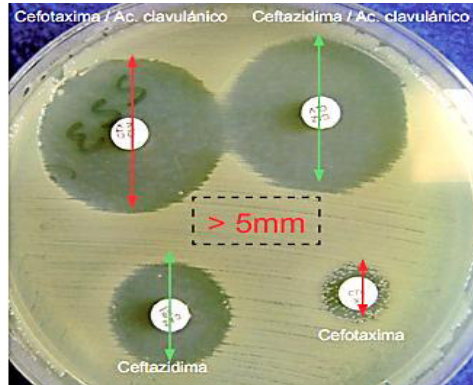


Figura1. Método de disco combinado para la detección de BLEE. Tomado de Lezameta et al⁽⁴⁰⁾.

• Método de Jarlier

Denominado prueba de sinergia del doble disco puesto que está fundamentado en la sinergia entre las cefalosporinas de espectro extendido o los monobactámicos y el disco de amoxicilina/ácido clavulánico. El método consiste en colocar a 20 mm los discos de cefalosporinas, cefotaxima (30 µg) y/o ceftazidima (30 µg), del disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg). Se considera positivo si se observa una zona de inhibición debido a la sinergia entre algún disco de los antibióticos probados y el disco de amoxicilina/clavulánico, en caso contrario, se interpreta como negativo⁽⁴¹⁾. Ver Figura 2.

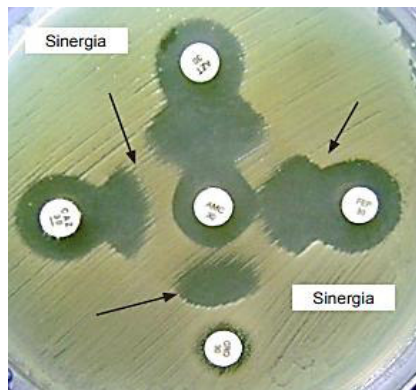


Figura 2. Método de doble disco para la detección de BLEE. Método de Jarlier. Tomado de Lezameta et al⁽⁴⁰⁾.

- **Método de Hodge**

Útil para la identificación de mecanismos de resistencia producidos por enzimas; este método se ha adecuado para identificar β -lactamasas, dependiendo de los sustratos que se utilicen. Es apropiado para cualquier tipo de β -lactamasas⁽³⁶⁾.

- **E-TEST®ESBL**

Son tiras con antibióticos en gradiente de concentraciones que presentan una alta sensibilidad y especificidad para tamizar y confirmar las BLEE. Son útiles las tiras de cefepime y cefepime/ácido clavulánico, cefotaxima cefotaxima/ácido clavulánico; y ceftazidima y ceftazidima/ácido clavulánico para detectar enzimas BLEE en microorganismos productores de enzimas AmpC; su uso en la rutina de los laboratorios es limitado debido a su alto precio, no obstante es una prueba sencilla de utilizar para identificar las BLEE⁽³⁷⁾.

- **Pruebas Automatizadas para la detección de BLEE**

En los laboratorios de microbiología clínica se utilizan una serie de métodos automatizados y semiautomatizados disponibles en el mercado para evaluar e informar los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. La mayoría de los métodos combinan la identificación bacteriana y los reactivos de prueba de susceptibilidad en un solo panel para mejorar la velocidad con la que los resultados de las pruebas de susceptibilidad se pueden informar^(37,38). El objetivo de los métodos automatizados es reducir el tiempo para producir resultados precisos de identificación y susceptibilidad a los antibióticos; de hecho, los resultados pueden estar disponibles para algunas especies bacterianas en tan solo 6 horas, frente a las 16-24 horas que a menudo se requieren para las pruebas de difusión de disco o las pruebas CMI estándares⁽³⁶⁾.

Los equipos automatizados cuentan con *softwares*, "sistemas expertos", para mejorar los informes al reconocer y marcar resultados inusuales, como

K. pneumoniae sensible a la ampicilina, en los cuales la identificación bacteriana y el patrón de susceptibilidad están en conflicto con los resultados típicos de poblaciones de *K. pneumoniae* silvestres; o resultados poco comunes, tales como *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos o aislados de *S. aureus* resistentes a vancomicina⁽³⁷⁾. La detección de resistencia a cefalosporinas de tercera generación debido a BLEE, se ha abordado en muchos de los sistemas automatizados mediante el uso de bajas concentraciones de β -lactámicos como pruebas de detección⁽³⁶⁾. BD Phoenix™ M100 (BD *Diagnostic Systems*, Sparks, Md.) es un sistema automatizado que realiza la identificación (ID) y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST); ha desarrollado la prueba de detección de bacterias gramnegativas productoras de BLEE, utiliza un algoritmo basado en respuestas fenotípicas a un panel de cefalosporinas (Anexo 1). Este sistema es un método rápido y confiable para detección de BLEE en el laboratorio^(42,43).

- **Métodos Bioquímicos para la identificación de BLEE**

Se utiliza el isoelectroenfoco para analizar la cinética enzimática y el análisis del perfil de antibióticos, a través del punto isoeléctrico (pI) se pueden determinar las distintas enzimas BLEE; tiene la limitación de la presencia de distintas BLEE con pI similar. Sin embargo, es relevante para la caracterización de las enzimas BLEE; por ejemplo, las BLEE tipo CTX-M poseen valores de pI entre 7,6 y 9; las SHV, entre 7 y 8,2; y las TEM, entre 5,2 y 6,5. Los pI de BLEE tipo TEM y tipo PER son similares⁽⁴⁴⁾.

- **Métodos Moleculares para la identificación de BLEE**

Los métodos moleculares son utilizados para detectar genes de resistencia a los antimicrobianos y mutaciones asociadas con fenotipos resistentes, dentro de estas técnicas moleculares está la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico de un conjunto complejo de ADN, de una manera rápida y muy sensible^(36,37). Distintas técnicas moleculares han sido incluidas como la técnica PCR-SSCP, donde se tratan con enzimas endonucleasas al producto

de PCR, rastrea mutaciones basada en la migración electroforética de los fragmentos amplificados. Así también, la PCR-RFLP es el análisis del polimorfismo de longitud de fragmento de restricción con distintas enzimas del producto de PCR, es útil para la diferenciación de las variantes de la familia SHV⁽³⁶⁾.

Por otro lado, resulta útil el uso de métodos moleculares en casos en que la cepa presente fenotipos complicados, debido a una escasa hidrólisis de ciertos sustratos o superposición con otros mecanismos de resistencia o presentación de distintas betalactamasas en la misma cepa como BLEE tipo CTX-M y SHV o BLEE tipo CTX-M y BLEE cromosómicas AmpC^(36,38). El alto número de variantes BLEE hace que sea necesario completar la identificación final de las BLEE mediante la secuenciación de los genes codificadores de las enzimas, que permanece como el método de referencia para la identificación completa de las enzimas BLEE⁽³⁷⁾.

1.4.1.7 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

En la práctica clínica, los antibióticos betalactámicos representan a la familia de antibióticos más utilizada porque presenta escasa toxicidad y buena distribución en el organismo; tienen como mecanismo de acción a la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Presentan acción bactericida lenta, el rango de acción de los β -lactámicos incluye bacterias gramnegativas y grampositivas, no afectan al *Mycoplasma* debido a que estos no poseen pared celular⁽²⁵⁾.

Ciertos cambios en la molécula original han producido compuestos con amplio espectro antimicrobiano; a pesar de que la creciente aparición de resistencias delimita su uso empírico. Sin embargo, la penicilina permanece como el tratamiento de elección en ciertas infecciones, las cefalosporinas presentan una variedad de indicaciones, los carbapenémicos son útiles en infecciones producidas por bacterias multirresistentes y en infecciones nosocomiales; y los inhibidores de las betalactamasas permiten a las penicilinas que acompañan a recuperar su actividad frente a aislados resistentes debido a la producción de betalactamasas⁽⁴⁶⁾.

A. CLASIFICACIÓN

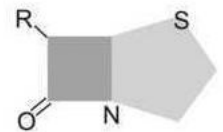
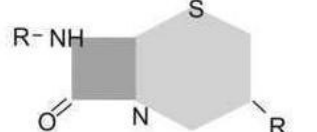
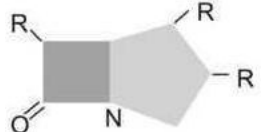
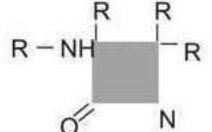
Los antibióticos betalactámicos son químicamente definidos por la presencia del anillo betalactámico; su actividad depende de la unión a distintos radicales. En función de la agrupación de distintos tipos de cadenas lineales al esqueleto básico formado por los 2 anillos betalactámicos resultan distintos grupos de antibióticos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos⁽⁴⁵⁾.

En cada grupo, las variaciones en la estructura química confieren la capacidad de cambiar el espectro, la afinidad por ciertos receptores o la resistencia a las betalactamasas⁽⁴⁶⁾. Se resume la clasificación de los antibióticos betalactámicos en la Tabla 5.

B. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos principalmente inhiben la síntesis de la pared celular de la bacteria induciendo a un efecto autolítico, producto de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, conformado por largas cadenas de glúcidos: ácido N-acetilglucosamina y N-acetil murámico. Se fijan las cadenas de péptidos entre sí tras la acción del ácido murámico formándose una malla; los antibióticos betalactámicos impiden esta unión. En consecuencia, la pared resulta debilitada y predispuesta a la ruptura por la presión osmótica intracelular⁽⁴⁵⁾.

Tabla 5. Clasificación de antibióticos betalactámicos

	PENICILINAS	CEFALOSPORINAS	CARBAPENÉMICOS	MONOBACTÁMICOS
Origen	<i>Penicillium notatum</i> (1928)	<i>Cephalosporium acremonium</i> (1945)	<i>Chromobacterium violaceum</i> (1981)	<i>Streptomyces catleya</i> (1976)
Estructura	 <p>Ácido 6-aminopenicilánico</p>	 <p>Ácido 7-aminocefalosporínico</p>	 <p>Monobactamo</p>	 <p>Carbapenemo</p>
Ventaja	Baja toxicidad, actividad bactericida y excelente distribución en el organismo	Amplio espectro, muy eficaces y poco tóxicos	Amplio espectro y poco tóxicos	Mayor afinidad por las PLP, amplio espectro antibacteriano y mayor potencia
Espectro Antibacteriano	Reducido: espiroquetas, cocos gram positivos y ciertos organismos gram negativos (<i>Neisseria</i>)	Amplio: gram positivos y organismos gram negativos	<i>Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, E. coli, Providencia, C. freundii, E. cloacae, Klebsiella y Morganella.</i> Especialmente activo contra: <i>Enterobacter</i> y <i>Pseudomonas</i> .	Resistente a las betalactamasas de los gramnegativos y grampositivos, en particular aquéllas mediadas por plásmido
Principales Antibióticos	Penicilina G, amoxicilina, ticarcilina y piperacilina	1°: Cefalotina, cefazolina, cefalexina 2°: Cefuroxima 3°: Cefpodoxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima 4°: Cefepime 5°: Ceftarolina	Aztreonam	Imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem.

Fuente: Suárez⁽⁴⁵⁾, Mella⁽⁴⁶⁾ PLP: Proteínas ligadoras de penicilina

1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- Colonización: Acción por la cual los microorganismos se asientan establemente, pero no generan respuesta clínica o inmunológica por parte del hospedero.
- Informe clínico: Se refiere al reporte brindado por el equipo automatizado BD Phoenix 100™ con información de la identificación bacteriana y perfil de susceptibilidad antibiótica.
- Variante alélica: Alteración de la secuencia normal de un gen *bla_{CTX-M}* identificada mediante secuenciación.
- Aislado clínico: Se refiere a las enterobacterias recuperadas de distintas muestras como orina, sangre, hisopado, secreciones, lavado bronco alveolar, entre otros.
- Características filogenéticas: Se refiere a las cualidades que determinan las relaciones de proximidad evolutiva entre los diferentes tipos de enzimas BLEE.
- Homología genética: Se refiere al hecho que las secuencias entre genes guardan similitud debido a que presentan un mismo origen evolutivo.

1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

La frecuencia del gen *bla_{CTX-M}* será mayor del 80 % en las enterobacterias productoras de BLEE; y al menos uno de los subtipos *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}* y *bla_{CTX-M-9}* se identificará en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de enero a diciembre del 2017⁽⁴⁷⁾.

CAPÍTULO II

MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 TIPO DE INVESTIGACION

Cuantitativo y descriptivo, debido que se describirá la presencia del gen.

2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Observacional y de corte transversal. Se recogieron los datos en un momento y lugar determinado, sin necesidad de la medición continua de la variable.

2.1.3 POBLACIÓN

Aislados de enterobacterias procedentes de urocultivos positivos de pacientes hospitalizados del INEN.

2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO

Se trabajaron 57 aislados de enterobacterias productoras de BLEE procedentes de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN de enero a diciembre del 2017.

El muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

2.1.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Aislados de enterobacterias productoras de BLEE procedentes de urocultivos de pacientes hospitalizados.
- Aislados que cuenten con registro WHONET (*World Health Organization Net Version 5.6*).
- Aislados que cuenten con reporte de resultados “informe clínico” del laboratorio de Microbiología del INEN.
- Aislados viables y libres de contaminación almacenados en el cepario a -20 °C.

2.1.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Aislados de enterobacterias procedentes de pacientes de emergencia y consultorio externo.
- Aislados de enterobacterias repetidos procedentes de un mismo paciente.
- Aislados con información discordante entre el reporte de resultados “informe clínico” del laboratorio de Microbiología del INEN y el registro WHONET.

2.1.5 VARIABLES

- Presencia del gen *bla_{CTX-M}*:
 - Definición conceptual: Gen que codifica enzimas betalactamasas CTX-M.
 - Definición operacional: Producto de amplificación de 593 pb (*bla_{CTX-M}*).
 - Indicadores: Presencia de banda de 593 pb en corrida electroforética.
- Presencia de subtipos gen *bla_{CTX-M}*:
 - Definición conceptual: Gen que codifica enzimas betalactamasas de los subtipos CTX-M (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}* y *bla_{CTX-M-9}*).
 - Definición operacional: Producto de amplificación de 260 pb, 900 pb y 293 pb (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}* y *bla_{CTX-M-9}*, respectivamente).
 - Indicador subtipo *bla_{CTX-M-1}*: Presencia de banda de 206 pb en corrida electroforética.
 - Indicador subtipo *bla_{CTX-M-2}*: Presencia de banda de 900 pb en corrida electroforética.
 - Indicador subtipo *bla_{CTX-M-9}*: Presencia de banda de 293 pb en corrida electroforética.
- Enterobacteria productora de BLEE:
 - Definición conceptual: Bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos y fermentadores de glucosa; con resistencia a oximino-cefalosporinas y monobactámicos.
 - Definición operacional: Microorganismo identificado como enterobacteria productora de BLEE en el equipo automatizado BD Phoenix 100™.
 - Indicador: Reporte de resultados “informe clínico” obtenido del equipo automatizado BD Phoenix 100™ y registro WHONET.

2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica que se utilizó en el presente trabajo de investigación fue la observación científica.

Para la recolección de datos se utilizaron los siguientes instrumentos:

- Fichas de recolección de datos; donde se registraron los datos de la investigación como edad, sexo, diagnóstico oncológico y servicio de procedencia (Anexo 2).
- Reporte de resultados “informe clínico” brindado por el equipo automatizado BD Phoenix 100™ donde se encuentra la información sobre la identificación y el perfil de susceptibilidad a los antibióticos.
- Registro WHONET del laboratorio de microbiología del INEN, programa estadístico propuesto por la OPS para la vigilancia de la resistencia bacteriana, se obtuvieron datos epidemiológicos del portador y las características de la enterobacteria en estudio.

2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Los procedimientos realizados fueron los siguientes:

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

1. Las muestras de orina de los pacientes hospitalizados fueron recolectadas por el personal de la institución según los protocolos internos del hospital, luego fueron transportadas al servicio de microbiología del INEN.
2. El aislamiento primario de las enterobacterias de urocultivos positivos fue efectuado por el personal capacitado, en agar sangre y MacConkey; la identificación bacteriana y la susceptibilidad antibiótica fue parte del protocolo de rutina diagnóstica, realizadas en el equipo automatizado BD Phoenix 100™.
3. Las cepas identificadas como enterobacterias productoras de BLEE, por el equipo automatizado BD Phoenix 100™ bajo criterios CLSI 2017, fueron recolectadas, preservadas en caldo triptica de soya (*Tryptic Soy Broth-TSB*) con glicerol al 20% y almacenadas a -20 °C.

4. El reporte de resultados proporcionado por el equipo automatizado, donde se encuentra la información de la identificación y la susceptibilidad antibiótica, fue recopilado; luego se validó la información con el registro WHONET.

ANÁLISIS MOLECULAR

Se utilizó un PCR convencional para amplificar los genes *bla*_{CTX-M} y los subtipos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9} en los aislados que cumplieron con los criterios de inclusión; la amplificación se llevó a cabo en el termociclador T100™ Thermal Cycler de BioRad.

Se resembraron los aislados almacenados en agar Tripticasa de soya a 37°C por 24 horas, luego se procedió a realizar la extracción del ADN mediante la lisis por calor, se hizo una suspensión de 3 a 5 colonias del aislamiento en 300 µL de agua de grado molecular, se homogenizó en un vórtex y luego se llevó a ebullición (100°C) durante 10 minutos en el Thermoblock Digital Dry Bath Bio-Rad™. Tras la lisis por calor, se procedió a centrifugar a 13 000 RCF por 4 minutos a 4 °C. Se alicuotaron 200 µL de sobrenadante de cada vial y se rotularon los crioviales.

Para la detección del gen *bla*_{CTX-M} se utilizaron los *primers* diseñados por Ghasemi et al.⁽³⁾, para los subtipos *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-9} se utilizaron los *primers* descritos por Xu et al.⁽⁴⁸⁾ y para el subtipo *bla*_{CTX-M-2} se utilizaron los *primers* diseñados por Rodríguez et al.⁽⁴⁹⁾. Las secuencias de los *primers* y las condiciones de amplificación de la PCR se especifican en el Anexo 3. Los volúmenes para la preparación del *mastermix* para el PCR del gen *bla*_{CTX-M} y sus subtipos se describen a detalle en el Anexo 4.

Para la demostración de los productos de PCR se utilizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa (1,5%), gel preparado con 4 µL de Red Safe™ (20 000X) para cada 80mL de Buffer TAE 1X. En los pocillos del gel se cargaron 7 µL de producto con 1 µL de DNA Loading Dye Geneaid (6X); se utilizaron marcadores de peso molecular de 50pb y 100pb. Las condiciones de corrida fueron de 100 V durante 45 minutos. Se

visualizaron los productos de amplificación usando el transiluminador UV Cleaver Scientific Ltd.

Los resultados obtenidos fueron registrados en las fichas de recolección de datos y en una plantilla Excel 2016. Para el análisis estadístico se calcularon los valores de p con intervalos de confianza establecidos en 95%, se consideró significancia estadística cuando los valores de p fueron inferiores a 0,05. Se utilizó STATA versión 14 para analizar la base de datos.

2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

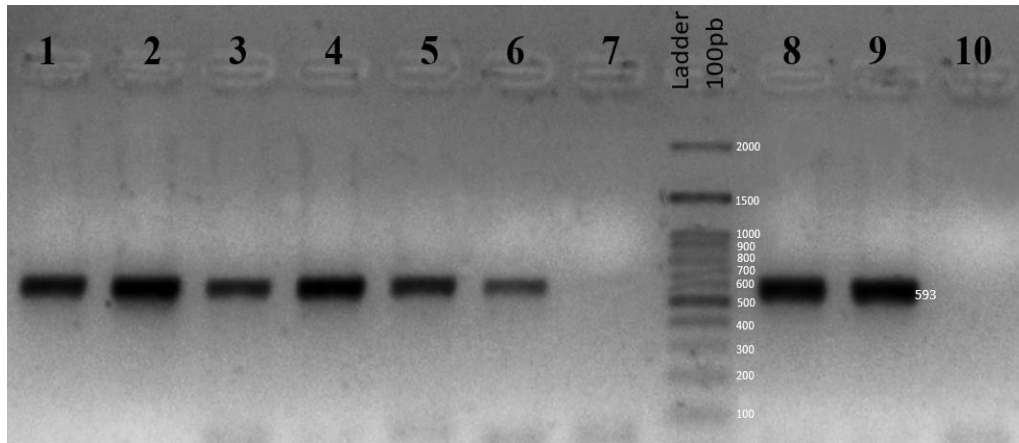
El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto realizado por el Círculo para la investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer en Perú conformado por el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología (CITBM); dicho estudio cuenta con la aprobación del comité de ética del INEN. Dicha aprobación se extiende para la presente investigación; reiterando que no resultó necesario la elaboración de un consentimiento informado debido a que se trabajó con aislados de enterobacterias, se obviaron la historia clínica y el nombre del paciente; ver Anexo 5.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

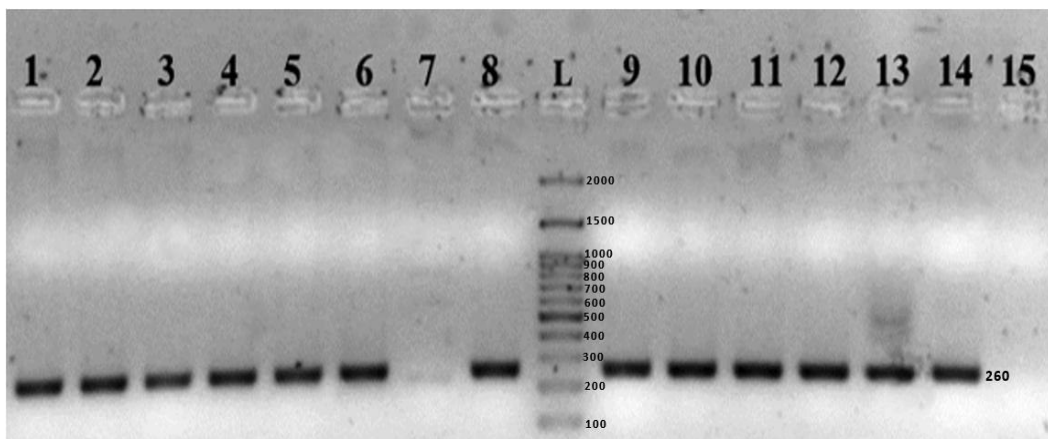
3.1 RESULTADOS

Se recolectaron 57 aislados de enterobacterias productoras de BLEE procedentes de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN durante el 2017; la frecuencia del gen *bla*_{CTX-M} fue de 87,7% (50/57) y 7 aislados no amplificaron el gen *bla*_{CTX-M}. En la Fotografía 1 se observa el producto de amplificación del gen *bla*_{CTX-M}.



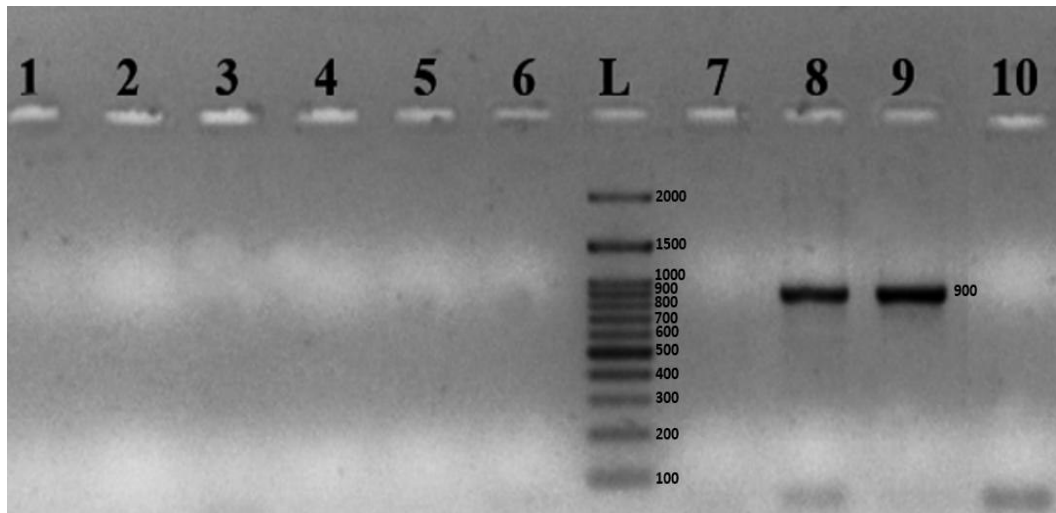
Fotografía 1. Amplificación del gen *bla*_{CTX-M} (593 pb). Electroforesis en gel agarosa 1,5% en buffer TAE 1x, con Red Safe. Muestras positivas: 1(E20), 2(E21), 3(E22), 4(E23), 5(E24), 6(E25), 8(E27); muestra negativa: 7(E26); C+: Control Positivo y C-: Control Negativo (H₂O PCR). L: Ladder 100pb.

Se encontró que el 82% de cepas que poseían el gen *bla*_{CTX-M} pertenecían al subtipo *bla*_{CTX-M-1} (41/50), en la Fotografía 2 se observa la amplificación del gen de este subtipo.



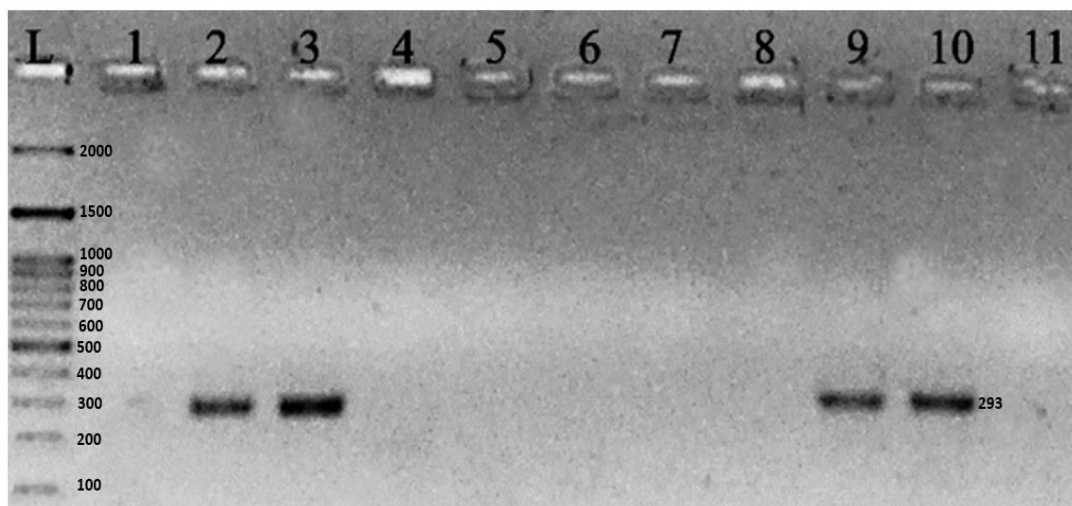
Fotografía 2. Amplificación del subtipo *bla*_{CTX-M-1} (260pb). Electroforesis en gel agarosa 1,5% en buffer TAE 1x, con Red Safe. Muestras positivas: 1(E35), 2(E36), 3(E38), 4(E39), 5(E40), 6(E41), 8(E43), 9(E44), 10(E46), 11(E47), 12(E48), 13(E51); muestra negativa: 7(E42); C+: Control Positivo y C-: Control Negativo (H₂O PCR). L: Ladder 100pb.

Se encontró que el 2% de cepas que poseían el gen *bla*_{CTX-M} pertenecía al subtipo *bla*_{CTX-M-2} (1/50), en la Fotografía 3 se observa al único aislado que amplificó dicho gen.



Fotografía 3. Amplificación del subtipo *bla*_{CTX-M-2} (900 pb). Electroforesis en gel agarosa 1,5% en buffer TAE 1x, con Red Safe. Muestra positiva: 8(E20); muestras negativas: 1(E13), 2(E14), 3(E15), 4(E16), 5(E17), 6(E18), 7(E19); C+: Control Positivo; C-: Control Negativo (H₂O PCR). L: Ladder 100 pb.

Se encontró que el 16% de cepas que poseían el gen *bla*_{CTX-M} pertenecían al subtipo *bla*_{CTX-M-9} (8/50), en la Fotografía 4 se observan los productos de amplificación del gen de este subtipo.



Fotografía 4. Amplificación del subtipo *bla*_{CTX-M-9} (293 pb). Electroforesis en gel agarosa 1,5% en buffer TAE 1x, con Red Safe. Muestras positivas: 2(E10), 3(E12), 9(E3); muestras negativas: 1(E1), 4(E5), 5(E6), 6(E8), 7(E9), 8(E11); C+: Control Positivo; C-: Control Negativo (H₂O PCR). L: Ladder 100 pb.

Se muestra en la Tabla 6 la distribución de las enterobacterias productoras de BLEE por sexo, el 61,4% (35/57) de los aislados pertenecían al sexo femenino y el 38,6% (22/57), perteneció al sexo masculino.

Tabla 6. Distribución de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según sexo (n=57)

Sexo	Frecuencia	Presencia <i>bla</i> _{CTX-M}
Femenino	35(61,4%)	32/35 (91,4%)
Masculino	22 (38,6%)	18/22 (81,8%)

Se muestra en la Tabla 7 la distribución de las enterobacterias productoras de BLEE por grupo etario, la mayoría de aislados perteneció al grupo 60 años a más, con un promedio de 72 años.

Tabla 7. Distribución de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según grupo etario (n=57)

Grupo etario	Frecuencia	Presencia <i>bla</i> _{CTX-M}
Niño (0 a 9 años)	2 (3,5%)	2/2 (100%)
Adolescente (10 a 19 años)	2 (3,5%)	1/2 (50%)
Adulto (20 a 59 años)	22 (38,6%)	20/22 (90,9%)
Adulto mayor (60 años a más)	31 (54,4%)	27/31 (87,1%)

Clasificación de grupo etario según el Seguro Integral de Salud^{(50),(61)}

Para determinar la relación entre la presencia del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE con el grupo etario y género se utilizó la prueba Chi cuadrado y se obtuvo un valor de Pearson χ^2 de 3,14 y 1,16 con un valor *p* no significativo de 0,37 y 0,28 (*p* >0,05), respectivamente.

En la Tabla 8, se muestra la distribución de las enterobacterias productoras de BLEE según el servicio de procedencia, se observó que el servicio de procedencia más frecuente fue Urología (25/57; 43,9%), seguido por Medicina Oncológica (13/57; 22,8%) y Ginecología (9/57; 15,8%).

Tabla 8. Distribución de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según servicio de procedencia (n=57)

Servicio de Procedencia	Frecuencia	Presencia <i>bla</i> _{CTX-M} (%)
Urología	25 (43,9%)	23/25 (92%)
Medicina Oncológica	13 (22,8%)	10/13 (76,9%)
Ginecología	9(15,8%)	9/9 (100%)
Abdomen	3 (5,3 %)	2/3 (66,7%)
Pediatría Oncológica	1 (1,8%)	1/1 (100%)
Tórax y mama	2 (3,5%)	2/2 (100%)
Cabeza y cuello	1 (1,8%)	1/1 (100%)
Mamas y tejidos blandos	1 (1,8%)	0/1 (0%)
Neurocirugía	1 (1,8%)	1/1 (100%)
Radioterapia	1 (1,8%)	1/1 (100%)

En la Tabla 9, se muestra la frecuencia de neoplasias según sitios de origen de los pacientes hospitalizados en INEN. Se encontró que las neoplasias tuvieron como sitio de origen más frecuente a la vejiga, siendo predominante el tumor maligno de la vejiga urinaria - parte no especificada con un 78,6% (11/14).

Tabla 9. Frecuencia de neoplasias según sitios de origen de los pacientes hospitalizados del INEN (n=61)

Origen	Frecuencia	Presencia <i>bla</i> _{CTX-M} (%)
Vejiga	14 (23%)	13/14 (92,9%)
Útero	10 (16%)	9/10 (90%)
Próstata	8 (13%)	6/7 (85,7%)
Médula ósea	5 (8 %)	4/5 (80%)
Intestino grueso	4 (7%)	3/4 (75%)
Cerebro	3 (5%)	3/3 (100%)
Estómago	2 (3%)	1/2 (50%)
Hígado	2 (3%)	2/2 (100%)
Ovario	2 (3%)	2/2 (100%)
Páncreas	2 (3%)	2/2 (100%)
Riñón	2 (3%)	2/2 (100%)
Encéfalo	1 (2%)	1/1 (100%)
Ganglios linfáticos	1 (2%)	0/1 (0%)
Mama	1 (2%)	0/1(0%)
Pene	1 (2%)	1/1 (100%)
Tiroides	1 (2%)	1/1 (100%)
Vagina	1 (2%)	1/1 (100%)
Vesícula biliar	1 (2%)	1/1 (100%)

La bacteria aislada más frecuente fue *Escherichia coli*, en el 65,7% de mujeres (23/35) y el 59,1% de varones (13/22); seguido por *Klebsiella pneumoniae* en el 40,9% de varones (9/22) y en el 28,6% de mujeres (10/35). Así también, *Proteus mirabilis* en el 5,7% de las mujeres (2/22).

En la Tabla 10, se presenta la distribución del gen *bla*_{CTX-M} según el género bacteriano. Se observó que el 91,7% (33/36) de *E. coli* presenta el gen *bla*_{CTX-M}; así como el 79% (15/19) de *K. pneumoniae* y el 100% (2/2) de *P. mirabilis*.

Tabla 10. Distribución del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según género bacteriano (n=57)

Enterobacteria	N° de aislados	Porcentaje	Presencia <i>bla</i> _{CTX-M}
<i>Escherichia coli</i>	36	63,2%	33/36 (91,7%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	33,3%	15/19 (79%)
<i>Proteus mirabilis</i>	2	3,5%	2/2 (100%)
Total	57	100%	50/57 (87,7%)

En la Tabla 11, se muestra la distribución de los subtipos *bla*_{CTX-M} según el género bacteriano. De los aislados de *K. pneumoniae* que presentaron el gen *bla*_{CTX-M}: el 100% (15/15) pertenece al subtipo *bla*_{CTX-M-1}; en cuanto a los aislados de *E. coli* que presentaron el gen *bla*_{CTX-M}: el 78,8% (26/33) pertenece al subtipo *bla*_{CTX-M-1} y el 21,2% (7/33) al subtipo *bla*_{CTX-M-9}; por su parte, las cepas de *P. mirabilis* estuvieron distribuidas homogéneamente entre los genes *bla*_{CTX-M} subtipo *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9}.

Tabla 11. Distribución de los subtipos *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN según género bacteriano (n=50)

Enterobacteria	Gen <i>bla</i> _{CTX-M} (n=50)		
	Subtipo <i>bla</i> _{CTX-M-1}	Subtipo <i>bla</i> _{CTX-M-2}	Subtipo <i>bla</i> _{CTX-M-9}
<i>Escherichia coli</i> (n=33)	26	0	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=15)	15	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> (n=2)	0	1	1
Total	41	1	8

Se analizaron los reportes de resultados brindados por el equipo automatizado BD PHOENIX 100™, y se extrajo información de la CMI de los siguientes antibióticos: amikacina (AMK), gentamicina (GEN), imipenem (IMI), meropenem (MER), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO) y ciprofloxacina (CIP) encontrados para cada aislamiento. Se tomaron en cuenta los puntos de corte del manual M-100 del CLSI 2017. El panel de antibióticos usado para procesar enterobacterias procedentes de urocultivos positivos fue BD Phoenix™ UNMIC/ID-407, este cuenta con ceftriaxona mas no con cefotaxima; cabe mencionar que los resultados interpretativos y la eficacia clínica de estas dos cefalosporinas son similares^(39,51),^(39,52).

El perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las enterobacterias productoras de BLEE mostró un fenotipo multidrogo resistente (MDR): 98,2% fue resistente a CRO, 91,2%, a CIP, 59,6%, a CAZ, 42,1%, a GEN; a pesar de que el 98,2% fue sensible a AMK (Gráfico 1).

Cabe mencionar que se categoriza como MDR cuando una cepa es resistente: al menos 1 antibiótico en 3 o más familias de antibióticos⁽⁵²⁾, en la presente investigación principalmente contra los β -lactámicos (ceftriaxona y ceftazidima), seguido por fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y aminoglucósidos (gentamicina). El 38,6% de las cepas productoras de BLEE presentaron fenotipo multidrogo resistente.

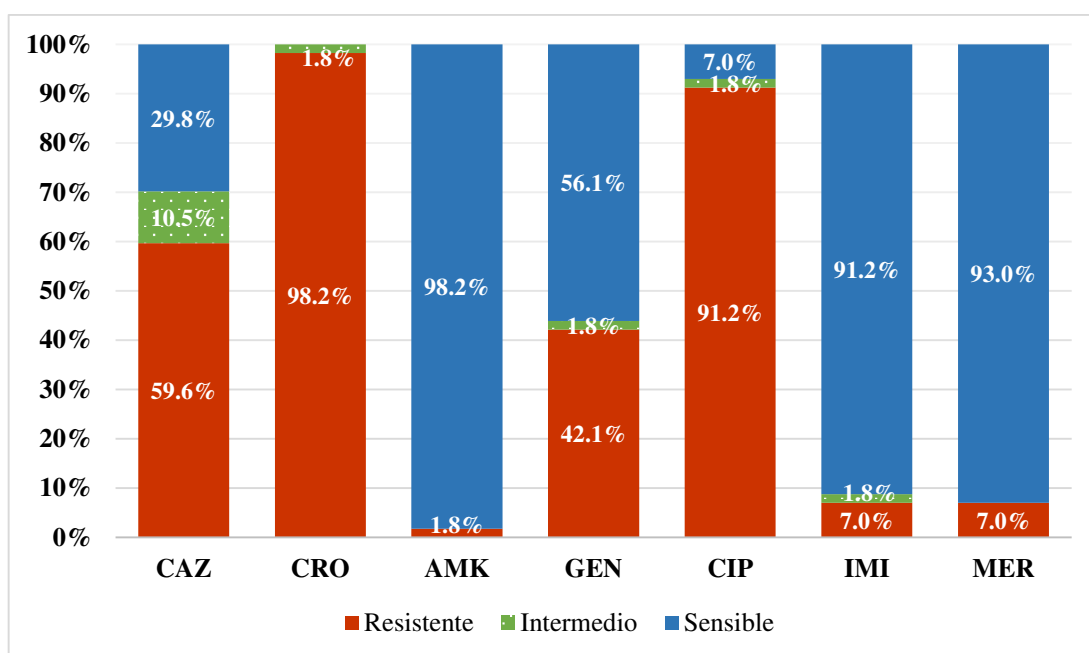


Gráfico 1. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN (n=57). Amikacina (AMK), gentamicina (GEN), imipenem (IMI), meropenem (MER), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO) y ciprofloxacina (CIP).

Se reporta que los aislados de enterobacterias productoras de BLEE fueron resistentes al menos a un antibiótico; sin embargo, ninguno fue resistente a todos los antibióticos. De la misma manera, el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las enterobacterias productoras de BLEE tipo CTX-M demostró un alto nivel de resistencia a antibióticos; todas las enterobacterias portadoras del gen *bla*_{CTX-M} fueron resistentes a ceftriaxona, el 94%, a ciprofloxacina, el 58%, a ceftazidima, el 42%, a gentamicina; por otro lado, el 98% de cepas fueron sensibles a amikacina (Gráfico 2).

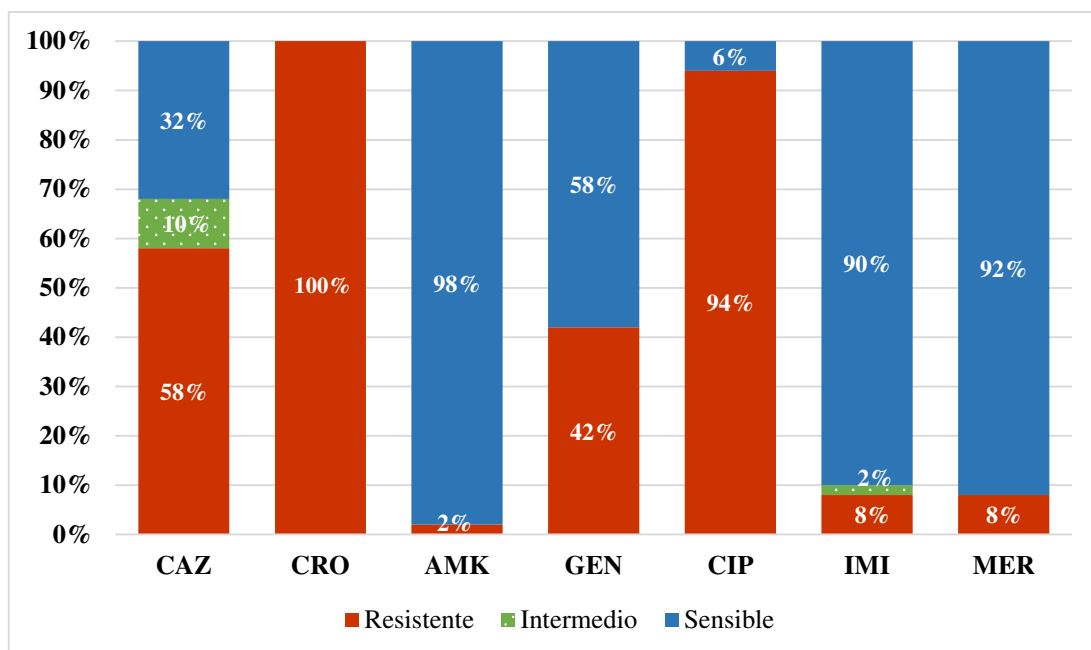
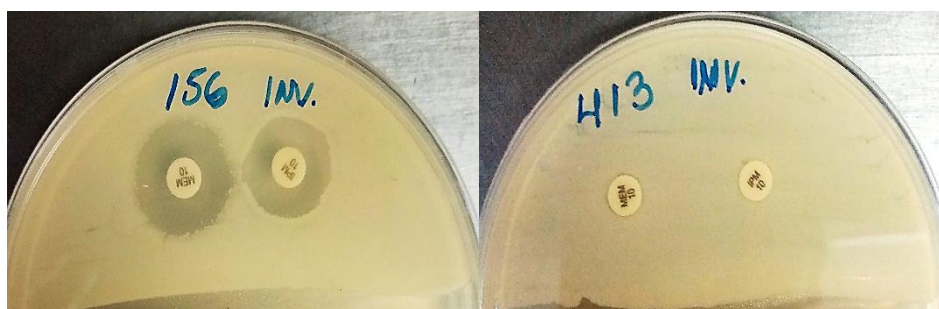


Gráfico 2. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de enterobacterias productoras de BLEE portadoras del gen *bla*_{CTX-M} (n=50) Amikacina (AMK), gentamicina (GEN), imipenem (IMI), meropenem (MER), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO) y ciprofloxacina (CIP).

Por otro lado, se encontraron 4 aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos que presentaron el gen *bla*_{CTX-M}. Ver Fotografía 5.



Fotografía 5. Aislados resistentes a carbapenémicos.

En la Tabla 12, se muestra el perfil de susceptibilidad de las cepas que no portaron el gen *bla*_{CTX-M} (n=7); 6 cepas fueron resistentes a ceftriaxona, 5 cepas, a ceftazidima y ciprofloxacina, 3 cepas, a gentamicina y todas las cepas fueron sensibles a los carbapenémicos y amikacina.

Tabla 12. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de enterobacterias productoras de BLEE gen *bla*_{CTX-M} negativo (n=7)

Cepas	Enterobacteria	AMK	GEN	IMI	MER	CAZ	CRO	CIP
E-3	<i>E. coli</i>	S	R	S	S	S	R	R
E-4	<i>E.coli</i>	S	I	S	S	R	R	R
E-7	<i>K. pneumoniae</i>	S	R	S	S	I	R	I
E-26	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	R	R	R
E-31	<i>E. coli</i>	S	R	S	S	R	R	R
E-34	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	R	I	R
E-37	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	R	R	S

Amikacina (AMK), gentamicina (GEN), imipenem (IMI), meropenem (MER), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), sensible (S) y resistente (R).

Para determinar la relación entre la presencia del gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE con el perfil de susceptibilidad se utilizó la prueba Chi cuadrado; se obtuvo un valor de Pearson χ^2 de 7,39, 7,27 y 8,09 con valores *p* significativos de 0,03, 0,01 y 0,02 (<0.05) para gentamicina, ceftriaxona y ciprofloxacina, respectivamente. Ver Tabla 13.

Tabla 13. Relación entre la presencia del gen *bla_{CTX-M}* y perfil de susceptibilidad a los antibióticos en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del INEN

Antibióticos	Presencia del gen <i>bla_{CTX-M}</i>	Perfil de susceptibilidad			Total	<i>p value</i>
		I	R	S		
Amikacina	Negativo	-	0	7	7	0,706
		-	0,1*	6,9*	7,0	
Positivo	-	1	49	50		
	-	0,9*	49,1*	50,0		
Gentamicina	Negativo	1	3	3	7	0,025
		0,1*	2,9*	3,9*	7,0	
Positivo	0	21	29	50		
	0,9*	21,1*	28,1*	50,0		
Imipenem	Negativo	0	0	7	7	0,681
		0,1*	0,5*	6,4*	7,0	
Positivo	1	4	45	50		
	0,9*	3,5*	45,6*	50,0		
Meropenem	Negativo	-	0	7	7	0,438
		-	0,5*	6,5*	7,0	
Positivo	-	4	46	50		
	-	3,5*	46,5*	50,0		
Ceftazidima	Negativo	1	5	1	7	0,625
		0,7*	4,2*	2,1*	7,0	
Positivo	5	29	16	50		
	5,3*	29,8*	14,9*	50,0		
Ceftriaxona	Negativo	1	6	-	7	0,007
		0,1*	6,9*	-	7,0	
Positivo	0	50	-	50		
	0,9*	49,1*	-	50,0		
Ciprofloxacina	Negativo	1	5	1	7	0,018
		0,1*	6,4*	0,5*	7,0	
Positivo	0	47	3	50		
	0,9*	45,6*	3,5*	50,0		

Se observó en las enterobacterias que presentaron el subtipo *bla_{CTX-M-1}*: el 100% fue resistente a ceftriaxona, el 92,7%, a ciprofloxacina, el 70,7%, a ceftazidima y el 46,3%, a gentamicina; las cuatro cepas resistentes a carbapenémicos pertenecen a este subtipo. Las enterobacterias que presentaron el subtipo *bla_{CTX-M-9}* fueron resistentes a ceftriaxona y ciprofloxacina, además fueron sensibles a ceftazidima, amikacina y carbapenémicos. El aislado que presentó el subtipo *bla_{CTX-M-2}* fue resistente a

ciprofloxacina y ceftriaxona, sensible a ceftazidima, gentamicina, amikacina; fue intermedio a imipenem, pero fue sensible a meropenem.

En cuanto a la relación entre la presencia de los subtipos del gen *bla*_{CTX-M} con el perfil de susceptibilidad se utilizó la prueba Chi², obteniéndose los siguientes resultados:

- Existe asociación estadística entre el subtipo *bla*_{CTX-M-1} en enterobacterias productoras de BLEE con el perfil de susceptibilidad; se obtuvieron valores de Pearson Chi² de 25,19 y 7,27 con valores *p* significativos de 0,001 y 0,026 (<0.05) para ceftazidima y ceftriaxona, respectivamente.
- Existe asociación estadística entre el subtipo *bla*_{CTX-M-2} en enterobacterias productoras de BLEE con el perfil de susceptibilidad; se obtuvieron valores de Pearson Chi² de 7,27 y 57,63 con valores *p* significativos de 0,026 y 0,001(<0.05) para ceftriaxona e imipenem, respectivamente.
- Existe asociación estadística entre el subtipo *bla*_{CTX-M-9} en enterobacterias productoras de BLEE con el perfil de susceptibilidad; se obtuvieron valores de Pearson Chi² de 21,98 y 7,27 con valores *p* significativos de 0,001 y 0,026 (<0.05) para ceftazidima y ceftriaxona, respectivamente.

En el anexo 6 se detalla el análisis estadístico de la relación entre la presencia de los subtipos *bla*_{CTX-M} con el perfil de susceptibilidad del resto de antibióticos.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer reporte que describe la frecuencia del gen que codifica BLEE tipo CTX-M en pacientes oncológicos en Perú. Se demostró una alta frecuencia de BLEE tipo CTX-M en enterobacterias aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas; en total, el 87,7% de las enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos presentaron el gen *bla*_{CTX-M} con predominio del subtipo *bla*_{CTX-M-1} (82%), seguido del subtipo *bla*_{CTX-M-9} (16%) y subtipo *bla*_{CTX-M-2} (2%) entre los aislados clínicos.

Estos hallazgos están en concordancia con el hecho de que las BLEE tipo CTX-M son las mayormente diseminadas y globalmente dominantes a la fecha^(7,35,53,54).

En cuanto a la frecuencia reportada sobre el gen *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de BLEE, se concuerda con lo reportado por Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾, Xia et al. 2014⁽¹³⁾ y Sennati et al. 2012⁽⁹⁾ quienes informaron también una alta frecuencia del gen *bla*_{CTX-M}, con un 95,5%, 98,1% y 94%, respectivamente; así mismo, el estudio peruano realizado por Méndez 2015⁽⁴⁷⁾ reportó la presencia del gen *bla*_{CTX-M} en el 85,7% (18/21) de *E. coli* aisladas de urocultivos porcentaje menor comparado al 91,7% de *E. coli* portadoras gen *bla*_{CTX-M} halladas en el presente estudio.

Por otro lado, Ghasemi et al. 2013⁽³⁾ reportaron en aislados clínicos de pacientes hospitalizados la presencia del gen *bla*_{CTX-M} en el 41,7% de cepas de *K. pneumoniae*, porcentaje menor comparado al 79% de *K. pneumoniae* portadoras gen *bla*_{CTX-M} halladas en el presente estudio.

Se encontró que el subtipo más frecuente en los aislados fue *bla*_{CTX-M-1} con 82%, seguido el subtipo *bla*_{CTX-M-9}, con un 16%, y el subtipo *bla*_{CTX-M-2}, con un 2 %. Estos datos concuerdan con las frecuencias de los subtipos *bla*_{CTX-M} reportadas por Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾, ya que encontraron que el subtipo predominante fue *bla*_{CTX-M-1} (96,9%), seguido del subtipo *bla*_{CTX-M-9} (4,7%) y el subtipo *bla*_{CTX-M-2} (1,6%).

En el presente estudio no se encontró la presencia de distintos subtipos del gen *bla*_{CTX-M} en una misma cepa; sin embargo, Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾, reportaron que el 1,6% de enterobacterias del subtipo *bla*_{CTX-M-1} compartieron genes de los subtipos

*bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}, otro 1,6% compartió genes de los subtipos *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-9}; y el 96,8% presentó únicamente genes del subtipo *bla*_{CTX-M-1}.

A diferencia del presente trabajo, Kim et al. 2005⁽⁵⁵⁾ reportaron una menor frecuencia del gen *bla*_{CTX-M} (25,2%) en 163 aislados nosocomiales de enterobacterias productoras de BLEE en tres hospitales universitarios en Corea del Sur; sin embargo, coinciden sobre el subtipo *bla*_{CTX-M} más frecuente: subtipo *bla*_{CTX-M-1}, representado con un 68,3% seguido por el gen *bla*_{CTX-M-9} con un 31,7%, mientras que Pallecchi et al. 2007⁽¹⁴⁾ y Xia et al. 2014⁽¹³⁾ reportaron como subtipo predominante al *bla*_{CTX-M-9}, con frecuencias de 67% y 52,4%, respectivamente.

Similar al presente estudio, Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾ y Pallecchi et al. 2007⁽¹⁴⁾ reportaron bajas frecuencias del subtipo *bla*_{CTX-M-2} con valores de 1,6% (1/64) y 11% (2/18), respectivamente; así mismo, Xia et al. 2014⁽¹³⁾ y Kim et al. 2005⁽⁵⁵⁾ no encontraron ningún aislado portador del subtipo *bla*_{CTX-M-2}.

El estudio realizado en Nepal por Chander y Shrestha 2013⁽⁵⁶⁾ en urocultivos coincide con el presente trabajo sobre el género con mayor cantidad de pacientes portadores de enterobacterias productoras de BLEE es el género femenino; sin embargo, a diferencia del presente estudio encontraron que el grupo etario de 16 a 45 años reveló mayor incidencia de enterobacterias productoras de BLEE. La diferencia se deba posiblemente a las características de los pacientes de donde se aíslan las enterobacterias; en el presente estudio son pacientes oncológicos y las neoplasias son más frecuentes en adultos mayores (60 años a más)⁽⁴⁾.

Al igual que Bonnet⁽²⁷⁾ y Canton⁽¹⁶⁾ se encontró la presencia del gen *bla*_{CTX-M} predominantemente en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, el hecho de que se haya encontrado el gen *bla*_{CTX-M} en distintas especies demuestra la transferencia horizontal y amplia diseminación de estos genes entre los pacientes hospitalizados del INEN.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican al igual que la mayoría de investigaciones; la presencia de fenotipo multirresistente en enterobacterias productoras de BLEE^(12,14,54,55). Se reporta un alto porcentaje de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, principalmente a ceftriaxona, en el 98,2% de las

enterobacterias productoras de BLEE; similar al 98,4% informado por Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾. Así mismo, Xia et al. 2014⁽¹³⁾ y Chander y Shrestha 2013⁽⁵⁶⁾, reportan que todas las cepas productoras de BLEE fueron resistentes a ceftriaxona. En cuanto a la resistencia a ceftazidima, el presente estudio encontró un 59,6% en enterobacterias productoras de BLEE; resultado similar reportado por Xia et al. 2014⁽¹³⁾ y Ghasemi et al. 2013⁽³⁾, con 58,6% y 46,7%, respectivamente.

En el presente trabajo de investigación, se reporta que el 58% enterobacterias productoras de BLEE tipo CTX-M mostraron resistencia a ceftazidima, un porcentaje considerable que respalda la importancia de usar más de una cefalosporina para el tamizaje y confirmación de la producción de BLEE^(27,37). A pesar de que se considere la resistencia a ceftazidima como un significativo indicador de BLEE; al usarse solo podría no reconocer las cepas productoras de CTX-M susceptibles a la ceftazidima como BLEE y por lo tanto, obstaculizar en gran medida el control de la diseminación de aislados productores de BLEE tipo CTX-M.

En el actual estudio se reporta una alta resistencia a ciprofloxacina, el 91,2% de cepas productoras de BLEE, similar a Xia et al. 2014⁽¹³⁾ con una resistencia de 81,2% a ciprofloxacina; a diferencia de Ghasemi et al. 2013⁽³⁾ que reporta un 21,7% de resistencia a este antibiótico.

Se reporta una mayor resistencia a gentamicina de 42,1% en comparación a Chander y Shrestha⁽⁵⁶⁾ que informaron un 29,8%; en cuanto a la sensibilidad frente a amikacina encontraron un 91,7%, porcentaje similar al estudio (98,2%). La mayoría de las cepas productoras de BLEE fueron susceptibles a amikacina; Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾, Xia et al. 2014⁽¹³⁾ y Ghasemi et al. 2013⁽³⁾ reportan también baja resistencia a este antibiótico. En el 2018, Zeynudin et al.⁽¹²⁾ encontraron que un 89,1% fue resistente a gentamicina, cuyo porcentaje es aproximadamente el doble del que reporta la presente investigación (42,1%), lo contrario sucedió con la resistencia a ciprofloxacina, donde este estudio demostró una resistencia de 91,2% comparado con el 59,4% reportado por Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾; por otro lado, a diferencia del presente estudio no reportan algún aislado resistente a imipenem y meropenem.

La presencia de BLEE tipo CTX-M está frecuentemente asociado con fenotipos co-resistentes en particular a fluoroquinolonas y aminoglucósidos^(7,8,54), y así se reporta en el presente estudio, donde el 94% y 42% de enterobacterias CTX-M fueron resistentes a fluoroquinolonas y aminoglucósidos, respectivamente; similar a lo encontrado por Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾ donde el 78,1% y 92,2% fueron coresistentes a fluoroquinolonas y aminoglucósidos, respectivamente.

En la presente investigación se reporta que el 42% de aislados productores de BLEE tipo CTX-M fue resistente a por lo menos un antibiótico en 3 o más familias de antibióticos, siendo esto un porcentaje menor a lo informado por Zeynudin et al. 2018⁽¹²⁾ y Pallecchi et al. 2007⁽¹⁴⁾ para quienes la totalidad de enterobacterias portadoras del gen *bla*_{CTX-M} presentaron perfiles multidrogo resistentes; sin embargo, el porcentaje reportado en este estudio indica la presencia de un importante número de enterobacterias multidrogo resistentes circulantes entre los pacientes hospitalizados del INEN durante el 2017.

Se reporta que el 100% de cepas que presentaron el subtipo *bla*_{CTX-M-1} fueron resistentes a ceftriaxona y el 70,7% fue resistente a ceftazidima, a diferencia de los subtipos *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9}, donde todos los aislados fueron resistentes a ceftriaxona y sensibles a ceftazidima.

La co-resistencia con ciprofloxacina fue similar a lo encontrado por Pallecchi et al. 2007⁽¹⁴⁾ quienes reportaron que los aislados del subtipo *bla*_{CTX-M-1} (CTX-M-15) presentaron altas tasas de co-resistencia para quinolonas (93% con ciprofloxacina).

Por otro lado, Kim et al. 2005⁽⁵⁵⁾ encontraron que 73,9% (17/23) de las enterobacterias portadoras del subtipo *bla*_{CTX-M-1} fueron resistentes a amikacina y presentaron valores de CMI ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo, en el presente trabajo se halló que el 2,4% (1/41) de aislados pertenecientes al subtipo *bla*_{CTX-M-1} fue resistente a amikacina y presentó una CMI >32 $\mu\text{g/ml}$.

El presente estudio reportó 4 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos y portadoras del gen *bla*_{CTX-M} subtipo 1. El hecho de que las cepas resistentes a carbapenémicos, también poseedoras del gen *bla*_{CTX-M} subtipo 1, hayan sido

identificadas como *K. pneumoniae* resulta alarmante debido a que el comportamiento epidemiológico de la *K. pneumoniae* es diferente a *E. coli*; pues a diferencia de la aparición esporádica de estas, la *K. pneumoniae* se disemina de forma epidémica en el hospital y está relacionada con la co-morbilidad de los pacientes, las maniobras terapéuticas y diagnósticas; así también, el uso preliminar de antibióticos principalmente oximinocefalosporinas⁽²⁶⁾.

Pallecchi et al. 2007⁽¹⁴⁾ reportaron cepas productoras CTX-M-2 con co-resistencia para gentamicina; en comparación con la cepa subtipo *bla*_{CTX-M-2} reportada en este estudio, sensible a gentamicina. Por otro lado, Merida et al. 2016⁽⁵⁷⁾ reportaron menor co-resistencia entre cepas productoras CTX-M-9 con ciprofloxacina (41,7%); el presente estudio encontró que el 100% de cepas productoras CTX-M-9 también fueron resistentes a ciprofloxacina.

Así mismo, Merida et al. 2016⁽⁵⁷⁾ reportaron que todas las cepas que presentaron el subtipo *bla*_{CTX-M-9} fueron resistentes a ceftriaxona; pero solo el 20% fue sensible a ceftazidima mientras el presente estudio reporta que todas las cepas fueron sensibles a ceftazidima.

Se encontró que las cepas que presentaron el subtipo *bla*_{CTX-M-9} fueron sensibles a amikacina y carbapenémicos al igual que Logan et al. 2019⁽⁵⁸⁾; quienes informan que en enterobacterias productoras de BLEE CTX-M-9, aisladas de urocultivos, el 90% fue sensible a gentamicina porcentaje mayor al 75% que reporta el presente estudio.

El alto nivel de resistencia a los β -lactámicos y los no- β -lactámicos, así como la tendencia a un perfil MDR asociado con la presencia de genes *bla*_{CTX-M} son alarmantes y reafirman la necesidad de realizar pruebas de susceptibilidad de antibióticos para la elección adecuada de la terapia y limitar la propagación de la resistencia antimicrobiana en Perú y en la región.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Existe una alta frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE tipo CTX-M aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, representado en un 87,7% del total de aislados.
- Se identificó al menos uno de los subtipos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9} en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos en el INEN de enero a diciembre del 2017, el subtipo predominante fue el subtipo *bla*_{CTX-M-1}.
- La enterobacteria más frecuentemente aislada fue *E. coli* representando el 63,2% del total de aislados.
- El grupo etario con mayor cantidad de aislados fue mayor de 60 años, representado por el 54,4% del total, con una edad promedio de 72 años.
- El servicio de procedencia con mayor cantidad de enterobacterias productoras de BLEE fue urología y el sitio de origen de neoplasia con mayor cantidad de aislados de enterobacterias productoras de BLEE fue la vejiga.
- El género femenino presentó mayor porcentaje de enterobacterias productoras de BLEE tipo CTX M.
- El más alto nivel de resistencia de aislamientos de enterobacterias BLEE tipo CTX-M a antibióticos fue contra ceftriaxona y ciprofloxacina.
- La amikacina fue el antibiótico con menor resistencia en los aislamientos de enterobacterias BLEE tipo CTX-M.

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar estudios moleculares en enterobacterias donde se incluyan la búsqueda otros tipos de BLEE como TEM, SHV, PER con el fin de determinar la mayoría de los tipos de BLEE circulantes, a la vez determinar si estos genes β -lactamasas se presentan de forman individual o conjunta; a partir de esta información poder implementar mejoras en la prevención y control de infecciones producidas por estas enterobacterias.
- Realizar pruebas de secuenciamiento a fin de determinar las variantes alélicas del gen *bla_{CTX-M}* y describir posibles mutaciones que indicarían evolución local del gen *bla_{CTX-M}*.
- Realizar estudios de clonalidad de las enterobacterias portadoras del gen *bla_{CTX-M}* para evaluar el clon relacionado con la diseminación del gen y a fin de tomar acciones para controlar la diseminación de esta.
- Realizar estudios de agrupación filogenética de las enterobacterias portadoras del gen *bla_{CTX-M}* para evaluar si existe asociación entre el grupo filogenético y la presencia del gen.
- Realizar estudios de caracterización molecular de los plásmidos portadores del gen *bla_{CTX-M}* en las enterobacterias para establecer la relación genética que existe entre ellas y tener datos relevantes que puedan sugerir el modo de propagación del gen *bla_{CTX-M}*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García C, Astocondor L, Banda C. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Med Per.* 2012;29(3):163–9.
2. Reinert R, Low D, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky M. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(5):1018–29.
3. Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, Mohkam M. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Units of a referral hospital in Shiraz, Iran. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6(9):703–8.
4. Regalado M. Infecciones en el paciente oncológico. *Rev Esp Pediatr.* 2013;140–154.
5. Cornejo P, Velásquez C, Sandoval S, Gordillo P, Volkow P. Patrones de resistencia bacteriana en urocultivos en un hospital oncológico. *Salud Publ Mex.* 2007;49(5):330–6.
6. Villegas M, Kattan J, Quinteros M, Casellas J. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Supl 1):154–158.
7. Bevan E, Jones A, Hawkey P. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(8):2145–55.
8. D'Andrea M, Arena F, Pallecchi L, Rossolini G. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6–7):305–17.
9. Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, et al. Changing Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):6003–5.
10. Diaz J, Amar W, Angulo M, Bustamante Y. La prevalencia de *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y otras resistencias en urocultivos en un hospital general de Ica, Perú. *Rev Med Panacea.* 2018;5(1):20-24.
11. Galván F, Agapito J, Bravo N, Lagos J, Tamariz J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Rev Medica Hered.* 2016;27(1):22–29.

12. Zeynudin A, Pritsch M, Schubert S, Messerer M, Liegl G, Hoelscher M, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of gram-negative bacilli in Jimma, Ethiopia. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018 [citado el 13 de julio de 2019];18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6196031/>.
13. Xia S, Fan X, Huang Z, Xia L, Xiao M, Chen R, et al. Dominance of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolated from Patients with Community-Onset and Hospital-Onset Infection in China. *PLoS One*. 2014 [citado el 8 de agosto de 2019]; 9(7): e100718. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100707>.
14. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al. Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(8):2720–5.
15. García C, Astocondor L, Rojo B, Jacobs J, Sáenz Y. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producer *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Neonatal Sepsis in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(2):285–8.
16. Paciel D, Seija V, Prieto J, Vignoli R, Medina J. Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). *Rev tendencias*. (In press)
17. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect Off Public Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;14 (Suppl 1):144–53.
18. OMS, Resistencia a los antibióticos [Internet]. WHO. [citado el 25 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>.
19. Echevarría J, Sarmiento E, Osoreo F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Med Per*. 2006;23(1):26–31.
20. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk M, Hummers E. The Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(21):361–7.
21. Infecciones de tracto urinario. *Nefrología al día* [Internet]. [citado el 19 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-infecciones-tracto-urinario-4>.
22. Grabe K, Bartoletti R, Bjerklund T, Cek H, Pickard R, Tenke P, et al. Introduction: Pathogenesis of UTIs. *Guidelines on Urogenital infections*. Arnhem: European Association of Urology; 2014.8-11.

23. Flores A, Walker J, Caparon M, Hultgren S. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(5):269–84.
24. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio*. [Internet]. 2008 [citado el 20 de agosto de 2019] 12(3):227–32. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922008000300007&lng=en.
25. Munita J, Arias C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 [citado el 19 de julio de 2019];4(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/>.
26. Morejón M. Betalactamasas de espectro extendido. *Rev Cuba Med*. 2013;52(4):272–280.
27. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):1–14.
28. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan N, Han B, Gao J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases [Internet]. *BioMed Res Int*. 2018 [citado el 19 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/9519718/>.
29. Cantón R, Valverde A, Novais A, Baquero F, Coque T. Evolución y panorama actual de las BLEE. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(Supl 2):2–10.
30. Bradford P. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):933–51.
31. Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.
32. Abarca G, Herrera M. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev Med Hosp Nac Niños Dr Carlos Sáenz Herrera*. 2001;36(1–2):77–104.
33. Shaik S, Fatima J, Shakil S, Rizvi D, Amjad M. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2015; 22(1):90-101.
34. Cantón R, González J, Galán J. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* [Internet]. 2012 [citado el 6 de diciembre de 2017];3. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00110/>.
35. Rossolini G, D'andrea M, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(Supl 1):33–41.

36. Tenover F. Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Bacterial Pathogens. Antimicrobial Drug Resistance [Internet]. 2009 [citado el 8 de febrero de 2018]. 1151–9. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-60327-595-8_34.
37. Máttar S, Martínez P. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. Infectio. [Internet]. 2007 [citado el 12 de junio de 2019].;11(1):23–35. Disponible en: <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/136>.
38. Álvarez D. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. Rev Habanera Cienc Médicas. 2010;9(4):516–24.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017;35(3).
40. Lezameta L, Gonzáles E, Tamariz J. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2010 [citado el 6 de diciembre de 2017];27(3). Disponible en: <http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/1491>.
41. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988;10(4):867–78.
42. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B, et al. Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1463–8.
43. Carroll K, Glanz B, Borek A, Burger C, Bhally H, Henciak S, et al. Evaluation of the BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2006;44(10):3506–9.
44. Jacoby G, Munoz L. The new beta-lactamases. N Engl J Med. 2005; 352(4): 380–91.
45. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(2):116–129.
46. Mella S, Zemelman C, Bello H, Dominguez M, Gonzalez G, Zemelman R. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de

- cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. Rev Chil Infectol. 2001;18(1):7–19.
47. Méndez E. Determinación de la frecuencia del gen CTX-M que codifica β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* uropatógenas aisladas en el Hospital Guillermo Almenara de marzo a mayo del año 2012. [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2015.
 48. Xu L. Rapid and simple detection of blaCTX-M genes by multiplex PCR assay. J Med Microbiol. 2005;54(12):1183–7.
 49. Rodríguez C, Radice M, Perazzi B, Castro S, Juárez J, Santini P, et al. Resistencia enzimática a betalactámicos en el género *Proteus* y evaluación de los fenotipos y genotipos de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *Proteus mirabilis*. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2005;23(3):122–6.
 50. Seguro Integral de Salud [Internet]. [citado el 21 de julio de 2019]. Disponible en: http://www.sis.gob.pe/estad_resum.html.
 51. Cona T. Etapas en la evaluación de diferentes cefalosporinas: Un flujograma lógico. Rev Chil Infectol. 2002;19:88–92.
 52. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268–81.
 53. Liu L, Wu Y, Liu W, Lanlan T, Zhang X. Prevalence and Characterization of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* from Pneumonia Patients in Southwest China. American Thoracic Society [Internet]. 2018 [citado el 13 de julio de 2019]. A5516–A5516. Disponible en: https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2018.197.1_MeetingAbstracts.A5516.
 54. Lohani B, Thapa M, Sharma L, Adhikari H, Sah A, Khanal A, et al. Predominance of CTX-M Type Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) Producers Among Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in a Tertiary Care Hospital, Kathmandu, Nepal. Open Microbiol J [Internet]. 2019 [citado el 13 de julio de 2019];13(1). Disponible en: <https://benthamopen.com/TOMICROJ-13-28>.
 55. Kim J, Lim Y, Jeong Y, Seol S. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(4):1572–5.
 56. Chander A, Shrestha C. Prevalence of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* urinary isolates in a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. BMC Res Notes. 2013;6:487.

57. Merida J, Colsa A, Castañeda Y, Barbosa P, Andrade A. First Report of Group CTX-M-9 Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Pediatric Patients in Mexico. PLoS One. 2016;11(12):e0168608.
58. Logan L, Medernach R, Domitrovic T, Rispens J, Hujer A, Qureshi N, et al. The Clinical and Molecular Epidemiology of CTX-M-9 Group Producing *Enterobacteriaceae* Infections in Children. Infect Dis Ther. 2019;8(2):243–54.
59. ICD-10 Version:2016 [Internet]. [citado el 15 de julio de 2019]. Disponible en: <https://icd.who.int/browse10/2016/en#/>.

ANEXOS

Anexo 1

Lista de antibióticos del panel BD PHOENIX™ UNMIC/ID-407

Antibiótico		(µg/mL)
Ampicilina	AM	4 - 16
Amoxicilina/Clavulánico	AMC	4/2 - 16/8
Amikacina	AN	8 - 32
Ceftazidima	CAZ	1 - 16
Ciprofloxacina	CIP	0,125 - 2
Ceftriaxona	CRO	1 - 4
Cefuroxima	CXM	4 - 16
Cefazolina	CZ	2 - 16
Ertapenem	ETP	0,25 - 2
Cefepime	FEP	1 - 16
Nitrofurantoina	FM	16 - 64
Cefoxitina	FOX	4 - 16
Gentamicina	GM	2 - 8
Imipenem	IPM	0,25 - 8
Levofloxacina	LVX	1 - 4
Meropenem	MEM	0,5 - 8
Norfloxacina	NOR	2 - 8
Trimethoprim/Sulfametoxazol	SXT	0,5/9,5 - 2/38
Tetraciclina	TE	2 - 8
Piperacilina – Tazobactam	TZP	4/4 - 64/4
BLEE	BLEE	<9
Cefotaxima/Clavulánico (BLEE)	CCX	<9
Ceftazidima/Clavulánico (BLEE)	CCZ	<9
Cefpodoxima-proxetil (BLEE)	CPD	<9
Ceftazidima (BLEE)	CAZ	<9
Ceftriaxona/Clavulánico (BLEE)	CCR	<9

Para uso con el Sistema Phoenix ID/AST

Anexo 2

Ficha de Recolección de Datos

Frecuencia y subtipos del gen *bla*_{CTX-M} en Enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de enero a diciembre del 2017

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha: ID de la cepa:
 Bacteria aislada: Origen: Urocultivo
 Mecanismo de resistencia detectado(fenotipo):

Información epidemiológica

Edad: Sexo:
 Tipo de neoplasia: Sitio de origen:
 Servicio de procedencia:

Información susceptibilidad a los antibióticos

ANTIBIOTICOS	ESC COL	
	MIC/Conc.	SIR
Amikacina		
Gentamicina		
Imipenem		
Meropenem		
Ceftazidima		
Ceftriaxona		
Ciprofloxacina		

Presencia del gen *bla*_{CTX-M}

Ausente Presente

Subtipo *bla*_{CTX-M}

Subtipo 1 Subtipo 2 Subtipo 9

Comentarios:

Anexo 3

Secuencias de los *primers* y condiciones de amplificación de la PCR para la detección del gen *bla*_{CTX-M} y subtipos

Gen	Secuencia (5' → 3')	pb	Condiciones de PCR
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R:TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	593	15 min a 95°C y 35 ciclos de amplificación: 30s a 90°C, 30s a 58°C, y 2 min a 72°C, con 10 min a 72°C para la extensión final
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F: GCGTGATACCACTTCACCTC R: TGAAGTAAGTGACCAGAATC	260	2 min a 95°C y 30 ciclos de amplificación: 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, y 1 min a 72°C, con 10 min a 72°C para la extensión final
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F:TTAATGATGACTCAGAGCATTTC R:GATACCTCGCTCCATTTATTG	900	5 min a 95°C y 30 ciclos de amplificación: 1 min a 94°C, 1 min a 61°C, y 1 min a 72°C, con 10 min a 72°C para la extensión final
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F: ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTA R: GTAAGCTGACGCAACGTCTGC	293	2 min a 95°C y 30 ciclos de amplificación: 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, y 1 min a 72°C, con 10 min a 72°C para la extensión final

*=K es G o T, R as A o G, S es G o C, Y es C o T

Anexo 4

Mastermix de la PCR para el gen *bla*_{CTX-M} y subtipos

A. Mastermix de la PCR para el gen *bla*_{CTX-M} y subtipos *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-9}

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final de reacción
Buffer [X]	10	1	2,5 µL
MgCl ₂ [mM]	25	1	1 µL
dNTPs [mM]	2,5	0,2	2 µL
<i>bla</i> _{CTX-M} / <i>bla</i> _{CTX-M-1} / <i>bla</i> _{CTX-M-9} – F [µM]	10	0,2	0,5 µL
<i>bla</i> _{CTX-M} / <i>bla</i> _{CTX-M-1} / <i>bla</i> _{CTX-M-9} – R [µM]	10	0,2	0,5 µL
Taq [U/µL]	5	0,06	0,3 µL
H ₂ O PCR	-	-	15,7 µL
DNA bacteriano	-	-	2,5 µL
Volumen final			25 µL

B. Mastermix de la PCR para el gen *bla*_{CTX-M-2}

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final de reacción
Buffer [X]	10	1	2,5 µL
MgCl ₂ [mM]	25	2	2 µL
dNTPs [mM]	2,5	0,2	2 µL
<i>bla</i> _{CTX-M-2} – F [µM]	10	0,2	0,5 µL
<i>bla</i> _{CTX-M-2} – R [µM]	10	0,2	0,5 µL
Taq [U/µL]	5	0,04	0,2 µL
H ₂ O PCR	-	-	14,8 µL
DNA bacteriano	-	-	2,5 µL
Volumen final			25 µL

Anexo 5

Carta N°061-2016-CRP-DI-DICON/INEN



PERU

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Enfermedades
Neoplásicas



"AÑO DE LA CONSOLIDACIÓN DEL MAR DE GRAU"

Surquillo, 29 de agosto del 2016

CARTA N° 061-2016-CRP-DI-DICON/INEN

Doctora
CAROLINA BELMAR LOPEZ
Investigadora Principal
Presente.


De nuestra consideración:


Es grato dirigirme a usted para saludarla cordialmente e informarle que el Comité Revisor de Protocolos del Departamento de Investigación del INEN, ha revisado y aprueba el trabajo de Investigación Titulado: "VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE BACTERIAS RESISTENTE EN INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD EN LOS SERVICIOS DE HOSPITALIZACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS (INEN)" INEN 16-58.

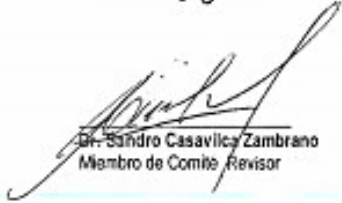
De acuerdo con las normas deberá presentar un informe sobre los avances del dicho proyecto, así como las conclusiones del mismo a esta Oficina.

Esperando la respuesta para la respectiva aprobación, quedamos de Usted.


Atentamente,

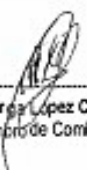

Dr. Vásquez Chávez Julie
Presidente de Comité Revisor


Dr. Odorico Benítez Zarri Padilla
Miembro de Comité Revisor


Dr. Sandro Casavilca Zambrano
Miembro de Comité Revisor




Dr. José Carlos Gutiérrez Lazarte
Miembro de Comité Revisor


Dra. María López Contreras
Miembro de Comité Revisor

Anexo 6. Relación entre subtipos *bla*_{CTX-M} y perfil de susceptibilidad en los aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE

Gen <i>bla</i> _{CTX-M1}	Amikacina				<i>p</i> value	Gen <i>bla</i> _{CTX-M2}	Amikacina				<i>p</i> value	Gen <i>bla</i> _{CTX-M9}	Amikacina				<i>p</i> value		
	I	R	S	Total			I	R	S	Total			I	R	S	Total			
N/A	-	0	7	7	0.82	N/A	-	0	7	7	0.92	N/A	-	0	7	7	0.83		
	-	0.1*	6.9*	7			-	0.1*	6.9*	7			-	0.1*	6.9*	7			
Neg	-	0	9	9			Neg	-	1	48		49		Neg	-	1		41	42
	-	0.2*	8.8*	9				-	0.9*	48.1*		49			-	0.7*		41.3*	42
Pos	-	1	40	41			Pos	-	0	1		1		Pos	-	0		8	8
	-	0.7*	40.3*	41				-	0.0*	1.0*		1			-	0.1*		7.9*	8
Gentamicina					Gentamicina					Gentamicina									
N/A	1	3	3	7	0.06	N/A	1	3	3	7	0.09	N/A	1	3	3	7	0.07		
	0.1*	2.9*	3.9*	7			0.1*	2.9*	3.9*	7			0.1*	2.9*	3.9*	7			
Neg	0	2	7	9			Neg	0	21	28		49		Neg	0	19		23	42
	0.2*	3.8*	5.1*	9				0.9*	20.6*	27.5*		49			0.7*	17.7*		23.6*	42
Pos	0	19	22	41			Pos	0	0	1		1		Pos	0	2		6	8
	0.7*	17.3*	23.0*	41				0.0*	0.4*	0.6*		1			0.1*	3.4*		4.5*	8
Imipenem					Imipenem					Imipenem									
N/A	0	0	7	7	0.14	N/A	0	0	7	7	0.001	N/A	0	0	7	7	0.74		
	0.1*	0.5*	6.4*	7			0.1*	0.5*	6.4*	7			0.1*	0.5*	6.4*	7			
Neg	1	0	8	9			Neg	0	4	45		49		Neg	1	4		37	42
	0.2*	0.6*	8.2*	9				0.9*	3.4*	44.7*		49			0.7*	2.9*		38.3*	42
Pos	0	4	37	41			Pos	1	0	0		1		Pos	0	0		8	8
	0.7*	2.9*	37.4*	41				0.0*	0.1*	0.9*		1			0.1*	0.6*		7.3*	8

Anexo 6. Relación entre subtipos *bla*_{CTX-M} y perfil de susceptibilidad en los aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE

Gen <i>bla</i> _{CTX-M1}	Meropenem				<i>p</i> value	Gen <i>bla</i> _{CTX-M2}	Meropenem				<i>p</i> value	Gen <i>bla</i> _{CTX-M9}	Meropenem				<i>p</i> value
	I	R	S	Total			I	R	S	Total			I	R	S	Total	
N/A	-	0	7	7	0.43	N/A	-	0	7	7	0.70	N/A	-	0	7	7	0.46
	-	0.5*	6.5*	7			-	0.5*	6.5*	7			-	0.5*	6.5*	7	
Neg	-	0	9	9	0.43	Neg	-	4	45	49	0.70	Neg	-	4	38	42	0.46
	-	0.6*	8.4*	9			-	3.4*	45.6*	49			-	2.9*	39.1*	42	
Pos	-	4	37	41	0.43	Pos	-	0	1	1	0.70	Pos	-	0	8	8	0.46
	-	2.9*	38.1*	41			-	0.1*	0.9*	1			-	0.6*	7.4*	8	
Ceftazidima					Ceftazidima					Ceftazidima							
N/A	1	5	1	7	0.001	N/A	1	5	1	7	0.53	N/A	1	5	1	7	0.001
	0.7*	4.2*	2.1*	7			0.7*	4.2*	2.1*	7			0.7*	4.2*	2.1*	7	
Neg	0	0	9	9	0.001	Neg	5	29	15	49	0.53	Neg	5	29	8	42	0.001
	0.9*	5.4*	2.7*	9			5.2*	29.2*	14.6*	49			4.4*	25.1*	12.5*	42	
Pos	5	29	7	41	0.001	Pos	0	0	1	1	0.53	Pos	0	0	8	8	0.001
	4.3*	24.5*	12.2*	41			0.1*	0.6*	0.3*	1			0.8*	4.8*	2.4*	8	
Ceftriaxona					Ceftriaxona					Ceftriaxona							
N/A	1	6	-	7	0.03	N/A	1	6	-	7	0.03	N/A	1	6	-	7	0.03
	0.1*	6.9*	-	7			0.1*	6.9*	-	7			0.1*	6.9*	-	7	
Neg	0	9	-	9	0.03	Neg	0	49	-	49	0.03	Neg	0	42	-	42	0.03
	0.2*	8.8*	-	9			0.9*	48.1*	-	49			0.7*	41.3*	-	42	
Pos	0	41	-	41	0.03	Pos	0	1	-	1	0.03	Pos	0	8	-	8	0.03
	0.7*	40.3*	-	41			0.0*	1.0*	-	1			0.1*	7.9*	-	8	

Anexo 6. Relación entre subtipos *bla*_{CTX-M} y perfil de susceptibilidad en los aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE

Gen <i>bla</i> _{CTX-M-1}	Ciprofloxacina			Total	P value	Gen <i>bla</i> _{CTX-M-2}	Ciprofloxacina			Total	P value	Gen <i>bla</i> _{CTX-M-9}	Ciprofloxacina			Total	P value
	I	R	S				I	R	S				I	R	S		
N/A	1	5	1	7		N/A	1	5	1	7		N/A	1	5	1	7	
	0.1*	6.4*	0.5*	7			0.1*	6.4*	0.5*	7			0.1*	6.4*	0.5*	7	
Neg	0	9	0	9	0.07	Neg	0	46	3	49	0.09	Neg	0	39	3	42	0.07
	0.2*	8.2*	0.6*	9			0.9*	44.7*	3.4*	49			0.7*	38.3*	2.9*	42	
Pos	0	38	3	41		Pos	0	1	0	1		Pos	0	8	0	8	
	0.7*	37.4*	2.9*	41			0.0*	0.9*	0.1*	1			0.1*	7.3*	0.6*	8	

Leyenda:

R= Resistente; S= Sensible; I= Intermedia.

Pos= Positivo; Neg=Negativo; N/A = No aplica.

Anexo 7
Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	INSTRUMENTOS	INDICADORES	
Enterobacterias productoras de BLEE	Bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, fermentadores de glucosa ; con resistencia a las cefalosporinas de 3 ^{ra} generación presentes en los cultivos de orina de los pacientes del INEN	Cualitativa nominal	Ficha de recolección de datos	Bacteria con Género y especie. Por ejemplo: <i>Escherichia coli</i> productora de BLEE <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE <i>Proteus mirabilis</i> productora de BLEE Y demás.	
Gen <i>bla</i> _{CTX-M}	Gen que confiere la capacidad de hidrólisis a la cefotaxima (cefalosporina de 3 ^o generación)	Cualitativa nominal	PCR	Presente	CTX-M1 CTX-M2 CTX-M9
				Ausente	

Anexo 8

Base de datos de enterobacterias productoras de BLEE en urocultivos de pacientes hospitalizados

ID	Sexo	Edad	Servicio	Diagnóstico	Enterobacteria	AMK	GEN	IMI	MER	CAZ	CRO	CIP	GEN CTX-M	Subtipo CTX-M
E1	m	53	uro	C679	eco	S	R	S	S	S	R	R	Pos	1
E2	m	62	uro	C679	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	9
E3	f	41	abd	C502/C168	eco	S	R	S	S	S	R	R	Neg	N/A
E4	f	64	myt	C530/C680	eco	S	I	S	S	R	R	R	Neg	N/A
E5	m	26	med	C920	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E6	m	79	uro	C679	eco	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E7	m	65	med	C199	kpn	S	R	S	S	I	R	I	Neg	N/A
E8	f	36	uro	C910	kpn	S	S	R	R	R	R	S	Pos	1
E9	f	49	uro	C679	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	1
E10	f	53	uro	N309	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	9
E11	m	68	uro	C649	kpn	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E12	m	56	med	C649	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	9
E13	m	70	uro	C619	eco	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E14	m	11	uro	D414	kpn	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E15	f	39	gin	C539	eco	S	R	S	S	I	R	R	Pos	1
E16	f	73	uro	C679	eco	S	R	S	S	S	R	R	Pos	9

Anexo 8

Base de datos de enterobacterias productoras de BLEE en urocultivos de pacientes hospitalizados

ID	Sexo	Edad	Servicio	Diagnóstico	Enterobacteria	AMK	GEN	IMI	MER	CAZ	CRO	CIP	GEN CTX-M	Subtipo CTX-M
E17	f	81	uro	C679	eco	R	R	S	S	S	R	R	Pos	1
E18	f	79	uro	C539	eco	S	R	S	S	S	R	R	Pos	1
E19	f	60	gin	N871/D069	eco	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E20	f	64	uro	C182	pmi	S	S	I	S	S	R	R	Pos	2
E21	f	59	med	C569	kpn	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E22	m	76	uro	C259/C619	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E23	f	69	uro	C679	kpn	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E24	f	24	med	D444	eco	S	S	S	S	I	R	R	Pos	1
E25	m	45	uro	C679	kpn	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E26	m	74	uro	C619	kpn	S	S	S	S	R	R	R	Neg	N/A
E27	f	55	gin	C539	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E28	f	32	med	D432	kpn	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E29	m	76	uro	C619	eco	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E30	m	59	uro	C619	eco	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E31	m	57	uro	C619	eco	S	R	S	S	R	R	R	Neg	N/A
E32	f	70	abd	C259	kpn	S	R	R	R	R	R	R	Pos	1

Anexo 8

Base de datos de enterobacterias productoras de BLEE en urocultivos de pacientes hospitalizados

ID	Sexo	Edad	Servicio	Diagnóstico	Enterobacteria	AMK	GEN	IMI	MER	CAZ	CRO	CIP	GEN CTX-M	Subtipo CTX-M
E33	f	31	gin	C539	eco	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E34	m	83	med	C859	kpn	S	S	S	S	R	I	R	Neg	N/A
E35	f	34	med	C924	kpn	S	R	R	R	R	R	R	Pos	1
E36	m	79	med	C169	kpn	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E37	f	14	med	C924	kpn	S	S	S	S	R	R	S	Neg	N/A
E38	m	63	uro	C679	kpn	S	S	S	S	R	R	R	Pos	1
E39	f	43	med	C910	eco	S	S	S	S	I	R	R	Pos	1
E40	f	68	gin	C541	eco	S	R	S	S	S	R	R	Pos	1
E41	f	67	rt	C539	kpn	S	S	R	R	R	R	R	Pos	1
E42	f	75	gin	D069	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	9
E43	f	65	abd	C189	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	1
E44	f	74	gin	C519	eco	S	S	S	S	I	R	R	Pos	1
E45	m	70	uro	C619	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	9
E46	f	82	tym	C209	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E47	f	40	nc	C710	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E48	f	65	tym	C239	kpn	S	S	S	S	R	R	S	Pos	1

Anexo 8

Base de datos de enterobacterias productoras de BLEE en urocultivos de pacientes hospitalizados

ID	Sexo	Edad	Servicio	Diagnóstico	Enterobacteria	AMK	GEN	IMI	MER	CAZ	CRO	CIP	GEN CTX-M	Subtipo CTX-M
E49	f	83	cyc	C739	pmi	S	R	S	S	S	R	R	Pos	9
E50	f	5	med	C710	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	9
E51	f	77	uro	C679	eco	S	S	S	S	S	R	R	Pos	1
E52	f	55	gin	C249	kpn	S	R	S	S	R	R	S	Pos	1
E53	m	74	uro	C619	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E54	f	61	gin	C574	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E55	f	9 m	ped	C229	eco	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E56	m	46	med	C679	kpn	S	R	S	S	R	R	R	Pos	1
E57	m	57	uro	C609	eco	S	S	S	S	I	R	R	Pos	1

Leyenda:

Sexo: f= femenino; m= masculino.

Servicio: med = Medicina Oncológica; tym = Torax y mamas; uro = Urología; ped = Pediatría Oncológica; gin = Ginecología; abd = Abdomen; cyc = Cabeza y cuello; myt = Mamas y tejidos blandos; rt = Radioterapia; nc = Neurocirugía.

Diagnóstico: Clasificación Cie (OMS) ICD Versión: 2016⁽⁵⁹⁾,⁽⁶⁰⁾.

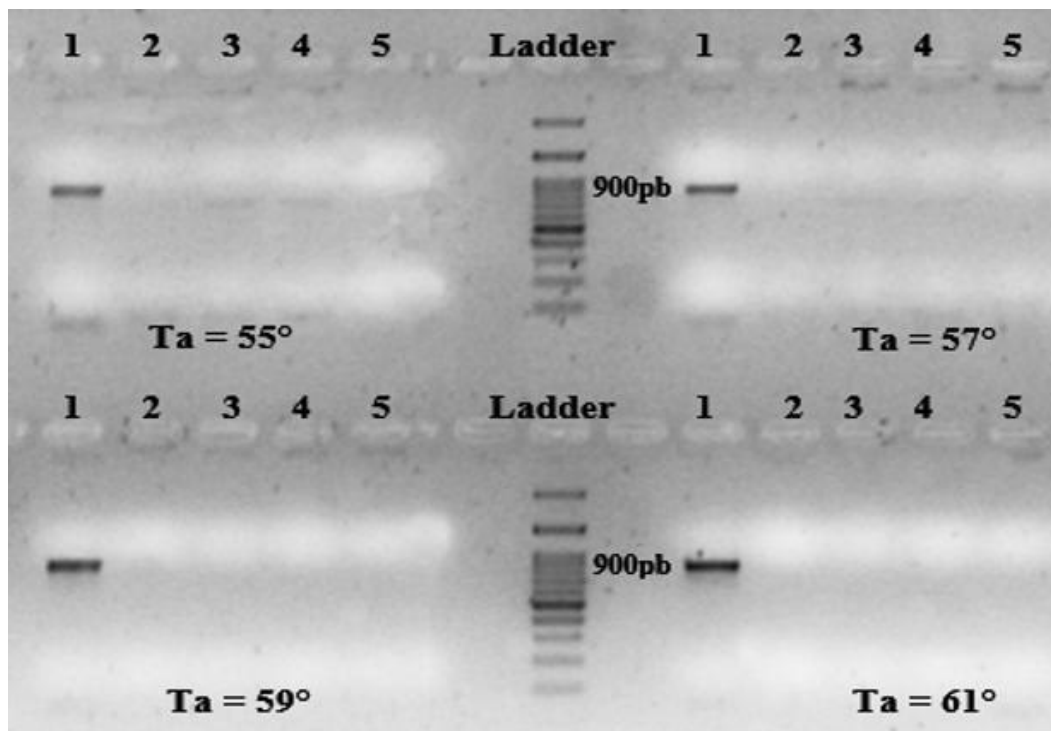
Enterobacteria: eco = *Escherichia coli*; kpn = *Klebsiella pneumoniae*; pmi= *Proteus mirabilis*.

Susceptibilidad: R= Resistente; S= Sensible; I= Intermedia.

Pos= Positivo; Neg=Negativo; N/A = No aplica.

Anexo 9

Estandarización de la temperatura de *annealing* del subtipo *bla*_{CTX-M-2}.



Electroforesis en gel agarosa 1,5% en buffer TAE 1x, con Red Safe. 1: Control subtipo *bla*_{CTX-M-2}, 2: Control subtipo *bla*_{CTX-M-1}, 3: Control subtipo *bla*_{CTX-M-9}, 4: Control negativo (*K. pneumoniae* ATCC700603) y 5: Control negativo (H₂O PCR).

Anexo 10

Abreviaturas

- **AMK:** Amikacina.
- **GEN:** Gentamicina.
- **IMI:** Imipenem.
- **MER:** Meropenem.
- **CAZ:** Ceftazidima.
- **CRO:** Ceftriaxona.
- **CIP:** Ciprofloxacina.
- **SHV:** *Sulphydryl reagent variable*, reactivo de sulfhidrilo variante.
- **TEM:** Temoriana, nombre del paciente.
- **PER:** *Pseudomonas extended resistant*, *Pseudomonas* extendidas resistentes.
- **SFO:** *Serratia fonticola*.
- **VEB:** Vietnam β -lactamasa de espectro extendido.
- **BEL:** Bélgica β -lactamasa de espectro extendido.
- **GES:** *Guiana extended spectrum*, Guiana de espectro extendido.
- **BES:** Brasil β -lactamasa de espectro extendido.
- **TLA:** Tlahuicas, nombre de tribu inca.
- **OXA:** Oxacilinasas.
- **CMI:** Concentración mínima inhibitoria.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- **ATCC:** *American type culture collection*, colección de cultivo tipo americana.
- **TAE:** Tris, acetato y ácido etilendiaminotetraacético.