



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica**

**Detección de enterobacterias productoras de  
betalactamasas de espectro extendido, mediante el  
método de disco difusión del NCCLS, en muestras  
clínicas del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión,  
julio-diciembre del 2003**

**TESIS**

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

**AUTOR**

Carol Linett BRINGAS SAUCEDO

**ASESOR**

Mercedes GONZALES VELAZCO

José María GUEVARA GRANADOS

Lima, Perú

2007



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

---

Bringas C. Detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido, mediante el método de disco difusión del NCCLS, en muestras clínicas del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, julio-diciembre del 2003 [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica; 2007.

---

## RESUMEN

Las Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) después de su aparición por primera vez en Alemania en 1983, han venido registrando un crecimiento y distribución exponencial en el plano mundial. Estas enterobacterias se caracterizan por ser resistentes a cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, además; tienen la capacidad de ampliar su comportamiento multirresistente que en muchos reportes se asocia al uso indiscriminado de antibióticos, resultando un verdadero problema para el diagnóstico oportuno y su tratamiento específico; los brotes nosocomiales ocasionados por estas bacterias se han caracterizado por su identificación tardía e incompleta.

El presente estudio fue diseñado para detectar de manera temprana a estas Enterobacterias productoras de BLEE, implicadas en distintos tipos de infecciones en pacientes del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (HNDAC), utilizando el método de Doble Disco estandarizado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), siendo de uso práctico y de bajo costo. Este estudio abarcó el periodo julio – diciembre del 2003; en el cual se detectó que un 17.8% (98/552) del total de Enterobacterias producían BLEE, siendo *Escherichia coli* la de mayor prevalencia con 63.3%, seguido por *Klebsiella pneumoniae* con

18.4%, las cuales fueron aisladas mayormente de muestras intrahospitalarias y de pacientes del sexo femenino.

Es preciso mencionar la necesidad de implementar un plan de monitoreo en la prevención y control de posibles brotes epidemiológicos que puedan desencadenar este tipo de Enterobacterias.

**Palabras claves: Enterobacterias, Betalactamasas de Espectro Extendido, Resistencia, Infecciones Nosocomiales.**

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la resistencia bacteriana a los antibióticos constituye un serio y cambiante problema internacional que limita el tratamiento adecuado y eficaz de las diversas Infecciones Nosocomiales, afectando de este modo la salud de las personas en el ámbito mundial. Dicha resistencia está asociada al uso indiscriminado de antibióticos empleados para el tratamiento de infecciones bacterianas, siendo la de mayor aceptación los betalactámicos (por su baja toxicidad y su amplio espectro), resultando como causa más común de resistencia a estos antibióticos la producción de un grupo de enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico denominados Betalactamasas.

Estas Betalactamasas permanecieron estables por muchos años, pero en 1983 aparecieron cepas bacterianas productoras de variantes enzimáticas con capacidad para hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación, las cuales fueron llamadas Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).

Las BLEE son enzimas de configuración plasmídica; estas enzimas derivan por mutación de las Betalactamasas de Amplio Espectro presentes en la mayor parte de Enterobacterias Bacilos Gram Negativos (BGN).

Las cepas de Enterobacterias BGN productoras de BLEE, son responsables de Infecciones Nosocomiales algunas veces graves, cursando muchas veces con bacteriemia; la multirresistencia que presentan estas cepas han ocasionado gran preocupación debido a las implicancias clínicas que generan un grave problema terapéutico, de tal manera que las infecciones ocasionadas por estas bacterias incrementan la morbilidad y mortalidad de los pacientes hospitalizados, así como la estancia hospitalaria y los costos globales, obligando al manejo de terapéuticas más tóxicas y costosas. Además estas cepas resistentes pueden no ser detectadas mediante los procedimientos microbiológicos de rutina y generar por lo tanto fallas terapéuticas frecuentes, y en ocasiones fatales.

En el ámbito local se hace evidente la presencia de este tipo de Enterobacterias productoras de BLEE, resultando una amenaza potencial para la salud pública, generando la necesidad de detectarlas tempranamente para un mejor diagnóstico y control preventivo en los nosocomios y la población.

***DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA LACTAMASAS  
DE ESPECTRO EXTENDIDO EN MUESTRAS CLÍNICAS DEL HOSPITAL  
NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN, USANDO UN MÉTODO  
ESTANDARIZADO POR LA NCCLS, JULIO - DICIEMBRE, 2003.***

**I.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1.- Definición**

En los últimos años los reportes de estudios en nosocomios de diferentes países han hecho evidente la existencia del incremento del número de casos de afecciones que involucran a las Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), las cuales son responsables de Infecciones Nosocomiales de alto riesgo, cursando muchas veces con infecciones a nivel del tracto urinario y bacteriemias.

La diseminación de este tipo de Enterobacterias puede causar brotes de infección, incrementando la morbimortalidad nosocomial, debido a que estas se caracterizan por presentar multirresistencia antibiótica que incluye a la mayoría de penicilinas, cefalosporinas y monobactams.

Se sospecha que algunos de los factores que contribuyen con la resistencia de estas Enterobacterias están relacionados con: el uso indiscriminado de antibióticos como las cefalosporinas de 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación, las limitaciones de conocimientos farmacológicos en el tratamiento médico y la automedicación entre otras. Además las dificultades técnicas para la detección de estas Enterobacterias por el laboratorio, traen consigo la instalación de terapias que pueden resultar ineficaces.

La escasa información de estudios que registren datos epidemiológicos de este tipo de Enterobacterias y su relación con factores de interés clínico, limita el conocimiento de

impacto en salud pública, generando así la necesidad de realizar estudios que disipen estas inquietudes.

Por consiguiente se espera que la detección de este tipo de Enterobacterias en la población que acudió al HNDAC entre julio-diciembre del 2003, contribuya a establecer registros de prevalencia e incidencia que permitan instalar programas preventivos en la diseminación de nuevos casos.

## **1.2.- Antecedentes**

El uso de los antibióticos betalactámicos data desde hace más de 50 años, el cual tuvo su inicio con el descubrimiento de la penicilina, considerada como el primer antibiótico betalactámico de uso clínico. Durante los primeros años de aplicación, los clínicos evidenciaron curas milagrosas pero poco después se detectaron cepas resistentes productoras de penicilinas (primeras Betalactamasas), dando origen en corto tiempo a la pandemia de Infecciones Nosocomiales por cepas penicilinoresistente.

La introducción de la penicilina y las primeras cefalosporinas en 1960, medicamentos activos contra bacterias gramnegativas provocó la producción de nuevas Betalactamasas. En 1963 en una *Escherichia coli* (*E. coli*) aislada de la orina de una niña griega en Atenas, fue identificado un nuevo tipo de Betalactamasa denominado TEM 1, por las primeras 3 letras del

nombre de la niña (Temoniera). Esta nueva Betalactamasa fue diseminándose mundialmente a través de plásmidos denominados Transposones que afectaron a muchas especies bacterianas.

A partir de 1978, con la introducción de nuevas cefalosporinas como Cefoxitina, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, entre otros, aparecieron nuevas betalactamasas producidas por bacterias nosocomiales. El primer problema se inicio con la sobreproducción de Betalactamasa cromosómica específica para una especie, clase A, por *Klebsiella oxytoca*. En 1979 se iniciaron los problemas clínicos causados por Betalactamasas cromosómicos de clase C producida por una *Enterobacter cloacae*, la producción de esta era inducida por antibióticos como Cefotaxima.

Mutaciones en los genes de las Betalactamasas tradicionales, TEM-1, TEM-2 y SHV-1, dieron lugar a las llamadas Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).

La primera bacteria productora de BLEE fue aislada en 1983 en un Hospital Universitario de Frankfurt, Alemania, es cuando ocurren mutaciones en la estructura genética de los genes responsable de la producción de Betalactamasas mediadas por plásmidos TEM, SHV y OXA; pero el problema comienza con una *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) productora de una Betalactamasa mutante denominada SHV-2 con resistencia a cefotaxima.

La problemática de las Betalactamasas mutantes de tipo TEM se inicio entre 1985 y 1986 en Francia. Para 1988 aparecen *K. pneumoniae* capaces de producir Betalactamasas de clase C

que provocan resistencia a Cefotaxima, Ceftibuten y combinaciones con inhibidores de Betalactamasas, así como a oxymino-betalactámicos.

En ese mismo año se descubren los plásmidos que determinan la producción de metalo-betalactamasas que hidrolizan los carbapenémicos. Finalmente en 1991 aparecen los mutantes de tipo TEM con afinidad disminuida al Clavulanato y sulbactam en E. coli.

### **1.3.- Enunciado del Problema**

¿Se podrá detectar en forma temprana las Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido mediante el método de Disco Difusión estandarizado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS-OMS) en muestras clínicas del Hospital Daniel A. Carrión, con la finalidad de prevenir y controlarlos?

### **1.4.- Formulación de los objetivos del estudio.-**

#### **1.4.1.- Objetivo General.-**

Detectar en forma temprana las Enterobacterias productoras de BLEE, mediante el método de Disco Difusión estandarizado por la Nacional Committee for Clinical Laboratory

Standards (NCCLS-OMS) para la prevención y control de nuevos casos en pacientes del Hospital Nacional Daniel A. Carrión (HNDAC).

**1.4.2 .- Objetivos Específicos.-**

1. Establecer el tipo de Enterobacterias productora de BLEE que con mayor frecuencia se aíslan de muestras clínicas del HNDAC.
2. Determinar la incidencia de Enterobacterias productoras BLEE en pacientes intra y extra hospitalarios.
3. Determinar el tipo de muestras clínicas que con mayor frecuencia presentan aislamientos de estas Enterobacterias.
4. Establecer el grupo etáreo con mayor susceptibilidad de ser afectadas por este tipo de Enterobacterias.

## **II.- MARCO TEORICO**

**2.1.- Familia Enterobacteriaceae.-**

La familia Enterobacteriaceae denominada así por Rahn en 1937(1), está formada por un conjunto de bacilos gramnegativos, heterogéneos en cuanto a su hábitat y capacidad patógena, pero incluidos en ella por la semejanza en sus caracteres estructurales y fisiológicos y su homología genética. En la actualidad conforman un grupo de más de 157 especies incluidas en más de 30 géneros y 11 grupos con las características de la familia, pero que requieren un estudio más profundo antes de catalogarlos definitivamente (grupos entéricos no nominados). Sólo unas 40 de las 157 especies descritas son patógenas para el hombre o se ha aislado de muestras clínicas como oportunistas comensales, las otras 117 especies no se han aislado de muestras humanas (2,3).

En general su tamaño oscila entre 2-3  $\mu$ m por 0,4-0,6  $\mu$ m, no forman esporas, pueden ser móviles (con flagelos peritricos) o inmóviles. Estos organismos crecen bien en medios artificiales simples, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Son catalasa positiva, oxidasa negativa, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa por la vía ácido-mixta/del butanodiol. Degradan también a un amplio conjunto de otros carbohidratos y las diferencias metabólicas han servido clásicamente para establecer los criterios para la identificación de las especies (identificación bioquímica). Además de los flagelos, muchas especies producen fimbrias (pili), cápsulas o ambos, que en ocasiones son importantes determinantes de virulencia. Las fimbrias o pili están presentes en casi todas las especies y son responsables de la fijación de las células bacterianas a otras bacterias, a las células huéspedes o actúan como

receptores de bacteriófagos. Pueden poseer una cápsula bien definida o una cubierta laxa y mal definida, de estructura polisacárida, o sin cubierta (2,4).

La pared celular de las enterobacterias esta compuesta por mureína, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS) y tiene una disposición laminar. La capa de lipoproteína-mureína constituye alrededor del 20% de la pared de la célula y es responsable de la rigidez celular. El 80% restante de la pared celular se une con los lípidos de la lipoproteína para formar la capa laminar. El LPS contiene las cadenas polisacáridas específicas que determinan la antigenicidad de las diversas especies (el tipo O) y su componente lipídico es la estructura responsable de la actividad endotóxica. En el caso de ciertas especies de enterobacteriaceae la estructura antigénica desempeña un papel importante en la clasificación epidemiología. Los antígenos O (antígeno somático, LPS), H (antígeno flagelar proteico) y K (antígeno capsular polisacárido) son los principales componentes que se usan en la tipificación serológica (2).

La mayoría de las especies son capaces de ocupar indistintamente hábitats muy variados en el medio ambiente, las plantas y el tubo digestivo de los animales; otras ocupan hábitats más restringidos, como los sistemas acuáticos, vegetales o el tubo digestivo de ciertos animales. Algunas se hallan adaptadas estrictamente al hombre. La familia incluye especies comensales y patógenas para las plantas y los animales. Con respecto al hombre, existen especies que son primariamente patógenas y otras comensales estables o transitorias del tubo digestivo que pueden producir infecciones oportunistas.

Los organismos entéricos han sido siempre los agentes más comunes de las infecciones del tracto urinario, pero ahora son también los agentes etiológicos predominantes en diversas infecciones sistémicas de origen endógeno e infecciones nosocomiales que se observan en la actualidad. Mientras que las infecciones entéricas graves han disminuido en los países desarrollados, organismos entéricos ordinariamente inofensivos se encuentran cada vez más relacionados con diversas formas de enfermedad extraintestinal, como resultado de su selección por el uso de antibióticos, por la existencia de enfermos con disminución de su respuesta inmune por su enfermedad o como consecuencia de la administración de agentes inmunosupresores y citóxicos.

Las infecciones oportunistas pueden darse siempre que existan factores predisponentes locales: todos aquellos que rompen las barreras físicas constituidas por la piel y las mucosas como las heridas, quemaduras, catéteres o las fisiológicas del árbol respiratorio (intubación) de la vía urinaria (sondas) o de la vía genital (dispositivos intrauterinos); así como factores generales: disminución de las defensas globales inespecíficas, principalmente fagocitosis y de la respuesta inmune del huésped, que puede estar disminuida por una enfermedad de base (5).

Así en las Infecciones Intrahospitalarias, hasta dos tercios son secundarias a la colocación de sondas vesicales, instrumentación de la vejiga o cirugía de las vías urinarias bajas (6). Todos los bacilos entéricos oportunistas son capaces de causar enfermedades similares, pero la epidemiología, la frecuencia, la gravedad y el tratamiento de estas enfermedades difieren para las distintas especies.

Alguno de los microorganismos de esta familia que causan infecciones oportunistas con más frecuencia son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, y *Morganella morgani* entre otras. Otras especies de enterobacterias poseen capacidad patógena primaria (factores moleculares de patogenicidad), pudiendo causar infecciones en personas previamente sanas sin factores predisponentes, como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Escherichia coli* (variedades patógenas) (7).

*E. coli* es el principal habitante anaerobio facultativo del intestino grueso y es único entre los microorganismos que integran la flora normal, por cuanto también, es el microorganismo aislado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones de las vías urinarias, de heridas, de neumonía, de meningitis y de septicemia tanto en las infecciones comunitarias como en las adquiridas en el hospital. Hay cepas enteropatógenas de *E. coli* que causan más del 50% de las infecciones urinarias tanto en hombres como en mujeres. Las mujeres son más propensas a sufrir infecciones del tracto urinario a una edad más temprana debido a diferencias en la estructura anatómica, la maduración sexual, las alteraciones que se producen durante el embarazo y el parto.

Después de los 50 años de edad, el varón con hipertrofia prostática es más propenso a sufrir de infección de las vías urinarias. El cateterismo u otras manipulaciones mecánicas del tracto urinario, la obstrucción, la diabetes y la incapacidad para el vaciamiento completo de la vejiga

durante la micción son otros factores que predisponen a las infecciones urinarias por *E. coli* y otros microorganismos (9).

La especie del género *Klebsiella* que se aísla con mayor frecuencia es *K. pneumoniae*. Se encuentra en las heces de los individuos sanos (del 5 al 10%) y es con frecuencia un invasor secundario del aparato respiratorio de enfermos con enfermedad pulmonar crónica. Como otras enterobacterias oportunistas, *K. pneumoniae* puede ocasionar infecciones en aproximadamente el 3% de todas las neumonías bacterianas agudas y es el segundo patógeno más común del tracto urinario. También pueden causar infecciones de heridas. Es la segunda especie después de *E. coli* causante de bacteriemia por gramnegativos. Forman una cápsula y por esta razón producen colonias grandes y húmedas, frecuentemente muy mucosas. *K. oxytoca* se parece a *K. pneumoniae* y desde el punto de vista clínico pueden considerarse semejantes (8).

Edwing dividió a las Enterobacteriaceae en tribus integradas por géneros estrechamente relacionados. Aunque en la actualidad la mayoría de los taxónomos no acepta esta división, el concepto resulta útil para la descripción de los géneros: *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* englobados en la tribu Proteeae. La mayor parte de las cepas de esta tribu provienen de orina, pero también a menudo producen infecciones en otras partes del cuerpo como en heridas, neumonías y septicemia, y es causa principal de infecciones nosocomiales, a menudo graves. *Proteus* se encuentra habitualmente en el suelo, las aguas residuales y el estiércol, también con alguna frecuencia en las heces humanas normales, pero frecuentemente, en mayor número, en

individuos bajo tratamiento antibiótico o durante enfermedades diarreicas ocasionadas por otros microorganismos. *Proteus mirabilis* es responsable de la mayor parte de las infecciones humanas causadas por este grupo de microorganismos (1).

Los miembros del género *Salmonella* son patógenos ubicuos del hombre y del ganado, de los mamíferos silvestres, reptiles, pájaros e incluso de los insectos. El género *Salmonella* está constituido por un grupo de microorganismos de diversidad bioquímica y serológica amplia. Además de los seres humanos, estos microorganismos infectan a muchos animales y pueden invadir el tejido extraintestinal y producir fiebres entéricas. Las infecciones por *Salmonella* pueden presentarse como cualquiera de tres entidades clínicas características: una gastroenteritis autolimitada, una septicemia con lesiones focales o una fiebre entérica como la fiebre tifoidea. La gastroenteritis por *Salmonella* representa una infección de colon y en general se produce entre las 18 a 24 horas después de la ingestión del microorganismo. La enfermedad se caracteriza por diarrea, fiebre y dolor abdominal. Habitualmente es auto limitada y dura entre dos y cinco días (8).

## **2.2.- Antibióticos betalactámicos.-**

Para comprender los mecanismos de resistencia de las bacterias a un antibiótico, se debe conocer la naturaleza de los antibióticos y su mecanismo de acción. Un antibiótico es un compuesto natural que mata a una bacteria o inhibe su crecimiento. Actualmente se incluyen

los antibióticos y los quimioterápicos (moléculas obtenidas por síntesis química) dentro del concepto de antimicrobianos. Es posible que en la naturaleza surgiesen los antibióticos como un medio de que un organismo eliminase de su alrededor a otros que competían con él por los nutrientes.

Los betalactámicos son uno de los grupos de antibióticos más usados en la práctica médica, poseen una gran eficacia terapéutica, presentan actividad antibacteriana y no son tóxicos para el hombre ya que actúan bloqueando las enzimas biosintéticas de una estructura como el peptidoglicano que solo se encuentran en las células bacterianas (procariotas) y no tiene homólogo en las células animales (eucariotas); ambas características hacen de estos antibióticos uno de los mejores grupos terapéuticos bacterianos (11).

### **2.2.1.- Clasificación .-**

La estructura básica de estos compuestos es el anillo betalactámico, esencial para su actividad antibacteriana. Entre ellos se cuentan: 1) las penicilinas (penicilina, amoxicilina, ticarcilina y piperacilina); 2) las cefalosporinas (1ra generación: cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina, 2da generación: cefaclor, cefamandol, cefuroxima, 3ra generación: cefpodoxima, cefoperazona, ceftibuteno, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima; y 4ta generación: cefepima); 3) las cefamicinas como cefoxitina; 4) los monobactams (aztreonam); 5) los carbapenems (imipenem y meropenem); y 6) un grupo con escasa

actividad antibacteriana pero capaz de inhibir las betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) (12,13).

La característica común a todos los miembros de esta familia la determina la presencia de una betalactamasa de cuatro miembros, casi todos los preparados son bicíclicos es decir, el núcleo betalactámico está unido a un segundo anillo que varía en los diferentes grupos; las penicilinas presentan una thiazolidina, mientras las cefalosporinas tienen una thiazina. Existen algunos preparados que carecen de este segundo anillo, los monobactams, que son Compuestos monocíclicos y el N-amídico del anillo betalactámico está unido a un radical ácido.

### **2.2.2.- Mecanismo de acción de los Betalactámicos:**

Los betalactámicos son agentes bactericidas de efecto lento, la eficacia esta más relacionada con el tiempo de actuación que con la concentración de antibiótico en el medio. Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la actividad transpeptidasa, carboxipeptidasa o transglucosilasa de las proteínas fijadoras de penicilina (Penicillin binding proteins, PBP) con la consiguiente inhibición o disminución de la síntesis de la capa de peptidoglicano (12,13).

Los antibióticos que contienen un anillo betalactámico se comportan químicamente como agentes acilantes, que reaccionan para producir derivados peniciloicos. Se ha propuesto que la penicilina actuaría como análogo del sustrato de las PBP, acilando el sitio activo de

la enzima con formación de un complejo inactivo bastante estable. La similitud estereoquímica de estos antibióticos (el grupo amida en el anillo betalactámico) con la secuencia terminal del pentapéptido de la mureína (el dipéptido D-alanil-D-alanina) les permite interactuar con las PBP situadas en la superficie de la membrana plasmática bacteriana, moléculas encargadas de modelar la configuración definitiva de la capa de peptidoglicano (en esta etapa, entre las cadenas lineales adyacentes de peptidoglicano se producen ligaduras cruzadas, existiendo solo una única unión cruzada entre una cadena peptídica lateral y otra, mediante un puente peptídico). Además de guiar su reorganización durante la división de las bacterias. El último estadio de la síntesis de la pared celular ha sido identificada como la fase durante la cual los compuestos betalactámicos interfieren en forma competitiva, en la actividad de las PBP.

La inhibición de las reacciones de biosíntesis por antibióticos betalactámicos esta acompañada por cambios morfológicos característicos. Las diferencias morfológicas observadas, se deben a la PBP que resulta afectada. Cuando las bacterias se desarrollan en presencia de penicilina se acumulan intermediarios de la síntesis de la pared celular, nucleótidos de uridina sin uniones cruzadas, y las nuevas paredes no se pueden formar y la bacteria muere por efecto osmótico o digerida por enzimas autolíticas, que se activan como consecuencia del bloqueo de la función de una o varias PBP (14).

### **2.2.3.- Evolución Histórica.-**

### 2.2.3.1 Las Penicilinas.-

El primer miembro de los betalactámicos, la penicilina, se obtuvo en 1928 de una cepa del género *Penicillium notatum*. La utilidad de esta penicilina natural, bencilpenicilina (penicilina G), está en función de su espectro antibacteriano relativamente reducido: cocos grampositivos, espiroquetas y unos cuantos organismos gramnegativos (sobre todo, *Neisseria*). Con el tiempo, se llevaron a cabo modificaciones semisintéticas. Un grupo de estos productos, en el que se encuentra la oxacilina, es resistente a la Betalactamasa estafilocócica. Hay otro grupo de penicilinas semisintéticas que presenta un espectro ampliado frente a gramnegativos, los aminopenicilinas: ampicilina y amoxicilina.

En la ampicilina el grupo amino de la cadena lateral mejora la penetración a través de la membrana externa, cargada negativamente; pero este antibiótico presenta solo la mitad de la actividad que la bencilpenicilina frente a los organismos grampositivos, siendo también sensible a las betalactamasas. La amoxicilina se absorbe mejor que la ampicilina. El desarrollo de derivados carboxi y ureidos de la ampicilina ha conducido a la introducción de agentes con mayor actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*. Las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) además son más activas contra cepas de *Enterobacter*, *Serratia* y ciertas cepas de *Proteus*. Las ureidopenicilinas, la piperacilina, son más inhibitorias para *P. Aeruginosa*. Desgraciadamente, todas las penicilinas

siguen siendo sensibles a las Betalactamasas. Existen otros compuestos con el anillo betalactámico de las penicilinas, pero en las que el anillo tiazolidínico se ha suprimido o se ha sustituido por otro. El grupo más importante de estos compuestos son las cefalosporinas (12,16).

### **2.2.3.2.- Las Cefalosporinas.-**

En 1945 se aisló el primer antimicrobiano cefalosporínico de cultivos del hongo *Cephalosporium acremonium* al que se denominó cefalosporina C. La primera cefalosporina útil fue la cefalotina, que posee un espectro antimicrobiano algo más amplio que el de la penicilina. Este compuesto y su pariente próximo, la cefazolina (denominadas genéricamente cefalosporinas de 1ra generación), se utilizan ampliamente en clínica. Los derivados que se obtuvieron a continuación, las cefalosporinas de segunda generación (cefuroxima), presentaron un amplio espectro frente a los organismos gramnegativos productores de Betalactamasas, pero menor actividad que los agentes de 1ra generación contra los grampositivos, siendo muy utilizados en los tratamientos empíricos y en el caso de las cefamicinas (cefexitina) en infecciones mixtas dado su actividad frente a anaerobios.

El avance de la industria farmacéutica hace que se desarrolle nuevos betalactámicos, así se introducen las cefalosporinas de 3ra generación (C3G) en 1978 en Europa, y en 1981 en los Estados Unidos. Las denominadas C3G aparecieron a lo largo de los años

80, y la primera cefalosporina comercializada fue la cefotaxima y un poco más tarde la ceftriaxona, derivados con eficacia mejorada frente a organismos gramnegativos. En los últimos años se han desarrollado las denominadas cefalosporinas de cuarta generación, como el cefepime (12,14,17).

### **2.2.3.3.- Los carbapenems.-**

Los carbapenems se obtienen de la tienamicina, una sustancia antibiótica extraída de los cultivos de *Streptomyces catleya*, en 1976. A partir de este núcleo se obtuvo por síntesis la formidoil-tienamicina con actividad antibacteriana mucho mayor que los demás antibióticos betalactámicos.

El primer derivado que se utilizó, el imipenem, tiene un espectro antibacteriano excepcionalmente amplio; se une con extraordinaria afinidad a la PBP2, por ello su acción antimicrobiana conduce a la producción de células bacterianas esféricas que se alisan con rapidez y facilidad. La acción sobre los grampositivos abarca prácticamente a todos los patógenos, tanto los cocos como bacilos. Casi todos los bacilos gramnegativos son sensibles incluyendo la mayoría de las cepas resistentes a los demás betalactámicos. También son activos frente a las bacterias anaerobias (16,18).

### **2.2.3.4.- Los monobactams.-**

Estos son producidos por bacterias telúricas, El primer monobactámico se obtuvo de una cepa de *Chromobacterium violaceum*, en 1978. De allí se derivó sintéticamente, el aztreonam. Este antimicrobiano es muy estable a la hidrólisis de las Betalactamasas bacterianas y además presenta una cierta especificidad por las PBP-3, proteína que interviene en la división bacteriana y cuando es bloqueada por acción de los antibióticos se generan bacterias filamentosas sin septos. Su espectro se limita a bacterias gramnegativas aerobias y anaerobias facultativas, incluyendo enterobacterias, *P.aeruginosa*, *Haemophilus* y *Neisseria* (12,16).

#### **2.2.3.5.- Inhibidores de las Betalactamasas.-**

Al margen de los esfuerzos dirigidos a reducir la sensibilidad de los betalactámicos frente a las diversas betalactamasas, también se ha abordado el problema de otra forma, consistente en inactivar irreversiblemente la enzima mediante sustratos que, aunque carecen de actividad bactericida, presentan una alta afinidad por la misma, como el ácido clavulánico (oxa-betalactámico) o el sulbactam (una sulfona del ácido penicilánico). Cuando se administran asociados a otro betalactámico con actividad bactericida (habitualmente la amoxicilina), estos compuestos aumentan la eficacia antimicrobiana frente a organismos productores de betalactamasas.

El uso extensivo de los inhibidores de betalactamasas como el clavulonato, el sulbactam y el tazobactam y de cefalosporinas estables a betalactamasas, particularmente en las unidades de cuidados intensivos, puede actuar como un factor de presión selectiva que facilite la emergencia de Enterobacterias oportunistas y producir serias infecciones (17,18).

### **2.3.- Resistencia Bacteriana.-**

Las bacterias se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza. Así, todas las superficies cutáneo mucosa del hombre (piel, vías respiratorias, digestivas y genital) se hallan revestidas por numerosos y diversos microorganismos, fundamentalmente bacterias. La concentración y diversidad de estos dependen del territorio evaluado. En los pacientes sometidos a tratamiento antibiótico, se pueden producir cambios en el tipo de bacterias de la flora normal y de las proporciones entre estas, así como un incremento de las especies autóctonas resistentes a los antibióticos.

Desde el descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina, por Alexander Fleming en 1928 hasta la fecha se ha sucedido enormes y profundos cambios en este campo. En primer lugar el uso de los antibióticos supuso una revolución médica sin precedentes, en el tratamiento de las enfermedades infecciosas pero a su vez rápidamente aparecieron bacterias que adquirieron resistencia con los consiguientes fracasos terapéuticos (24).

**2.3.1.- Mecanismos de resistencia.-**

**a) Alteración de la Diana del Antimicrobiano.-**

Sea por reducción o eliminación de la afinidad del antibiótico por la molécula sobre la cual ejerce su efecto, es el mecanismo de resistencia bacteriana en la cual se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular que constituyen el blanco de la acción del antibiótico, pudiendo ser estos componentes de la pared celular, proteínas fijadora de penicilina, sub. unidades ribosomales, entre otros; por citar un ejemplo, la resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos ocurre por una alteración de las proteínas fijadoras de penicilina(PBP), de tal forma que aquellos antibióticos ya no tienen acceso a la cadena de peptidoglicano en elongación.

**b) Disminuyendo la cantidad de antibiótico que accede a su diana.-**

Por alteración de la permeabilidad, lo que modifica la entrada del antibiótico o por aumento de la eliminación del antibiótico mediante un sistema de bombeo.

**c) Mecanismo enzimático.-**

Destruyendo o inactivando al antibiótico. Este mecanismo se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico, siendo las más importantes las

Betalactamasas, Betalactamasas de Amplio Espectro, Eritromicina esterasa y enzimas modificadoras de Aminoglucosidos, Cloranfenicol, Lincosamidas y estreptograminas.

#### **d.- Desarrollando vías metabólicas alternativas resistentes al antibiótico.-**

De estos mecanismos tres de ellos son los causantes de la resistencia a los betalactámicos: Alteración o reemplazamiento de las dianas, que en este caso son las PBP; mecanismo de eflujo o expulsión del antibiótico; disminución de la permeabilidad por reducción de las porinas, y producción de betalactamasas (19). Uno de los más extendidos entre las especies de Enterobacterias es la Inactivación Enzimática (20).

### **2.4.- Introducción a la Genética de la Resistencia Bacteriana.-**

Todas las propiedades de la célula microbiana incluyendo la resistencia a los antimicrobianos, están determinados por el genoma microbiano, el cual se encuentra en la célula en tres tipos de elementos genéticos: el cromosoma, los plásmidos, y los bacteriófagos lisógenos.

La resistencia bacteriana puede ser Natural (intrínseca) o adquirida.

#### **2.4.1.- Resistencia natural.-**

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de la dosis del antibiótico.

### **2.4.2.- Resistencia Adquirida.-**

La resistencia adquirida esta estrechamente ligada a los cambios que se puedan producir a nivel del DNA, ya sea la causa, una mutación o por la modificación con cambios puntuales en el mismo, pudiendo ser los diferentes mecanismos transgénicos: una transducción, transformación o conjugación.

#### **a).- Transducción.-**

Es aquel mecanismo el cual esta definido como el intercambio de información genética por medio de un bacteriófago; estos son virus que infectan bacterias, algunos de ellos son líticos, esto se refiere a que luego de infectar a la célula bacteriana, los genes regulatorios del bacteriófago toman el control de la maquinaria de biosíntesis celular lo cual lleva a la expresión de los genes estructurales del fago y a la producción de nuevas partículas fágicas que son liberadas debido a la lisis y muerte del huésped bacteriano(2).

Los bacteriófagos Lisogénicos tienen la propiedad de incorporar material genético al DNA del huésped como “profago” y se replica junto con el cromosoma bacteriano. La escisión del DNA del bacteriófago del genoma de la célula bacteriana trae aparejado el hecho de que algunos bacteriófagos no solo contengan los genes específicos del fago sino también de la célula huésped que se encontraban localizadas en las adyacencias del sitio de integración del fago bacteriano.

**b).- Transformación.-**

La Transformación involucra la incorporación del DNA libre del medio que rodea a la bacteria. Las células que son capaces de incorporar a sus genomas DNA libre se denominan Competentes. La Competencia generalmente es un estado transitorio que sucede hacia el final de la fase exponencial del crecimiento. En las bacterias grampositivas competentes, trozos pequeños de DNA de cadena doble se unen a la célula por un receptor celular de superficie que es expresado durante el período competente.

A medida que el DNA entra a la célula, una cadena es hidrolizada por una nucleasa unida a la superficie. Los acontecimientos de recombinación entre el DNA de cadena simple y la región homóloga del cromosoma bacteriano dan como resultado la integración del DNA, transformando el genoma bacteriano. Si no existen regiones homólogas, la cadena de DNA no se integra, por lo tanto los genes de esa cadena no se expresan y el DNA de cadena simple es degradado por las endonucleasas de restricción endógena.

Las bacterias gramnegativas competentes también poseen receptores para el DNA en la superficie celular, pero el proceso de unión del DNA ocurre simultáneamente con el reconocimiento de una secuencia de nucleótidos de 10 a 14 pares de bases que permite que sólo el DNA de especies muy relacionadas pueda unirse y entrar en las células competentes. El DNA de cadena doble ingresa entonces en la célula, pero solo una cadena participa en los eventos de recombinación que determinan la incorporación del DNA transformador en el genoma del receptor.

**c).- Conjugación.-**

Es el único mecanismo de intercambio genético que requiere contacto célula-célula. Las bacterias gramnegativas capaces de participar en la conjugación poseen un plásmido llamado F que codifica para los pelos sexuales. Estos pelos especializados funcionan como vehículos para establecer contacto con otra célula bacteriana como si fueran “tubos” a través de los cuales el DNA pasa durante el proceso de conjugación.

Las células que poseen el plásmido F se denominan F+, las que no lo tienen son las llamadas F-, una vez que se ha establecido el contacto entre un F+ y una F- a través de un pelo sexual, el plásmido circular F comienza a ser replicado. Durante este proceso una de las cadenas simples del plásmido DNA pasa a través del pelo a la célula receptora, la cadena simple que es pasada comienza a ser replicada a medida que entra en la célula receptora y el resultado final son dos células que contienen plásmidos conjugativos completos (es decir ambos se vuelven células F+). En ciertos microorganismos el plásmido F se integra en el genoma de la célula huésped en un sitio de integración específico donde se encuentra presente una secuencia homóloga de nucleótidos.

El establecimiento de una conexión a través del pelo F y la conjugación siguiente resulta en una transferencia de algunos genes del plásmido F juntamente con material de la célula huésped y que se encuentra adyacente al sitio de integración del plásmido F.

El mecanismo más común por el cual se transfiere los genes de resistencia es la conjugación, para lo cual es necesario un factor de transferencia adicional que es el Transposón (elemento genético transponible). Los Transposones son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser trasladados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio, y pueden transportar porciones de plásmidos e incluso porciones del cromosoma, de una bacteria a otra por transferencia conjugativa (transposones conjugantes o “gen saltarín”) (2,20).

## **2.5.- Betalactamasas.-**

Hoy se sabe que en muchas bacterias la resistencia a los antibióticos, se produce por la acción simultánea de varios mecanismos; pero para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en las enterobacterias, el más importante por su frecuencia y eficacia es la producción de  $\beta$ -lactamasas ( penicilinasas y cefalosporinasas), que son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico, inactivándolo.

### **2.5.1.- Definición.-**

Las Betalactamasas, también llamadas penicilin amido-betalactam hidrolasas (EC 3.5.2.6.), son una familia de enzimas cuya actividad es hidrolizar el enlace amida cíclico del anillo betalactámico presentes en antibióticos como la penicilina , cefalosporinas y

otros, inactivándolos, estas enzimas predominan en los bacilos gramnegativos y están mediados por plásmidos, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1.

### **2.5.2.- Origen de las Betalactamasas.-**

Las Betalactamasas, probablemente derivan de diferentes PBP, con las que guardan homología secuencial y estructural. Es posible que su función natural originaria fuera la de participar en la biosíntesis de la pared o la de evitar la autolesión en los microorganismos que producen naturalmente antibióticos betalactámicos; por lo que no es de extrañar que se hallen codificadas en el cromosoma de diversas bacterias dado su significado funcional. A través de elementos móviles como plásmidos, transposones y otros pueden difundir largamente entre las bacterias, manteniéndose por la presión selectiva de los antibióticos utilizados por el hombre.

### **2.5.3.- Mecanismo de acción.-**

Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros betalactámicos, por lo que se llaman PBP (Proteínas Fijadoras de Penicilina). La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria.

Los anillos de los antibióticos betalactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa.

Las  $\beta$ -lactamasas se unen al antibiótico betalactámico (Sustrato) formando un complejo reversible no covalente (Enzima-Sustrato). Si el complejo no se disocia, se forma un enlace entre la enzima y el sustrato produciéndose una estructura acil-enzima por unión del antibiótico con el grupo hidroxilo de la serina, que es el sitio activo de la enzima. Finalmente el producto de la hidrólisis se desprende de la enzima quedando ésta nuevamente libre para su acción, es decir se reactiva la enzima y se libera el antibiótico inactivo (19,21).

#### **2.5.4.- Detección y caracterización de las Betalactamasas.-**

Aunque el patrón de resistencia de una enterobacteria puede orientar respecto al tipo de betalactamasas presente, reconocerlas basándose en el patrón de resistencia requiere una gran experiencia y aún así es difícil, por la posibilidad de la hiperproducción de una enzima, que modifica el espectro de resistencia en relación con su expresión basal o la presencia simultánea de más de una betalactamasas plasmídica o de otros mecanismo de resistencia no enzimáticos asociados (permeabilidad, eflujo).

Las cepas portadoras de estas enzimas mantienen su sensibilidad a cefalosporina, monobactamas y carbapenems, parece que las propias betalactamasas proceden evolutivamente (por mutaciones sucesivas) de alguno de los genes que originalmente codificaban algunas de las "autolisinas" (PBPs) que intervienen en la maduración del peptidoglucano. Es decir, las betalactamasas serían formas modificadas de las mismas dianas (p. ej., las transpeptidasas) sobre las que actúan los betalactámicos.

Las BLEE son enzimas de configuración plasmídica producidas por enterobacterias que hidrolizan los antibióticos betalactámicos, incluyendo los que contienen el grupo oxina, como las cefalosporinas de 3era y 4ta generación y el aztreonam. Estas enzimas derivan por mutación de las betalactamasas de amplio espectro presentes en la mayor parte de enterobacterias Bacilos Gram Negativos (BGN), y se encuentran con mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* aunque se han identificado también en otras especies como *Proteus*, *Serratia* y *Salmonella* spp.

Las cepas de BGN productoras de BLEE, especialmente *Klebsiella pneumoniae*, son responsables de infecciones nosocomiales graves, cursando muchas veces con bacteriemia; Aunque también pueden producir infecciones de menor gravedad, tanto en pacientes intra y extrahospitalarios.

La multiresistencia que presentan estas cepas ocasionan un grave problema terapéutico, debido a que inactivan la acción antimicrobiana de muchos antibióticos, como anteriormente hemos señalado.

### **2.5.5.- Clasificación de las Betalactamasas.-**

Las betalactamasas han sido descritas desde los años cincuenta hasta la actualidad (25). La primera  $\beta$ -lactamasas descrita, era una enzima capaz de hidrolizar la penicilina y fue publicada en Nature en 1940(22). Las betalactamasas bacterianas son un complejo grupo de enzimas con propiedades diferenciales en función del sustrato que hidrolizan o las inhibe, su localización (intra o extracelular), su codificación (cromosómica y/o extracromosómica), expresión genética (constitutiva o inducible) y otras propiedades fisico-químicas (peso molecular, pI, inmunología). (50).

Todas estas características han sido utilizadas para establecer una clasificación funcional de las  $\beta$ -lactamasas. Las primeras clasificaciones se basaron en el perfil del sustrato, en el punto isoeléctrico, en el peso molecular, en la capacidad de la enzima de ser inducible o no y en la localización del gen productor de la enzima ya sea en el cromosoma o en el plásmido. Así, Sawai y col. en 1968, describen penicilinasas y cefalosporinasas; Richmond y Sykes en 1973, clasifican las enzimas en cinco grupos según su perfil de sustrato; Sykes y Matthew en 1976, enfatizan en las betalactamasas plasmídicas que podían ser diferenciadas por su punto isoeléctrico; Mitsuhashi y Inoue en 1981 añaden la categoría de betalactamasas que hidrolizan la cefuroxima. Más recientemente, el poder saber la secuencia aminoacídica de algunas betalactamasas, junto con sus propiedades enzimáticas han liderado la clasificación de estas enzimas: Ambler, 1980 y Jaurin y cols. En 1981 clasifican las enzimas en cuatro clases según su estructura molecular A, B, C y D;

Bush en 1989 (25), incluyen enzimas producidas por toda clase de bacterias y es el primer esquema que trata de correlacionar las propiedades del sustrato molecular; Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, revisan la anterior clasificación (26). Y realizan una clasificación basada en los criterios anteriores y nuevos criterios como lo son: codificación plasmídica o cromosómica; espectro de hidrólisis; espectro de inhibición hacia clavulánico (CA), cloxacilina (CLOX), sulbactam (SUL), aztreonam (AZ), ceftazidime (CAZ). Inhibición por EDTA y por PCMB (betacloromercuribenzoato); peso molecular, clase molecular, punto isoeléctrico y secuenciación de nucleótidos.

Mantienen la clasificación de cuatro grupos, pero generan nuevos subgrupos, ésta es la clasificación:

#### **a.- Betalactamasas del Grupo I.-**

Dentro de este grupo están todas las enzimas serina con actividad cefalosporinasas, capaces de hidrolizar benzilpenicilina; no son inhibidas por ácido clavulánico pero sí por el aztreonam y casi siempre son de naturaleza cromosómicos, aunque hay algunos que se integran al gen por plásmidos. Pueden ser inducibles o constitutivas, de clase molecular C (formadas por proteínas básicas con un peso molecular > 30 kD y punto isoeléctrico >7,0). Se incluyen la mayoría de cefalosporinasas de Enterobacteriaceae Incluyen 32 cefalosporinasas. (E. coli, K. pneumoniae, P aeruginosa, Enterobacter spp, Serratia spp, Citrobacterfreudii).

**b.- Betalactamasas del Grupo II.-**

Dentro de este grupo se encuentran todas las enzimas serina con actividad penicilinasas e inhibidas por ácido clavulánico. La mitad son de codificación plasmídica, y se incluyen 138 betalactamasas, Como *K pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, *E. vulgaris*, *E. cloacae*, *S. marcescens.*, *S. aureus*, *P aeruginosa*, *C. Freundii* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

A la vez se clasifican en 8 subgrupos:

**Subgrupo 2a:** Con actividad penicilinasas, inhibida por ácido clavulánico, de acuerdo al peso molecular y son identificadas como "clase molecular A", penicilinasas de bacterias Gram positivo como la estafilocócica vistas en *S. aureus* y *S. albus*

**Subgrupo 2b:** Con actividad penicilinasas y cefalosporinasas, inhibida por ácido clavulánico, con una clase molecular A, generalmente plasmídicas y constitutivas.

Ejemplos: Se incluyen las enzimas más frecuentes de bacterias Gram negativo, TEM 1 de *E. coli*; TEM2 de *P aeruginosa*; SHV- 1 de *E.coli*. y la cantidad de enzima secretada depende del número de copias del plásmido, del número de copia del gen y de la eficiencia del promotor del gen.

**Subgrupo 2be:** Se agruparon todas aquellas enzimas con un porcentaje de hidrólisis mayor al 10% hacia la ceftazidina, cefotaxime o aztreonam que a la bencilpenicilina.

En ellas se agrupan penicilinasas de amplio espectro, cefalosporinasas y monobactams.

Son enzimas de espectro amplio, derivadas estructuralmente del grupo 2b, inhibidas por ácido clavulánico. Varían en el nivel de resistencia conferida. Clase molecular A.

Se incluyeron betalactamasas como TEM-7 de *C. freundii* y TEM-2, que son resultado de mutaciones puntuales en genes que producen las enzimas TEM- 1, y TEM-2.

Ejemplos: Se incluyen las enzimas de bacterias Gramnegativas TEM-3 a TEM-27; SHV-2 a SHV-7; KI de *Klebsiella oxytoca*. Se aíslan con más frecuencia de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

**Subgrupo 2br:** Derivadas estructuralmente del grupo 2b, con actividad sobre penicilinasas, son de tipo plasmídica, con una reducida afinidad por el ácido clavulánico y otros inhibidores, y son de clase molecular A.

**Subgrupo 2c:** Se incluyen todas las enzimas que hidrolizaron un 60% más la carbenicilina que las bencilpenicilinas; y un 50% menos cloxacilina que bencilpenicilina.

Estas enzimas tienen actividad sobre las penicilinasas, y en especial a carbenicilinasas, inhibidas por ácido clavulánico, de codificación generalmente plasmídica y solo ocasionalmente cromosómica, y son de clase molecular A.

**Subgrupo 2d:** Se incluyen todas las enzimas que hidrolizaron un 50% más la cloxacilina que las bencilpenicilinas; y que también hidrolizan la carbenicilina.

Estas enzimas tienen actividad sobre las penicilinasas, y en especial a las oxacilinasas. Inhibidas por ácido clavulánico en menor grado, su codificación en general es plasmídica, y son de clase molecular D.

**Subgrupo 2e:** Son cefalosporinasas que hidrolizaron cefotaxime (cefuroximasas) pero que pierden la actividad hidrolítica sobre las penicilinasas. Inhibidas por ácido clavulánico pero con baja afinidad por el monobactam. Inhibidas por ácido clavulánico. Clase molecular A.

**Codificación cromosómica o plasmídica.** Se incluyen las cefalosporinas inducibles de *P. vulgaris* y la enzima L-2 de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Subgrupo 2f. Actividad sobre penicilinasas, cefalosporinasas, y carbapenemasas. Inhibidas débilmente por ácido clavulánico, son de clase molecular A y de codificación cromosómica e inducible.

### **c.- Betalactamasas del Grupo III.-**

Incluye la mayoría de las Betalactamasas que son inhibidas por EDTA pero no inhibidas por ácido clavulánico. Compuesto por metaloenzimas incluyendo carbapenems, son de clase molecular B. Se incluyen *P. aeruginosa*, *B. fragilis*, *S. maltophilia*, algunas especies de *Aeromonas* sp, *Flavovacterium* sp. y *Serratia* sp.

Codificación generalmente cromosómica, algunas de tipo plasmídica.

Se incluyen las enzimas L- 1 de *Stenotrophomonas maltophilia*, CcrA de *B. fragilis*.

**d.- Betalactamasas del Grupo IV.-**

Son penicilinasas que no son inhibidas por ácido clavulánico. Son poco estudiadas por lo que no se ha determinado su clase molecular. Se incluyen en este grupo la penicilinasas cromosómica de *Burkholderia cepacia*, y algunas de codificación plasmídica.

**e.- Betalactamasas Cromosómicas.-**

La mayoría de las enterobacterias, como muchas bacterias de otros grupos, poseen en su cromosoma un gen que codifica una betalactamasa; existe especificidad entre la especie bacteriana y el tipo de betalactamasa.

En algunas especies como *K pneumoniae*, *K oxytoca*, *P. vulgaris*, *C. diversus* y *Yersinia enterocolitica* (y en la mayoría de las cepas del género anaerobio *Bacteroides*), la betalactamasa cromosómica es de clase A (sensible al ácido clavulánico) se expresa a niveles bajos, que resultan escasamente operativos, ya que la exigua cantidad producida no es suficiente para inactivar a los betalactámicos o sólo afecta a los más lábiles como la ampicilina. Este es el caso de SHV- 1 de *K. pneumoniae* y Kl en *K oxytoca*. Sin embargo, estas enzimas son inducibles, excepto en *Klebsiella*, por lo que se puede incrementar su producción basal durante el tratamiento.

Otro grupo de Enterobacterias poseen Betalactamasas cromosómicas de la clase C: *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *C. freundii* y *M. morgani*, (y *P. aeruginosa*). Estas betalactamasas, que no son sensibles al ácido clavulánico y, son inducibles (fenómeno reversible) particularmente por cefoxitin e imipenem, se expresan a nivel moderado. Las mutaciones en los genes reguladores pueden implicar una elevada y continua producción (constitutiva) de la enzima (desrepresión, fenómeno irreversible), la cual inactiva a todos los betalactámicos, excepto los carbapenems. Sin embargo, en presencia de alteraciones en las porinas, que disminuyan la permeabilidad de la membrana externa, los carbapenems también pueden resultar inactivos (25-27).

*E. coli* y *Shigella*, poseen una betalactamasa cromosómica de la clase C, pero producida en cantidades insuficientes para afectar a los betalactámicos.

#### **f.- Betalactamasas Plasmídicas.-**

A los microorganismos se incorporan piezas genéticas (plásmidos o transposones conjugativos) portadoras de genes de betalactamasas que modifican el perfil de sensibilidad natural de las cepas salvajes de enterobacterias a los antibióticos betalactámicos. Con gran frecuencia estos vectores portan simultáneamente genes de resistencia para otros antibióticos como aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfamidas y trimetopim.

Las betalactamasas plasmídicas son, generalmente, constitutivas (no inducibles) y su nivel de expresión es variable pudiendo incrementar su producción basal debido a variaciones en la localización del gen y la existencia de multicopias del plásmido o de los genes. Por lo tanto, todas estas enzimas pueden estar producidas a bajo nivel o hiperproducidas.

**g.- Betalactamasas de amplio espectro o clásicas.-**

La mayoría de las betalactamasas plasmídicas que se encuentran en las enterobacterias, como la TEM-1, TEM-2, SHV-1 y OXA-1 que son las más frecuentes, pertenecen a la clase A. Hidrolizan, y por tanto inactivan, con eficacia decreciente a la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y cefalosporinas de primera generación, siendo sensibles al ácido clavulánico. La síntesis de antibióticos como la ceftioxitina, la cefotaxima y el aztreonam, que no se inactivan por estas betalactamasas permitió superar la resistencia de las enterobacterias productoras de esas enzimas (28,29).

**g.1.- Betalactamasas TEM – 1 .-**

En respuesta al uso clínico y extendido de las penicilinas de más amplio espectro como la ampicilina y la carbenicilina, y de las cefalosporinas aparecidas en los años 60 y principios de los 70, aparecen las betalactamasas mediadas por plásmidos que comienzan a emerger básicamente entre Enterobacteriaceae y otras bacterias gramnegativas. La primera enzima mediada por un plásmido y encontrada en una enterobacteria, fue la TEM-1 aislada en E.

coli en 1963(28). El nombre de TEM es una contracción de Temoniera, el nombre de la paciente de la que fue aislada. Desde esa época se ha expandido entre un 20 y un 60 % entre las enterobacterias; su frecuencia varia con la especie y el lugar (19). En E. coli es la responsable de la resistencia a la ampicilina en cerca del 25 % de las cepas (10).

### **g.2.- Betalactamasa SHV – 1 .-**

La SHV es una contracción de sulhidrilo variable, una descripción de las propiedades bioquímicas de esta  $\beta$ -lactamasa. La SHV-1 fue también llamado PIT-2, porque fue por primera vez descrito por Pitton en 1972. La SHV-1 plasmídica ha sido detectada principalmente en Klebsiella (además de ser portadora natural de SHV-1 en su cromosoma) entre un 33% y un 94% de las cepas que producen resistencia a la ampicilina.

Se han observado hiperproducciones de SHV- 1 tanto en E. coli como en K. pneumoniae. La hiperproducción de la SHV- 1 produce una disminución de la sensibilidad a la ceftazidima y a la amoxicilina-ácido clavulánico. (31,32).

### **h.- Betalactamasas de Espectro Extendido.-**

Las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son un grupo de enzimas de codificación plasmídica, derivadas de las betalactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV-1). A diferencia de estas últimas, que confieren resistencia a amino y ureidopenicilinas,

amplían el espectro hidrolítico a cefalosporinas de tercera generación y monobactams (29,36).

A este grupo pertenecen las familias TEM , SHV y OXA , las más abundantes son las TEM con más de cincuenta tipos diferentes, también se han denominado como BLEE las derivadas de TEM o SHV que confieren resistencia a inhibidores de las betalactamasas. Estas enzimas difieren de las betalactamasas clásicas TEM o SHV en que su acción hidrolítica sobre penicilinas no se ve inhibida por el ácido clavulánico. Su fenotipo es de resistencia a penicilinas y a combinaciones de penicilinas con inhibidores de las betalactamasas y pertenecen al grupo 2br de la clasificación de Bush de 1995. En los últimos años se han descrito nuevas betalactamasas, también denominadas betalactamasas de espectro ampliado que no derivan de TEM ni de SHV. Entre ellas se encuentran las cefalosporinas derivadas de la integración del gen cromosómico de ampC en plásmidos, que confieren resistencia a todas las cefalosporinas, incluyendo cefamicinas; estas enzimas se han descrito en *K. pneumoniae* y *E. coli*. Otras nuevas betalactamasas, también de espectro ampliado, son las carbapenemasas descritas recientemente en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*.

#### **h.1.- Betalactamasas de Espectro Extendido tipo TEM y SHV.-**

Las C3G son resistentes a las penicilinasas plásmidicas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV-1). Pero en 1983 y debido al uso intensivo de estos compuestos en el tratamiento de las infecciones en los hospitales, emergió un nuevo tipo de resistencia a aquellos antibióticos.

Fue en la República Federal de Alemania donde se detectó por primera vez en cepas de *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *S. marcescens*, una Betalactamasa plasmídica capaz de hidrolizar a las C3G, que se denominó SHV-2 por su similitud con SHV-1. Después de ese primer aislamiento han aparecido en los cinco continentes, sobre todo en el género *Klebsiella* inicialmente, poco después en *E. coli* y luego progresivamente en las demás enterobacterias.

Las BLEE son enzimas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, se inactivan por el ácido clavulánico al que suelen ser aún más sensibles que las propias betalactamasas de las que se derivan, pero expanden su espectro de acción hidrolizando las cefalosporinas de segunda y tercera generación y al aztreonam, sin afectar a la cefoxitina (cefamicina) ni al imipenem (carbapenem). En general, la eficiencia catalítica global de estas variantes suele ser inferior a las de sus parentales lo que en ocasiones se halla compensado por la disposición de promotores más eficientes (29).

Al estudiar estas betalactamasas se observó que son similares a las betalactamasas plasmídicas clásicas de la que se derivan, en donde, mínimas modificaciones en su estructura, muchas veces la variación de un sólo aminoácido, (por mutaciones puntuales en los correspondientes genes estructurales) dan lugar a alteraciones muy considerables en su espectro de sustrato, por lo que se les denominó betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

El grado de actividad sobre los diferentes betalactámicos varia según la betalactamasa implicada, así la TEM-4 por ejemplo actúa sobre cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima en tanto que la TEM-12 y la TEM-26 son fundamentalmente ceftazidimasas, hidrolizando poco la cefotaxima.

En general estas enzimas han sido encontradas en muchas Enterobacterias, sin embargo son predominantes en *K. pneumoniae*. En el caso de los derivados de SHV, esta situación podría estar en relación con el hecho de que la enzima original SHV- 1 probablemente se deriva del gen de codificación cromosómica de *Klebsiella*, ya que es idéntica (28,29). Hay sin embargo, menos claridad para los derivados de TEM, ya que el origen de las TEM-1 y 2 no se conoce.

En Inglaterra, Francia y Portugal del 14 al 16% de las BLEE se detectan en *K. pneumoniae*. Otras Enterobacterias también producen BLEE pero en mucha menor frecuencia. En Francia, por ejemplo del 2 al 3% del total de enterobacterias portadoras de BLEE son *Enterobacter* spp. y *K. oxytoca*, y el 0,1% a *E. coli*. No sorprende que los brotes hayan sido asociados a largas hospitalizaciones, cirugía, o la presencia de catéteres urinarios o arteriales, especialmente en pacientes de las unidades de cuidados intensivos. De hecho también se ha observado la aparición de nuevos mutantes de betalactamasas de espectro extendido en la misma institución o incluso en el mismo pacientes. El tracto gastrointestinal de los pacientes hospitalizados puede actuar como reservorio de estos microorganismos portadores de BLEE.

En la actualidad se conocen 89 BLEE tipo TEM, 31 tipo SHV y 9 tipo OXA (33) pero es difícil cerrar un número porque continuamente se describen nuevas mutantes. Probablemente la diferencia de las políticas en el uso de antibióticos de cada país hace que se distribuya una u otra enzima.

### **h.2.- Betalactamasas de espectro extendido de la familia CTX-M.-**

Un nuevo grupo de reciente aparición y que se ha incorporado a la clase A (subgrupo 2be) son las enzimas del grupo CTX-M. Poseen una afinidad de sustrato muy preferente por la cefotaxima y son susceptibles a la inhibición por inhibidores de betalactamasas. Sin embargo, su secuencia de proteínas es muy distinta a la de las TEM, SHV u OXA siendo en cambio similar (85% de homología) a la betalactamasa cromosómica de *K oxytoca* y recientemente se ha descrito una alta homología con la betalactamasa de *Kluyvera ascorbata* KluA1 y KluA2. Estas son CTX-M-1 (MEN-1), CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-4 CTX-M-5 CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-8, CTX-M-9, TOHO-1 y TOHO-2 (34). Estas enzimas se han aislado en áreas geográficamente distantes como Alemania, Italia, Argentina y España, lo que sugiere una amplia difusión de estas betalactamasas (35).

### **i.- Oxacilinasas.-**

Otro grupo de betalactamasas plasmídicas está formado por las OXA (OXA-1 a OXA19) que se han incluido en el grupo D de Ambler. Estas enzimas tienen un perfil de sustrato

semejante a TEM-1, TEM-2 y SHV-1; son inactivadas por el ácido clavulánico, pero con mucha menor eficacia que lo son para las betalactamasas TEM-1, TEM-2 o SHV-1. En el grupo de enzimas OXA, la más común es OXA-1 la cual está muy distribuida en la familia Enterobacteriaceae. En E. coli entre un 3 y un 23% de las cepas resistentes a la ampicilina poseen esta enzima. OXA-2 ha sido aislado de E. coli, P. mirabilis, Serratia y Salmonella. En las cepas de Serratia la enzima es detectada con una frecuencia entre 9 y 25%. OXA-3 ha sido detectada principalmente en Klebsiella y menos frecuentemente en E. coli. Las enzimas OXA-4 y OXA-7 han sido aisladas en cepas de E. coli resistentes a la ampicilina, y OXA-5 y OXA-6 en cepas de P. aeruginosa resistente a la carbenicilina.

También se conocen BLEE derivadas de OXA como OXA-10, OXA-11, OXA-14 a OXA-19, pero raramente se han encontrado en enterobacterias; estas enzimas poseen espectro dominante de ceftazidimasa tienen menor actividad frente al aztreonam y son poco inactivadas por el clavulánico.

#### **j.- Betalactamasas Resistentes a los Inhibidores.-**

Otro grupo de betalactamasas, conocido desde los primeros años 90, son unas enzimas que no modifican de forma sustancial el espectro de sustratos que hidroliza, pero sí modifican su reconocimiento por inhibidores de betalactamasas. Se han originado a partir de TEM-1 y TEM-2 y son resistentes a los inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico o el sulbactam; se les ha denominado betalactamasas resistentes a los

inhibidores (IRBL), pero también son conocidas como IRT (Inhibitor Resistant TEM). Se conocen varias enzimas con esa actividad (TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-79). Estas enzimas resistentes a los inhibidores, muestran menor actividad hidrolítica frente a todas las cefalosporinas, por lo que no parecen constituir una gran amenaza.

**Hipótesis.-**

El uso del método de Disco Difusión estandarizado por la NCCLS permite detectar en forma temprana las enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido.

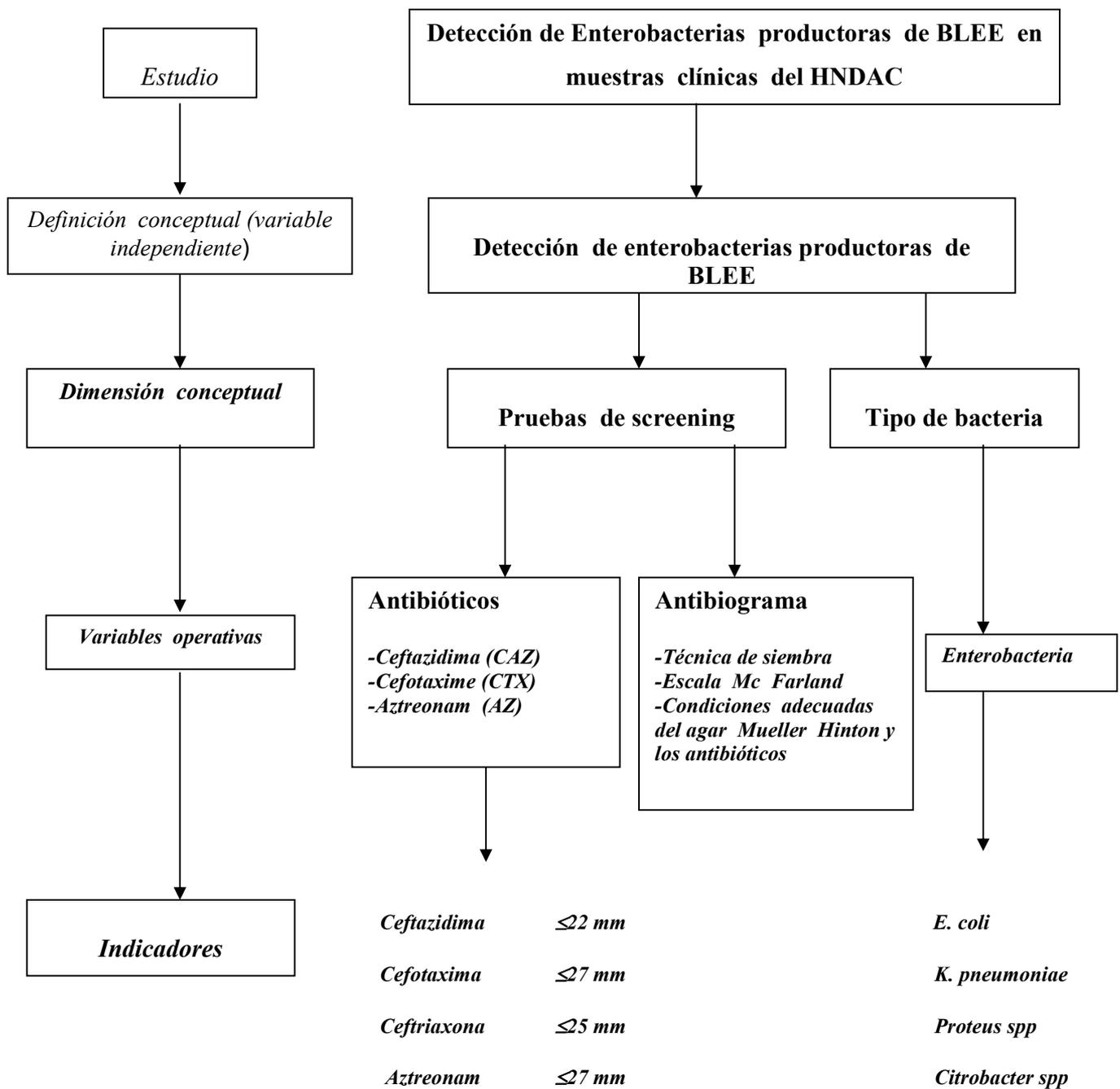
**Variable Dependiente**

“Detección de Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido”

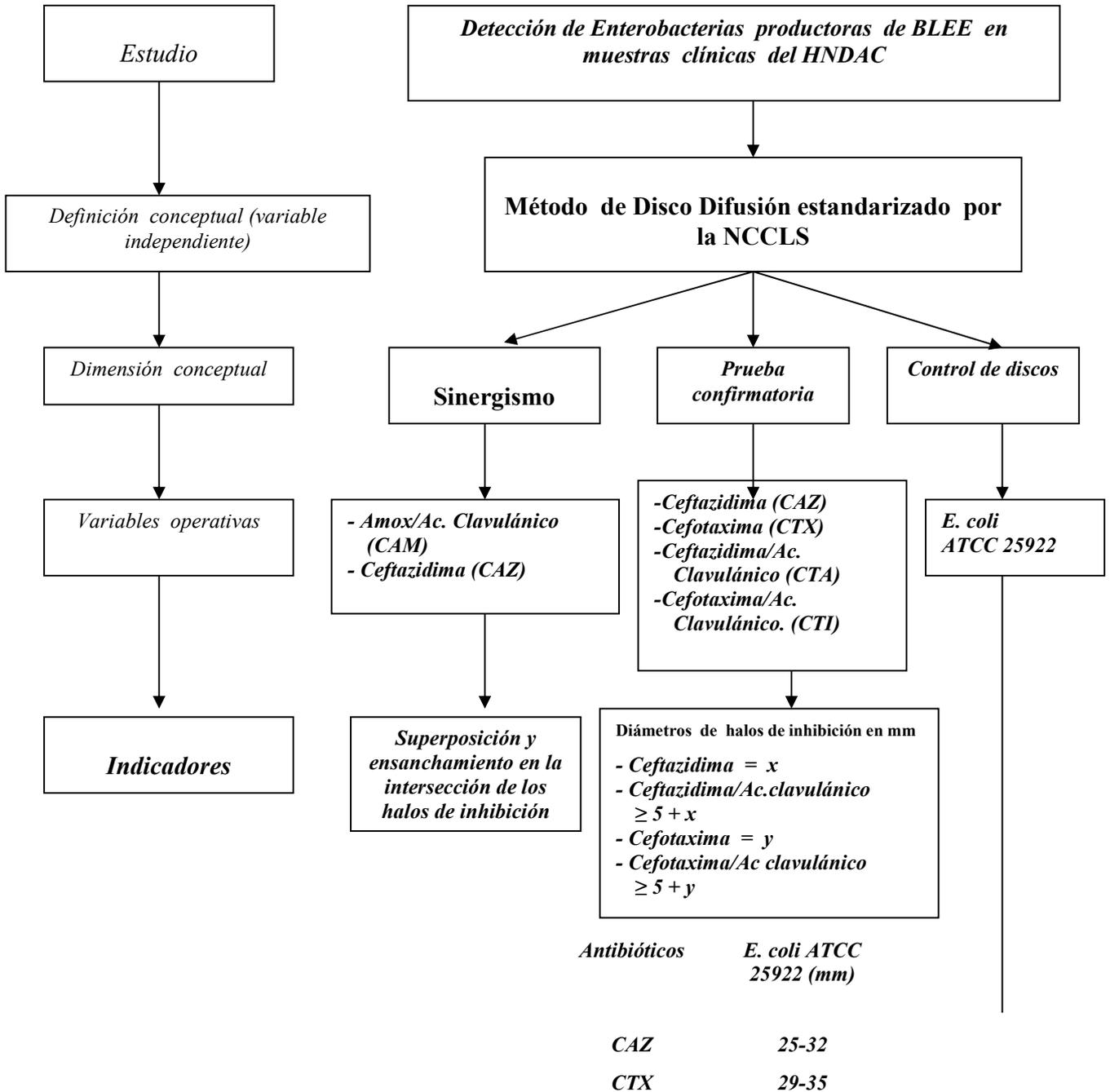
**Variable Independiente:**

“Método de Disco Difusión estandarizado por la NCCLS”.

**PROCESO DE OPERACIONALIZACION DE LA VARIABLE DEPENDIENTE**



**PROCESO DE OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE**





**OPERACIONALIZACION DE VARIABLES**

<i>VARIABLE</i>	<i>INDICADOR</i>	<i>CATEGORÍAS</i>	<i>MEDICIÓN DE LAS CATEGORÍAS</i>
<i>Método de Disco Difusión estandarizado por la NCCLS</i>	<i>Prueba confirmatoria</i>	<i>Positiva para BLEE</i>	<b><u>Criterios de Positividad:</u></b> <i>Incremento mayor o igual a 5mm de diámetro en los halos de las cefalosporinas combinadas con Ac clavulánico en relación con el diámetro de las mismas sin Ac clavulánico.</i>
		<i>Negativa para BLEE</i>	<i>Incremento de los halos menor a 5mm de lo anteriormente explicado.</i>
	<i>Sinergismo</i>	<i>Presencia</i>	<i>Superposición y ensanchamiento en la intersección de los halos de inhibición de ceftazidima (CAZ) y amoxicilina / Ac clavulánico (CAM).</i>
<i>Detección de Enterobacterias productores de BLEE</i>	<i>Prueba screening</i>	<i>Presuntiva para BLEE</i>	<i>Cefotaxima ≤ 27 mm Ceftazidima ≤ 22 mm Aztreonam ≤ 27 mm</i>

	<i>Tipo de bacteria</i>	<i>Enterobacteria</i>	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i>
--	-------------------------	-----------------------	--

### ***III DISEÑO DE LA INVESTIGACION***

(MATERIALES Y METODOS)

### **3.1.-Tipo de estudio.-**

El estudio realizado fue de tipo **Descriptivo** el cual tuvo por finalidad medir y evaluar diversos aspectos, dimensiones o componentes del fenómeno a investigar; **Exploratorio**, porque el tema que se citó fue abordado y profundizado muy pocas veces por otros investigadores; **Analítico**, por que se ejecutó de manera detallada con relación al análisis de las variables que intervinieron; **Prospectivo**, por que nos permitió pronósticar, recomendar y establecer información para investigaciones posteriores; y **Transversal**, porque la recolección de datos se realizó en un momento específico durante un período limitado de tiempo.

### **3.2.- Área de Estudio.-**

Este estudio fue realizado en los servicios del Area de Microbiología del Laboratorio Central del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, en la cual se procesaron las muestras clínicas de pacientes que en su mayoría fueron pobladores de la provincia del Callao y de las zonas aledañas.

### **3.3.- Población y Muestra.-**

Debido al tipo de estudio realizado, nuestra población muestral fue de 552 aislamientos microbiológicos, la cual incluyó solamente enterobacterias y fueron recolectadas considerando todas las muestras clínicas que llegaron a los distintos servicios del área de microbiología (urocultivo, secreciones, coprocultivo y hemocultivo), entre julio – diciembre del 2003; teniendo en cuenta que nuestro muestreo fué de tipo no probabilístico, nuestra población se seleccionó siguiendo los criterios para fines del estudio.

#### **3.4.- Recolección de datos. -**

Los datos fueron recolectados por un cuestionario con formato tipo encuesta (ver anexo).

#### **3.5.- Plan de tabulación y análisis de datos. -**

La tabulación de los datos se ejecutó utilizando el software SPSS 10.

#### **3.6.- Materiales. –**

Para los efectos del estudio, se emplearon los siguientes materiales:

Medios de Cultivo para aislamiento:

- Agar Chocolate (Columbia)
- Agar Sangre (Columbia)

## UNMSM *Tecnología Médica*

- Agar Mc Conkey (Oxoid)

Medios Diferenciales para tipificar enterobacterias aisladas por género y especie:

- Agar Triple Sugar Iron (TSI)
- Agar Lisina Hierro (LIA)
- Agar Citrato de Simmons
- Agar Urea
- Agar Indol Ornitina (MIO)
- Caldo Rojo de Metilo (MR)
- Caldo Voges Proskauer (VP)
- Agar Sacarosa Lactosa Urea (SLU)
- Caldo Peptonado (Indol)

Medio para la Prueba de susceptibilidad a Antibióticos:

- Agar Müeller Hinton

Todos los medios empleados fueron preparados según los procedimientos indicados por la casa comercial de procedencia, cerciorándonos que cada uno de ellos cumplan los requerimientos necesarios para su control de calidad, siendo incluidos dentro de estos procedimientos, la evaluación del pH óptimo utilizando tiras de pH, control de esterilidad, control de la humedad, entre otros.

Otros Materiales:

- Placas de Cultivo
- Hisopos Estériles

## UNMSM *Tecnología Médica*

- Mecheros
- Tubo con Sulfato de Bario como Standard de Turbidez (Mac Farland 0.5)
- Pinzas de acero inoxidable
- Asas de Siembra en anillo, calibradas y en punta.
- Incubadora a 35°C
- Viales Estériles
- Solución Salina Estéril
- Discos de Antibióticos (EMB)
- Tiras reactivas para el pH (pH – Idikatorstübchen nicht blutend) Neutralidad: 5 – 10
- Reactivo de Kovac (Indol)
- Reactivo Rojo de Metilo
- Reactivo Alfa Naftol y KOH (Voges Proskauer)
- Regla milimetrada

Cepas para Control de Calidad:

- Cepas de Escherichia coli ATCC 25922

### **3.7.- Metodología.-**

El método utilizado para la detección de enterobacterias productoras de BLEE fue la Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de Disco Difusión, basado en el método descrito por Kirby - Bauer y estandarizado por el Laboratorio Internacional de referencia: National Committee for

Clinical Laboratory Standards (NCCLS - OMS), teniendo en cuenta las nuevas directrices publicadas por dicho comité.

### **3.7.1.- Obtención de Cepas.-**

Las muestras clínicas que llegaron a los servicios de microbiología (Urocultivo, Hemocultivo, Secreciones), fueron procesadas según el protocolo del laboratorio del HNDAC, estas se sembraron en medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre (aislamiento primario) empleando la técnica de dispersión y agotamiento, luego se resembró aquellas que a la coloración Gram resultaron ser Bacilos Gram Negativos(BGN) en medios selectivos para enterobacterias como agar Mac Conkey y agar Salmonella Shiguella (aislamiento secundario).

### **3.7.2.- Identificación de Cepas.-**

Después del aislamiento de las cepas de enterobacterias se procedió a su identificación, para lo cual se tomó como fundamento los requerimientos bioquímicos de estas, empleando para dicho propósito Medios Diferenciales como: TSI, Citrato, Urea, LIA, MIO, SLU, MR, VP, Indol, en los cuales se hizo la resiembra con la técnica establecida para cada medio; pudiendo identificar así según los patrones bioquímicos expresados, su identidad por género y especie.

### **3.7.3.- Prueba de Susceptibilidad Bacteriana (Método de Kirby – Bauer).-**

#### **3.7.3.1.- Preparación de las Placas.-**

Se prepararon placas con agar Mueller Hinton (alta reproducibilidad, baja concentración de inhibidores y por el crecimiento satisfactorio de la mayoría de patógenos no exigentes). Para el cual se tuvo en consideración que el agar debe alcanzar un espesor de 4mm aproximadamente distribuidos uniformemente en las placas, estas se usaron en un lapso de 7 días después de la preparación, también se tuvo en cuenta el pH del agar ya que debe estar comprendido entre 7.2 y 7.4 después de gelificar a temperatura ambiente.

### **3.7.3.2.- Preparación del Inóculo.-**

Para realizar este procedimiento, se utilizó, el estandar de turbidez 0.5 en la escala de Mac Farland, recipientes como viales o tubos de ensayo conteniendo Solución Salina Estéril.

El inóculo se preparó haciendo directamente una suspensión de colonias en solución salina (más o menos 3 a 5 colonias bien delimitadas con el mismo tipo de morfología) aisladas del medio diferencial TSI incubadas a 35°C por 18 a 24 horas. La turbidez de dicha suspensión se ajusta hasta obtener una turbidez ópticamente comparable al estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland, generando así una densidad poblacional aproximada de  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UFC/ml.

### **3.7.3.3.- Inoculación en las Placas.**

Cuando la suspensión del inóculo ha alcanzado el punto adecuado de turbidez, entonces sumergimos en ella un hisopo estéril, el cual fue rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del vial sobre el nivel del líquido (esto remueve el exceso del inóculo), luego se inoculó en la superficie de la placa con agar Mueller Hinton, estriando en tres

dimensiones con el fin de cubrir uniformemente toda la superficie del agar, esto fue realizado en un período máximo de 15 minutos.

#### **3.7.3.4.- Aplicación de los Discos.-**

Posteriormente procedimos a colocar los discos de antibióticos sobre la superficie del agar, cada disco fué presionado suavemente con la punta de la pinza, para asegurar el contacto firme con la superficie del agar, y asegurar la difusión del antibiótico. Estos discos fueron colocados a una distancia no menor de 22mm uno del otro y a 14mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan, el tiempo en que se colocó estos discos no excedió a los 15 minutos, (tiempo óptimo para la colocación de los mismos). Posteriormente se procede a incubar las placas a 35°C por un lapso de 24 horas.

#### **3.7.3.5.- Control de Calidad.-**

Para la evaluación de nuestro método, utilizamos una cepa de referencia estandar como *Escherichia coli* ATCC 25922, el cual se empleó en la prueba de Suseptibilidad de Disco Difusión, para el control del medio (Müeller Hinton) y los discos betalactámicos, tanto los individuales (CAZ, CTX, CFT), como los combinados con Ácido Clavulánico (CTA, CTI), presentando halos de inhibición cuyos valores ingresaron en el rango establecido por la NCCLS.

#### **3.7.3.6.- Lectura de las placas e interpretación de los Resultados.-**

Después de haberse incubado durante un período de 24 horas, las placas son examinadas por simple inspección visual para descartar posible contaminación, luego de hacer el descarte de contaminación se procede a medir los diámetros de los halos de inhibición. Las dimensiones de los halos según el tipo de antibiótico se clasificaron como sensible, intermedio y resistente. Para la interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición se siguieron los criterios establecidos por la NCCLS, el cual menciona que se debe presumir de una posible bacteria productora de Betalactamasa de Espectro Extendido cuando los diámetros de antibióticos como Ceftazidima (30ug), Aztreonam (30ug), Cefotaxima (30ug), sean iguales o inferiores a 22, 27y 27 mm respectivamente; de ser así se realizará la prueba confirmatoria.

### **3.7.4.- Prueba Confirmatoria.-**

#### **3.7.4.1.- Procedimiento.-**

El procedimiento para realizar la prueba Confirmatoria es similar a la desarrollada para la Prueba de Susceptibilidad (Antibiograma) con la salvedad de que se emplearon los siguientes antibióticos:

- Ceftazidima (CAZ - 30ug)
- Cefotaxima (CTX – 30ug)
- Ceftazidima / Ácido Clavulánico (CTA – 30/10ug)
- Cefotaxima / Ácido Clavulánico (CTI – 30/10ug)
- Amoxicilina / Ácido Clavulánico (CAM – 20/10ug).

**3.7.4.2.- Interpretación.-**

Luego de la incubación a 35°C por 24 horas procedimos a leer los halos de inhibición, resultando positivo a la presencia de Betalactamasas de Espectro Extendido, según la NCCLS, cuando el patrón de comparación entre el halo de inhibición de un antibiótico simple

(Cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación: CAZ, CTX) versus el halo de inhibición de un antibiótico compuesto (Cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación más un Inhibidor de betalactamasas: CTA, CTI) respectivamente resultó ser igual o mayor a 5mm.

Adicionalmente se incluyó el disco de de Amoxicilina / Acido clavulánico (CAM) con la finalidad de observar el fenómeno de sinergismo, que se define como un incremento o ensanchamiento en la intersección de los halos de inhibición de dos antibióticos, el cual se produce por interacción de un betalactámico (Ceftazidima - CAZ) y un disco compuesto por un betalactámico más un inhibidor de betalactamasas (Amoxicilina / Ac. Clavulánico - CAM) dispuestos entre sí a una distancia de 25mm; de tal modo que la presencia de este fenómeno reforzó el criterio de estar frente a una cepa productora de Betalactamasas de Espectro Extendido.

## **IV.- RESULTADOS**

Durante el período de estudio julio-diciembre 2003, en el laboratorio del Área de microbiología del Hospital Nacional Daniel A. Carrión (HNDAC) se aislaron un total de 552 enterobacterias en muestras clínicas procedentes de los diferentes servicios hospitalarios (Cuadro N° 1 y 2).

**Cuadro N° 1: Enterobacterias aisladas en el HNDAC (julio – diciembre 2003) según el Tipo de Especie.**

<b>Tipo de Especie</b>	<b>N° de Enterobacterias Aisladas</b>
<b>Escherichia coli</b>	<b>372</b>
<b>Escherichia fergusonii</b>	<b>61</b>
<b>Klebsiella pneumoniae</b>	<b>31</b>
<b>Klebsiella oxytoca</b>	<b>11</b>
<b>Proteus mirabilis</b>	<b>24</b>
<b>Enterobacter aerogenes</b>	<b>10</b>
<b>Enterobacter cloacae</b>	<b>9</b>

<b>Citrobacter freundii</b>	<b>11</b>
<b>Otros</b>	<b>23</b>
<b>Total</b>	<b>552</b>

**Cuadro N° 2: Enterobacterias aisladas en el HNDAC (julio – diciembre 2003) según el Tipo de Muestra.**

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>N° de Enterobacterias Aisladas</b>
<b>Urocultivo</b>	<b>457</b>
<b>Secrecion Vias Respiratorias</b>	<b>28</b>
<b>Abscesos</b>	<b>20</b>
<b>Secreción Vaginal</b>	<b>13</b>
<b>Hemocultivo</b>	<b>11</b>
<b>Otros</b>	<b>23</b>
<b>Total</b>	<b>552</b>

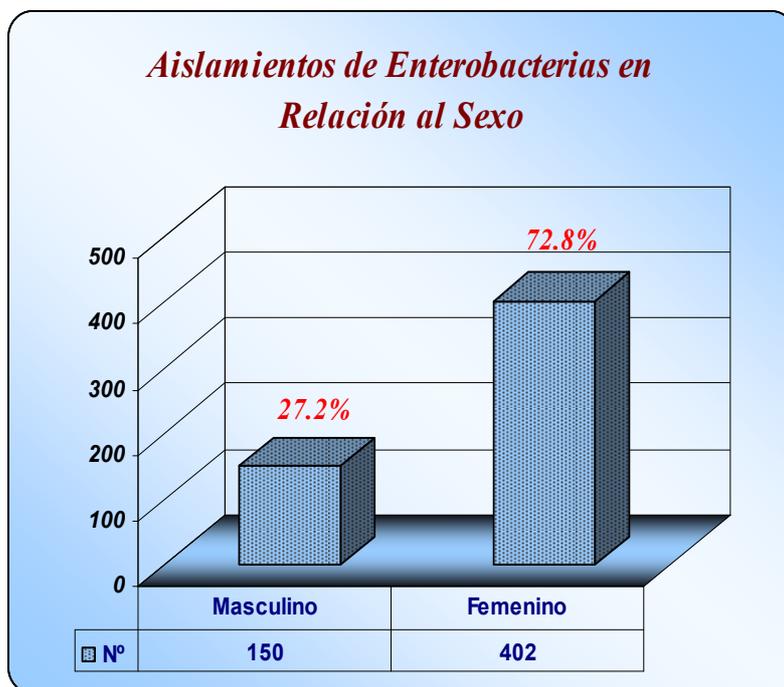
De los cuales se observó un mayor número de aislamientos en muestras de pacientes de sexo femenino con 402(72.8%) y 150(27.2%) de sexo masculino, de forma análoga en muestras

extrahospitalarias con 357(64.7%) y 195(35.3%) intrahospitalarias (Cuadro N° 3) (Gráfico N°1 y N°2).

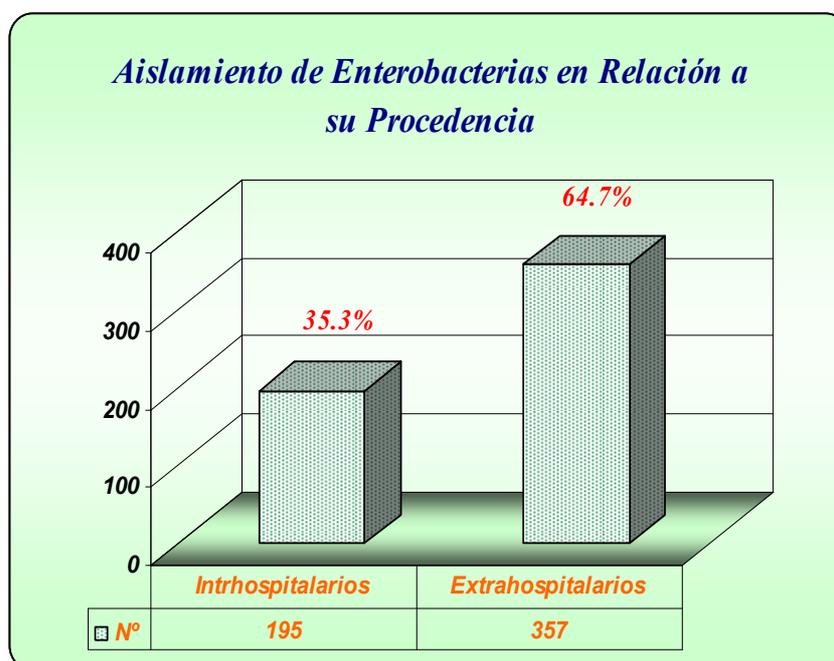
**Cuadro N° 3: Enterobacterias aisladas en el HNDAC (julio – diciembre 2003) según el Tipo de Sexo y Procedencia.**

<b>Procedencia / Sexo</b>	<b>Masculino</b>	<b>Femenino</b>	<b>Total</b>
<b>Intrahospitalario</b>	<b>90</b>	<b>105</b>	<b>195</b>
<b>Extrahospitalario</b>	<b>60</b>	<b>297</b>	<b>357</b>
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>402</b>	<b>552</b>

**Gráfico N° 1: Aislamientos de Enterobacterias en relación al sexo.**



**Gráfico N° 2: Aislamiento de Enterobacterias en Relación a su Procedencia.**



También se observó entre las especies aisladas que *Escherichia coli* fue la más representativa con 372(67.4%), seguida por *Escherichia fergusonii* con 61(11.1%), *Klebsiella pneumoniae* con 31(5.62%), *Proteus mirabilis* con 24(4.4%) y otras con menor frecuencia (cuadro N° 4).

**Cuadro N° 4: Distribución de Enterobacterias Aisladas en el HNDAC, julio – diciembre del 2003.**

Tipo de Especie	Masculino	Femenino	Hospitalizado	Ambulatorio	Total
<i>Escherichia coli</i>	80	292	112	260	372
<i>Escherichia fergusonii</i>	11	50	11	50	61
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	17	21	10	31
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	8	8	3	11
<i>Proteus mirabilis</i>	10	14	9	15	24
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	6	6	4	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	1	8	1	9
<i>Citrobacter freundii</i>	8	3	10	1	11
Otros	12	11	10	13	23
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>402</b>	<b>195</b>	<b>357</b>	<b>552</b>

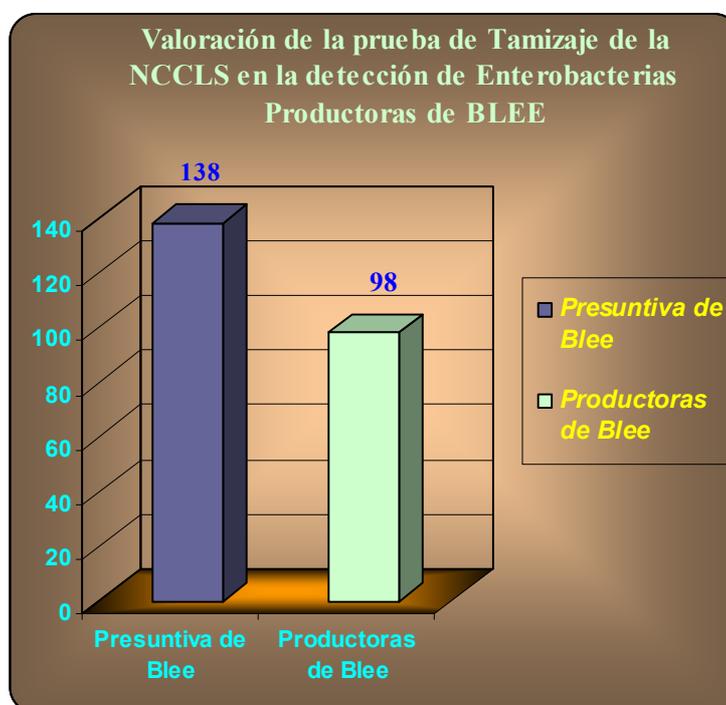
Del total de aislamientos, 138(25%) fueron presuntivas de producir Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), de las cuales el 71%(98) fueron confirmadas mediante el método estandarizado por la NCCLS (Cuadro N° 5) (Gráfico N° 3).

**Cuadro N° 5: Valoración de la Prueba Presuntiva para BLEE (Screening)**

Tipos de Especie	Presuntivas de BLEE	Productoras de BLEE
<i>Escherichia coli</i>	79	62
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	18
<i>Proteus mirabilis</i>	7	5

<b>Escherichia fergusonii</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
<b>Klebsiella oxytoca</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Citrobacter freundii</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
<b>Otros</b>	<b>15</b>	<b>4</b>
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>98</b>

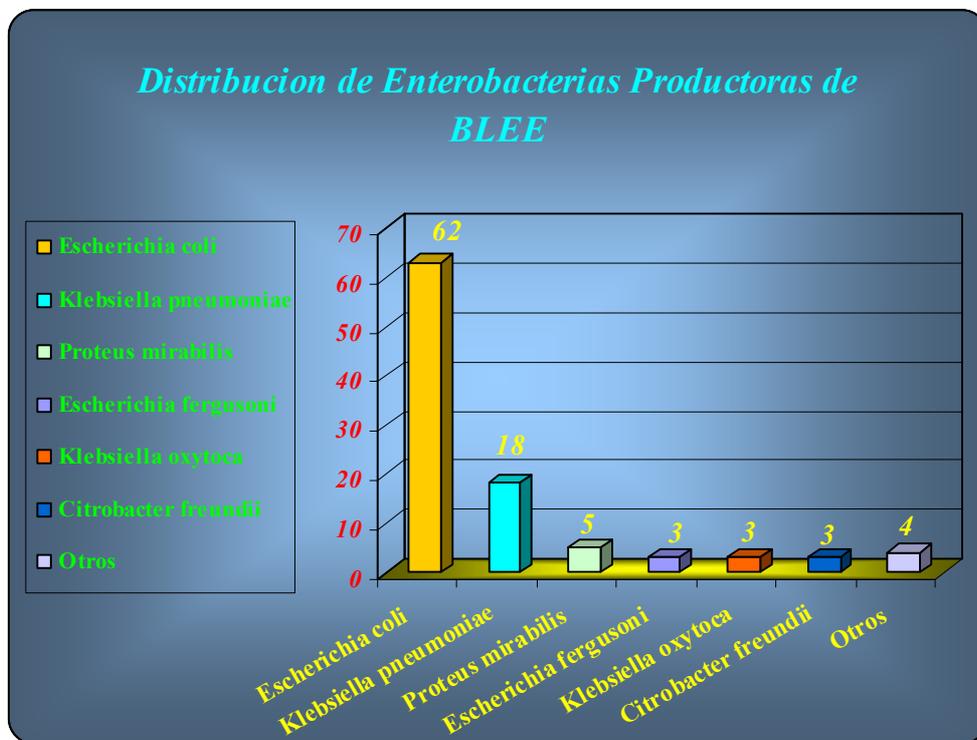
**Gráfico N° 3: Valoración de la Prueba de Screening establecida por la NCCLS.**



La distribución de las 98 enterobacterias que resultaron ser productoras de Blee ubicó en primer lugar a la E coli con 62(63.2%) aislamientos, seguido de K pneumoniae con

18(18.3%), *Proteus mirabilis* con 5(5.1%), *E. fergusonii*, *K. oxytoca* y *Citrobacter freundii* con 3(3.1%) cada uno, y otras especies con 4(4.1%) aislamientos (Gráfico N° 4).

**Gráfico N° 4: Distribución de Enterobacterias Productoras de BLEE**



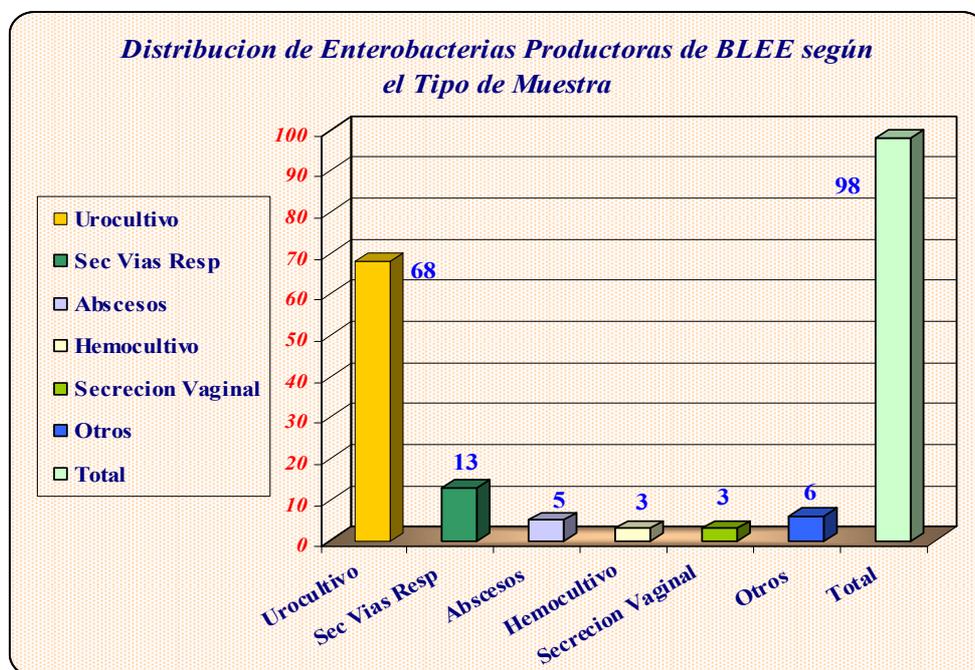
Se pudo establecer que estas cepas productoras de Blee fueron más prevalentes en muestras de orina con 68(69.4%) aislamientos, seguido por secreciones de vías respiratorio con

13(13.3%), abscesos con 5(5.1%), secreción vaginal y hemocultivos con 3(3.1%) cada uno y otros tipos de muestras con 6(6.1%) aislamientos (cuadro N° 6) (Gráfico N° 5).

**Cuadro N° 6: Distribución de Enterobacterias productoras de Blee por Especie según el Tipo de Muestra.**

Tipo de Muestra / Tipo de Especie	Urocultivo	Secr. Vias Respiratorias	Abscesos	Secr. Vaginal	Hemocultivo	Otros	Total Blee
<i>Escherichia coli</i>	45	6	5	2	1	3	62
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	3			2	1	18
<i>Proteus mirabilis</i>	5						5
<i>Escherichia fergusonii</i>	2	1					3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1					2	3
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1					3
Otros	1	2		1			4
<b>Total Blee</b>	<b>68</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>98</b>

**Gráfico N° 5: Distribución de Enterobacterias Productoras de Blee según el Tipo de Muestra.**



De las 62 cepas de *E. coli* 45(72.6%) fueron aisladas en muestras de orina, 5(8.1%) en abscesos, 6(9.7%) en secreción de vías respiratorias y 6(9.7%) en otras muestras; de las 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae* 12(66.7%) fueron aisladas en muestras de orina, 2(11.1%) en hemocultivos, 3(16.7%) en secreción de vías respiratorias. Todas las cepas de *Proteus mirabilis* 5(100%) fueron aisladas en muestras de orina. (cuadro N° 6).

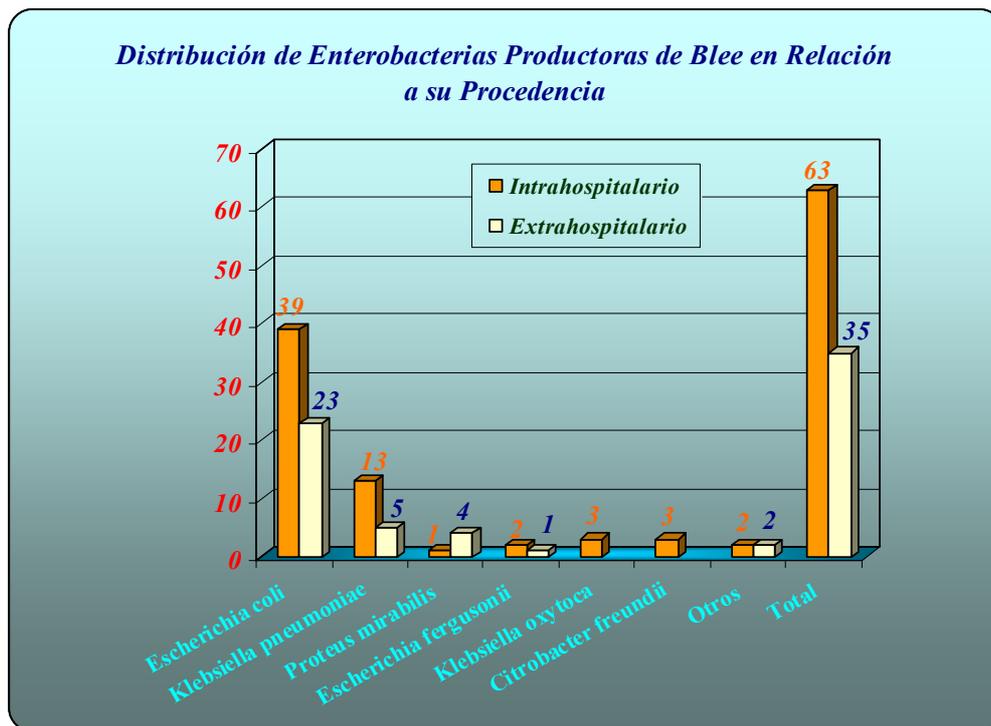
De los aislamientos de enterobacterias productoras de Blee se pudo apreciar que 63(64.3%) provinieron de pacientes intrahospitalarios de los cuales 39(61.9%) fueron *E coli*, 13(20.6%) *Klebsiella pneumoniae*, 3(4.8%) *Citrobacter freundii* y 8(12.7%) otras enterobacterias; y de

los 35(35.7%) extrahospitalarios 23(65.7%) fueron E coli, 5(14.3%) Klebsiella pneumoniae, 4(11.4%) Proteus mirabilis y 3(8.6%) otras enterobacterias (Cuadro N° 7)(Gráfico N° 6).

**Cuadro N° 7: Distribución de Especies de Enterobacterias Productoras de BLEE en Relación a su Procedencia**

<b>Tipo de Especie</b>	<b>Intrahospitalario</b>	<b>Extrahospitalario</b>	<b>Total Blee</b>
<b>Escherichia coli</b>	<b>39</b>	<b>23</b>	<b>62</b>
<b>Klebsiella pneumoniae</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>18</b>
<b>Proteus mirabilis</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Escherichia fergusonii</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Klebsiella oxytoca</b>	<b>3</b>		<b>3</b>
<b>Citrobacter freundii</b>	<b>3</b>		<b>3</b>
<b>Otros</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>Total Blee</b>	<b>63</b>	<b>35</b>	<b>98</b>

**Gráfico N° 6: Distribución de Enterobacterias Productoras de Blee en Relación a su Procedencia según el tipo de Especie.**



También se pudo distinguir mayor prevalencia de estas enterobacterias en pacientes del sexo femenino con 59(60.2%) aislamientos, siendo 44(74.6%) aisladas en muestras de orina, de las cuales el 52.3%(23) fue de procedencia extrahospitalaria y el 47.7%(21) intrahospitalaria, 3(5.1%) en secreciones del vías respiratorias todas de origen intrahospitalario, 3(5.1%) en

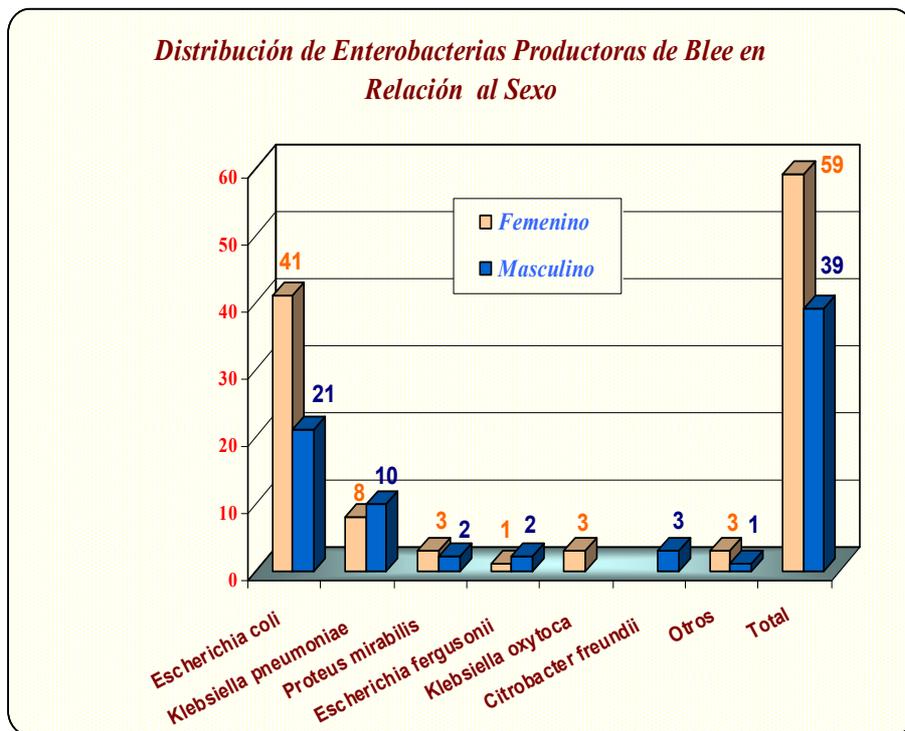
secreción vaginal todas de procedencia extrahospitalaria, 3(5.1%) en abscesos y 6(10.1%) en otras muestras.

Con respecto al sexo masculino de los 39(39.8%) aislamientos 24(61.5%) fueron en muestras de orina, 10(25.7%) en secreciones del vías respiratorias y 5(12.8%) en otras muestras (Cuadro N° 8)(Gráfico N° 7-A y B).

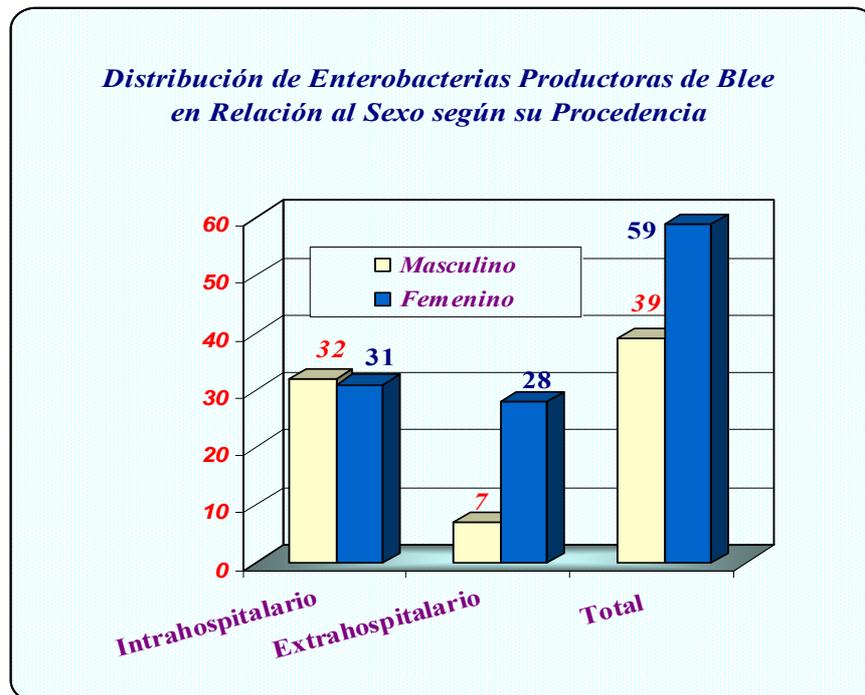
**Cuadro N° 8: Distribución de Enterobacterias Productoras de BLEE En Relación al Sexo y Procedencia.**

Tipo de Especie	Masculino Blee		Femenino Blee	
	Intrahospitalario	Extrahospitalario	Intrahospitalario	Extrahospitalario
Escherichia coli	17	4	22	19
Klebsiella pneumoniae	9	1	4	4
Proteus mirabilis	1	1		3
Escherichia fergusonii	1	1	1	
Citrobacter freundii	3			
Klebsiella oxytoca			3	
Klebsiella ozanae			1	
Klebsiella planticola				1
Enterobacter cloacae	1			
Enterobacter agglomerans				1
<b>Total Blee</b>	<b>32</b>	<b>7</b>	<b>31</b>	<b>28</b>

**Gráfico N° 7-A: Distribución de Enterobacterias Productoras de BLEE en Relación al Sexo según el Tipo de Especie.**



**Grafico N° 7-B: Distribución de Entero bacterias Productoras de BLEE en relación al sexo según su Procedencia.**



La distribución de los aislamientos de las enterobacterias productoras de blee se produjo con mayor frecuencia en dos grupos etáreos, el primero comprendido entre 0 a 9 años que representaron un 25.5%(25), dentro de este, el subgrupo de los recién nacidos (menores a 28 días) con 13.3%(13) (Cuadro N° 10); el segundo grupo estuvo comprendido entre los mayores ó igual a 60 años con un 25 %(25) (Cuadro N° 9)(Gráfico N° 9-A y 9-B).

**Cuadro N° 9: Distribución de Enterobacterias Productoras de BLEE en Relación a su Procedencia y Sexo.**

<b>Grupos Etareos</b>	<b>Ambulatorio</b>	<b>Hospitalizados</b>	<b>Masculino</b>	<b>Femenino</b>	<b>Total Blee</b>
<b>[ 0 - 9 ]</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>25</b>
<b>[ 10 - 19 ]</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>
<b>[ 20 - 29 ]</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>11</b>
<b>[ 30 - 39 ]</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>9</b>
<b>[ 40 - 49 ]</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>9</b>
<b>[ 50 - 59 ]</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>12</b>
<b>[ &gt; 60 ]</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>25</b>
<b>Total Blee</b>	<b>35</b>	<b>63</b>	<b>39</b>	<b>59</b>	<b>98</b>

**Grafico N° 9-A: Distribución de Enterobacterias Productoras de BLEE por Grupos Etáreos.**

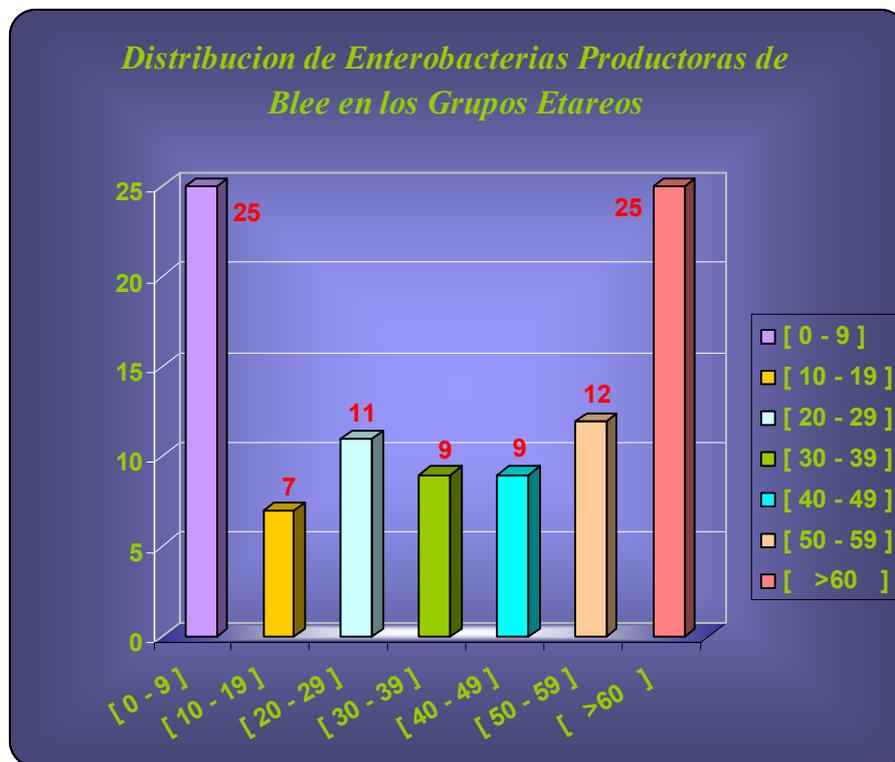
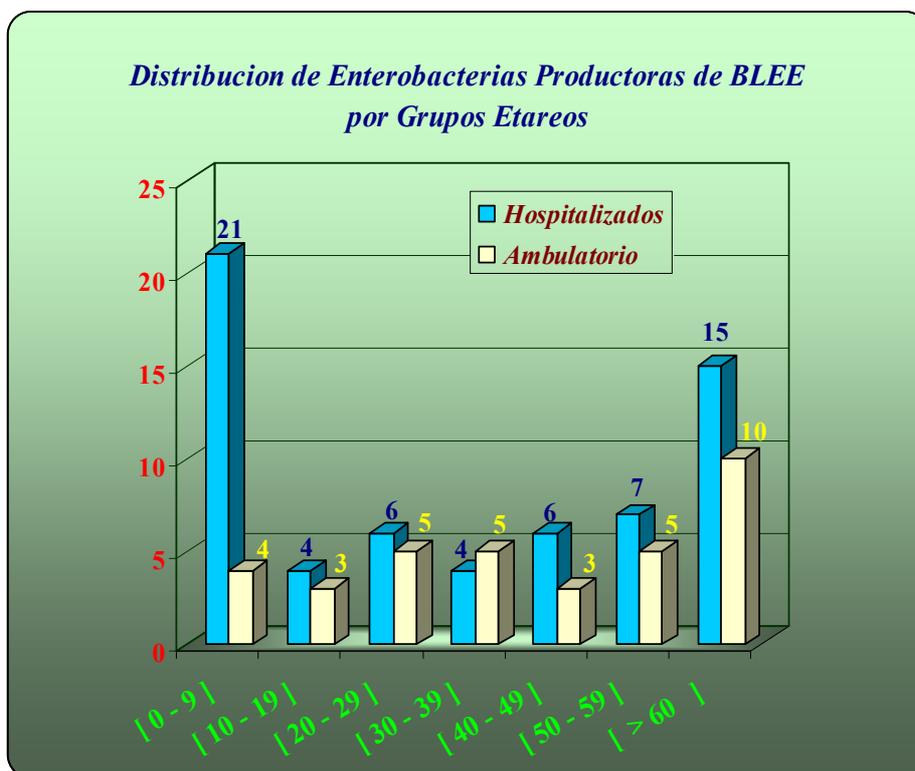


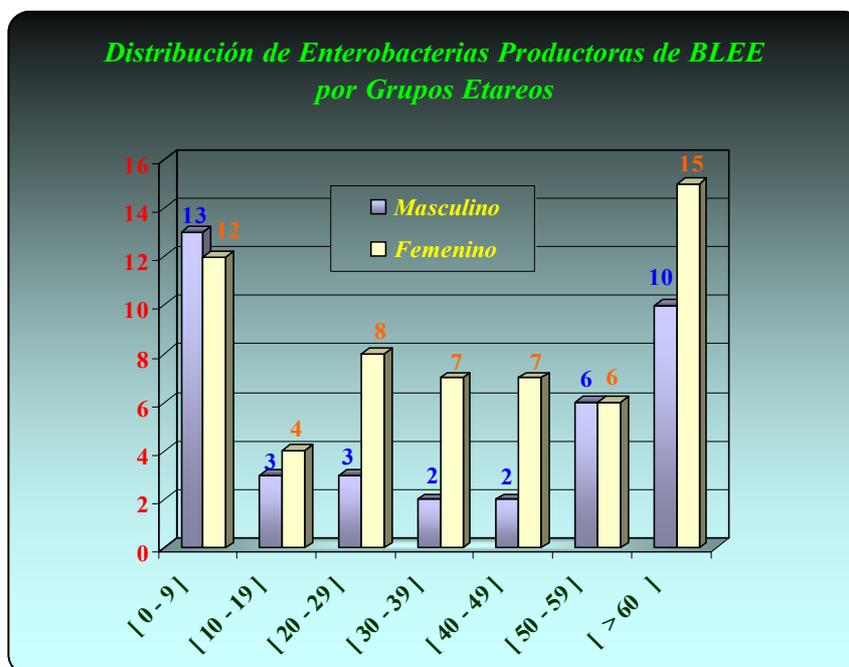
Grafico N° 9-B: Distribución de Enterobacterias Productoras de BLEE por Grupos Etáreos.



**Cuadro N° 10: Distribución de Enterobacterias productoras de Blee por Especie según el tipo de Muestra en Recién Nacidos.**

Tipo de Muestra / Tipo de Especie	Urocultivo	Secreción Endotraqueal	Hemocultivo	Total Blee
E coli	5	4		9
E fergusonii		1		1
K pneumoniae		1	1	2
K ozanae		1		1
<b>Total Blee</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>13</b>

**Grafico N° 11: Distribución de Enterobacterias Productoras de BLEE por Grupos Etáreos.**



En ambos grupos E coli se aisló con mayor frecuencia en 15 y 16 oportunidades, seguido por K pneumoniae con 8 y 5 aislamientos respectivamente. Cabe destacar que todas las muestras con aislamientos Blee positivos de secreción endotraqueal (7) correspondieron a recién nacidos (menores de 28 días) (Cuadro N° 11).

**Cuadro N° 11: Enterobacterias Productoras de BLEE Distribuidas por Grupos Etáreos:**

Gupos Etareos	Escherichia coli	Klebsiella pneumoniae	Proteus mirabilis	Escherichia fergusonii	Klebsiella oxytoca	Citrobacter freundii	Otros	Total Blee
[ 0 - 9 ]	15	8		1			1	25
[ 10 - 19 ]	5	1			1			7
[ 20 - 29 ]	4	3	2		1	1		11
[ 30 - 39 ]	7						2	9
[ 40 - 49 ]	6	1	1		1			9
[ 50 - 59 ]	9			1		1	1	12
[ > 60 ]	16	5	2	1		1		25
<b>Total Blee</b>	<b>62</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>98</b>

Del total de enterobacterias aisladas, se pudo establecer la incidencia de cepas productoras de Blee para cada especie, resultando que para E. coli el 16.7%(62/372) producían Blee, para K.

pneumoniae el 58.1%(18/31), para *Proteus mirabilis* el 20.8% (5/24), para *Escherichia fergusonii* el 4.9% (3/61), para *K oxytoca* el 27.3%(3/11), para *Citrobacter freundii* el 27.3%(3/11) entre las más representativas (Cuadro N° 12).

**Cuadro N° 12: Incidencia de Enterobacterias Productoras de BLEE.**

Tipo de Especie	Total Aislamientos	Incidencia de Blee
<i>Escherichia coli</i>	372	62 (16.7%)
<i>Escherichia fergusonii</i>	61	3 (4.9%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	18 (58.1%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	11	3 (27.2%)
<i>Klebsiella ozanae</i>	7	1 (14.2%)
<i>Klebsiella planticola</i>	2	1 (50.0%)
<i>Proteus mirabilis</i>	24	5 (20.8%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	1 (11.1%)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	5	1 (20.0%)
<i>Citrobacter freundii</i>	11	3 (27.3%)

## **V. DISCUSIÓN**

Las infecciones representan en la actualidad un importante problema de salud pública por su morbimortalidad y por las implicaciones económicas que suponen para el sistema sanitario (24,36).

A inicios de la década de los 80, se detectaron en Europa, cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (C3G) como Cefotaxima, Ceftazidima, y Ceftriaxona así como a Aztreonam (Az), esta resistencia se debía a la producción de enzimas que hidrolizan antibióticos Betalactámicos (betalactamasas) derivadas por mutación en los sitios activos de TEM – 1, TEM – 2 Y SHV – 1, siendo denominadas betalactamasas de espectro extendido ( BLEE ).(29,36,51).

En el presente estudio realizado en el servicio de Microbiología del Hospital Nacional Daniel A. Carrión entre Julio – Diciembre 2003; se encontró un total de 552 cepas de enterobacterias aisladas de diferentes muestras clínicas, se encontró que 457 ( 82.8 % ) de estos aislamientos procedían de urocultivos, cifra similar a lo encontrado en otros estudios como el de J. Rodríguez Baño (realizado en el Hospital Universitario Virgen Macarena)(42), el Proyecto GEIH – BLEE 2000 ( realizado en Hospitales Españoles )(38).

En relación a la procedencia de las muestras, encontramos que el mayor porcentaje 64.7%(357) procedían de pacientes extrahospitalarios, de los cuales 92.2%(329) procedían de Urocultivos, sin embargo, aunque las muestras procedentes de pacientes hospitalizados fue menor 128 muestras (65.6%), se observó que el mayor porcentaje de los aislamientos Blee positivo también provenían de Urocultivos, datos parecidos a los encontrados por otros autores (38,39, 40).

Luego de seleccionar todas las cepas (138 mx.) presuntivas de ser portadoras de BLEE, se procedió a confirmarlas. Para ello la NCCLS recomendó en el año 2000(40) que la confirmación de la presencia de BLEE debía realizarse mediante la técnica de difusión del doble disco, la cual fue estandarizada para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* (28,36,37,38,39,40,45,46).

Este método fue inicialmente propuesto por M'Zali y cols, (37,46) y es un método simple y fácil de interpretar.

Otro método también empleado para la confirmación de BLEE es el TEST DE SINERGIA, el cual se da entre un disco de cefotaxima y otro con la combinación de Amoxicilina (20 ug) y clavulonato (10ug) (CAM), método propuesto por Jarlier et. Al (40,45,46).

Todos estos procesos tienen sus limitaciones, así por ejemplo, a pesar de que el Test de sinergia técnicamente es fácil, depende de la lectura subjetiva de las interacciones entre las zonas de inhibición, además puede perder su sensibilidad por un problema de espaciamientos de los discos( 28,36,37,40).

Desafortunadamente con la mayoría de los test de sensibilidad el patrón esperado para las cepas portadoras de BLEE, pueden ser modificados por la acción de los diversos mecanismos de estas enterobacterias.

Después de una primera selección en función del patrón de resistencia por la técnica de difusión, en donde se encontraron 138 cepas presuntas BLEE POSITIVAS, se confirmó que el

71% (98 cepas) de ellas fueron positivas de ser enterobacterias productoras de BLEE. Este resultado es similar a lo obtenido en un estudio realizado en USA (39), donde aislaron 84.2% enterobacterias BLEE POSITIVAS, así como al estudio realizado por el proyecto GEIH – BLEE 2000 en España (38) donde se identificaron como BLEE POSITIVAS en 68.2%, en otro estudio realizado en el centro Medico de Tel Aviv (Israel)(49) por Yehuda Carmeli y col. donde se encontró solo un 42.5% de cepas positivas para BLEE. Esto nos indica que la existencia de enterobacterias BLEE POSITIVAS es un Problema de Nivel Mundial, por lo cual se debe tomar las medidas necesarias para su detección, prevención y control.

Sólo 62 aislamientos de *Escherichia coli* fueron positivas para BLEE, es decir el 78.5% del total de las *Escherichia coli* presuntivas de BLEE fueron BLEE POSITIVAS. Sin embargo en relación a *Klebsiella pneumoniae* se aisló 20 cepas presuntas productoras de BLEE, de las cuales 18 cepas resultaron ser BLEE POSITIVAS, por lo tanto podemos decir que el 90 % de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* presuntas de ser BLEE, fueron BLEE POSITIVAS. Esto es importante debido a que se observa que la *Escherichia coli* es la enterobacteria que se aísla en términos absolutos con mayor frecuencia, pero la *Klebsiella pneumoniae* es la especie que presenta el mayor porcentaje de enzimas productoras de BLEE. Estas características coinciden con otros estudios como el de la Vigilancia en Latinoamérica (Proyecto Sentry)(36) donde se reportó que la frecuencia de BLEE obtenidas en cepas de Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México y Uruguay fue de 41.8% (136 / 325 ) en *Klebsiella pneumoniae* y de 10.3% (64 / 620) en *Escherichia coli* .A(4)., en el Proyecto GEIH – BLEE 2000 ( 38 ) con un 68.2% de cepas BLEE positivas, en un estudio realizado en Korea por R. Okamoto y col.(47) se obtuvo 44.5% (114/256) para *E. coli* y 50.5% (55/109) para *Klebsiella pneumoniae*.

Entonces las especies más frecuentemente productoras de BLEE, según la literatura son *Escherichia coli* y con mayor frecuencia *Klebsiella pneumoniae* (36,38,49). Sin embargo también podemos observar un incremento en el aislamiento de otras especies de enterobacterias así como lo demuestran otros estudios.

Así como la NCCLS recomienda hacerles una confirmación de BLEE para *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, también lo hace para *Klebsiella oxytoca*, tomando en cuenta esta normativa, en nuestro trabajo aislamos tres cepas de *Klebsiella oxytoca* presuntas de ser BLEE, de las cuales todas resultaron ser BLEE POSITIVAS, es decir que a pesar de que la frecuencia con que se aísla esta enterobacteria de muestras clínicas es baja, debemos tener en cuenta la alta prevalencia que presenta la misma de ser una enterobacteria productora de BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).

Además observamos la aparición de estas enzimas en otras especies bacterianas como: *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia fergusonii* (29,57).

Estos resultados ponen en evidencia una tendencia creciente en la frecuencia y variedad de cepas con este tipo de mecanismos de resistencia, en la población a la cual sirve el hospital Nacional Daniel A. Carrión.

Estas nuevas especies productoras de BLEE también han sido detectadas en estudios como Palucha y cols. (56), en un estudio realizado en el hospital Praski de Varsovia, donde señalan un valor elevado (16 %) para la frecuencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 16 % en

Citrobacter freundii y 32 % en Serratia Marcensces, en esta última especie, nosotros no aislamos ninguna BLEE. En Francia también hallaron una prevalencia de Enterobacter aerogenes del 52.9% (29). Por ejemplo, en un estudio en México se comunicó la presencia de cepas productoras de BLEE en Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli y **Enterobacter cloacae** (57).

Una notable excepción es Proteus mirabilis, como se observa en este estudio, en el cual se aisló 7 cepas presuntas de ser BLEE, de las cuales 71.4% fue BLEE POSITIVO, generando datos comparables a los hallados en Israel (49) en donde se encontró una frecuencia aproximada del 35 % cifra cercana al porcentaje encontrado por Klebsiella pneumoniae BLEE POSITIVO en este estudio.

Esta tendencia al incremento de la frecuencia de cepas de enterobacterias productoras de BLEE, coincide con lo observado en otras partes del mundo. También vemos que la prevalencia de BLEE depende del género bacteriano y depende de diferentes factores, entre ellos la región geográfica, tipo de hospital, tiempo de estudio (29, 36, 49).

Del total de enterobacterias BLEE POSITIVAS (98 cepas), un 69.4% (68 cepas) fueron aisladas de Urocultivos, 13.3% (13 cepas) de tracto respiratorio, 5.1% (5 cepas) y otros tipos de muestras entre 1.0 – 3.1 %. En otros trabajos descritos en la literatura acerca de BLEE, las cepas procedían con mayor frecuencia de orina (cerca del 50 – 60 % de las cepas) (36, 38), también de sangre (alrededor del 15 %) seguido de pus y heridas, datos contradictorios al encontrado en nuestro trabajo ya que sólo un 3.1 % de los hemocultivos fue positivo a BLEE,

y por el contrario las enterobacterias productoras de BLEE aisladas de pus tuvieron una mayor frecuencia con un 5.1%.

Además las ITU son la infecciones bacterianas mas frecuentes y la *Escherichia coli* es el entero patógeno mas frecuentemente encontrado (39, 44, 49) en las ITUs en todo el mundo, pero también el patógeno nosocomial más común.

Con respecto al sexo el 57.8% de las muestras procedían de pacientes mujeres (59) y 42.2 % eran de pacientes varones (39), la diferencia encontrada no es muy significativa, sin embargo también podemos observar que la mayoría de estos aislamientos procedían de pacientes hospitalizados tanto para varones como para mujeres con 32 y 31 aislamientos respectivamente.

En varones se detectó que 24 de sus muestras procedían de Urocultivos siendo 19 de ellas procedentes de pacientes hospitalizados y en las mujeres se observó que 44 de sus muestras procedían de Urocultivos, de las cuales 21 eran de pacientes hospitalizados y 23 muestras de pacientes ambulatorios. En estos casos observamos que las mujeres no presentan una diferencia significativa entre muestras procedentes de pacientes hospitalizados de aquellas que procedían de pacientes ambulatorios, a diferencia de los varones en los cuales el mayor aislamiento procedía de pacientes hospitalizados (19 muestras) frente a 5 muestras procedentes de pacientes ambulatorios. Esto nos indica que la mayor infección se da a nivel del tracto urinario por lo que las mujeres son las más predeterminadas para contraer dicha infección.

Es un hecho que se está produciendo un envejecimiento progresivo de la población y de allí el mayor número de patologías observables en este grupo. Según estadísticas de la Naciones Unidas entre los años 1950 – 2025 la población mundial se duplicará, mientras que el número de personas mayores de 60 años se multiplicará por 5.

Con la edad hay modificaciones involutivas de los órganos, alteraciones del sistema inmune con disminución de las funciones de los linfocitos T y de la inmunidad celular, por lo que las infecciones son más frecuentes en estos grupos etáreos (0 – 9 años) y (60 - > 70 años), son más insidiosas y se complican con la presencia de otras enfermedades, así como también por problemas nutricionales. De la misma forma en esta tesis las cepas portadoras de BLEE fueron aisladas en su gran mayoría de pacientes con grupos etáreos extremos es decir de 0 – 9 años con 25 (25.5%) aislamientos BLEE POSITIVA, de los cuales en 15 se aisló *Escherichia coli*, en 8 *Klebsiella pneumoniae* y 2 aislamientos de otras especies. Y en pacientes con edades mayores o iguales a 60 años, donde también tuvimos un total de 25 aislamientos BLEE POSITIVOS.

Al relacionar el tipo de especie aislada con la procedencia de la muestra, encontramos que en 62 muestras (63.3%) se aisló *Escherichia coli*, siendo 39 de ellas procedentes de pacientes hospitalizados y 23 procedentes de pacientes ambulatorios. Es decir *Escherichia coli* es la enterobacteria que fue aislada con mayor frecuencia de muestras procedentes de pacientes hospitalizados. Datos que difieren con otros estudios como el Proyecto GEIH – BLEE (38) donde el 51 % de *Escherichia coli* productores de BLEE son de origen extrahospitalario, así como en el estudio SENTRY (36) y el estudio realizado por Carmen Peña en España.

En tanto que *Klebsiella pneumoniae* fue aislado en 18.3%, 18 muestras del total de BLEE POSITIVAS (98), de las cuales 13 muestras (72.2%) procedían de pacientes hospitalizados y sólo 5 muestras (27.8 %) eran de pacientes ambulatorios, por lo tanto podemos decir que en nuestro trabajo al igual que en otros (1, 8, 12), *Klebsiella pneumoniae* es la enterobacteria que se aísla frecuentemente de muestras procedentes de origen intrahospitalario.

Se tomó en cuenta por el objetivo del trabajo de Investigación, el porcentaje de incidencia de las enterobacterias productoras de BLEE, las cuales presentan porcentajes altos en comparación con otros trabajos (40,45). Por ejemplo, en nuestro trabajo la incidencia de *Escherichia coli* fue de 16.7% siendo mayor a la presentada por estudios Españoles donde su incidencia iba de 3.1% a 9.5% (41), la incidencia de *Klebsiella pneumoniae* fue de 58.1%, datos comparables a los estudios GEIH-BLEE, donde se obtuvo un 53% pero fueron mayores a los obtenidos en el proyecto Sentry para América Latina (39).

Así también se pudo observar el incremento en el aislamiento de cepas de *Proteus mirabilis* BLEE positivas, la cual presentó una incidencia de 20.8%.

## **VI CONCLUSIONES**

El presente estudio realizado en el Hospital Nacional Daniel A. Carrión (HNDAC), diseñado para detectar de manera temprana enterobacterias que producen Betalactamasas de Espectro Extendido(BLEE), julio – diciembre del 2003; pudo establecer que:

1. Las enterobacterias productoras de BLEE aisladas en muestras clínicas del HNDAC tuvieron una incidencia del 17.8%(98/552) en relación al total de enterobacterias aisladas.
2. De las enterobacterias que produjeron BLEE, las especies con mayor frecuencia aisladas fueron *E. coli* con 63.3% y *Klebsiella pneumoniae* con 18.4%, aislándose mayormente en muestras de procedencia Intrahospitalarias y de pacientes del sexo femenino.
3. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* tuvieron mayor incidencia entre aquellas enterobacterias que produjeron Blee, resultando que un 58.1% de su total producían este tipo de Betalactamasas; seguidos por otras especies como *Citrobacter freundii* con 27.3%, *Proteus mirabilis* con 20.8% y *E coli* con 16.7%.
4. Existe mayor prevalencia de estos tipos de aislamientos en muestras de orina con un 69.4%, y vías respiratorias con un 13.3%.

5. Los grupos etáreos más afectados por este tipo de enterobacteria fueron aquellos comprendidas entre 0 – 9 años y aquellos  $\geq$  a 60 años, con una distribución del 25% cada uno.
  
6. Debemos recordar que de las cepas presuntas BLEE, se encontró que en *Klebsiella pneumoniae* el 90 % de ellas fueron BLEE positivas, en *Escherichia coli* el 78.5% fueron BLEE positivas, lo que nos hace observar que a pesar de que es menor la frecuencia con la que se aísla *Klebsiella pneumoniae* tiene mayor probabilidad de ser BLEE positiva.

**VI. RECOMENDACIONES**

En los hospitales e instituciones con cepas bacterianas productoras de BLEE, las principales medidas para reducir su presencia son la limitación del uso de cefalosporinas, especialmente de tercera generación, y de fluoroquinolonas, junto con medidas universales de control para evitar la transmisión de unas personas a otras.

Son necesarias varias actuaciones para tratar de resolver la amenaza de las BLEE, tales como determinar la amplitud del problema, investigar la tendencia de las cepas resistentes y su distribución geográfica, establecer la asociación con brotes epidémicos, la detección adecuada de las resistencias en el laboratorio, la prevención habitual de las infecciones nosocomiales, concientizar a los médicos acerca del problema, la prescripción adecuada de los antibióticos en general (tipo, vía, dosis, intervalo de administración), especialmente en las unidades críticas y de larga estancia, consultar guías orientadoras y consensos de tratamiento, el seguimiento de una política de antibióticos (formularios del hospital, rotaciones, terapia combinada, terapia secuencial, etc.), tratamientos específicos por área y, en general, educación sanitaria.

Debemos recordar que hay cepas productoras de BLEE que pueden parecer sensibles a los oximino  $\beta$ -lactámicos, siendo en realidad resistentes. No es infrecuente que preliminarmente se informe un aislamiento de una enterobacteria como sensible a cefalosporinas de tercera generación y aztreonam y que posteriormente, por pruebas adicionales o ante un fracaso clínico, se constate que se trata de una cepa BLEE (+), por eso ante el aislamiento de una cepa Gram negativa con un halo de inhibición difuso (intermedios o con sensibilidad disminuida) o con hallazgo de multiresistencia en la prueba de susceptibilidad, es prioritario descartar la

presencia de BLEE, para lo cual se debe proceder a la realización del test de confirmación propuesto por la NCCLS, en el cual se emplean inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

Una vez detectada la presencia de BLEE, se debe informar como resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas) y aztreonam, a pesar de que en el antibiograma salga sensible a ellas.

## GLOSARIO

- **Antibiograma:** Prueba bacteriológica para establecer la sensibilidad a diversos antibióticos.
- **Bacteriemias:** Proceso infeccioso de origen bacteriano que involucra al sistema circulatorio sanguíneo.
- **Bacteriófago:** (del griego bakterion = pequeño bastón; phagein = comer): Literalmente "comebacterias". Virus cuyo huésped natural es una bacteria. Virus parásito de células bacterianas.
- **Betalactamasas:** Grupo de enzimas que hidrolizan la estructura amida cíclica de la penicilina G, que se encuentran presentes en un gran número de bacterias.
- **BLEE:** Betalactamasas de Espectro Extendido.
- **BGN:** Bacilos Gram Negativos, bacterias de forma bacilar que ante la tinción Gram no captan el colorante cristal violeta.
- **Enterobacterias:** Conjunto de bacterias que se aíslan principalmente del tracto gastrointestinal.
- **Hidrólisis:** Proceso enzimático que ocasiona catabolismo de moléculas, con la liberación de agua.
- **Intrón:** La secuencia de bases de ADN que interrumpe la secuencia de un gen que codifica para una proteína, esta secuencia se transcribe al mRNA pero en un proceso de "corte y empalme" se separa del mismo antes que el mRNA sea traducido a proteína.

- **Plásmidos:** Segmento de ADN extracromosómico de cadena circular. Son pequeñas moléculas de ADN circular de 1 kb a 200 kb que se pueden encontrar en las bacterias. Los plásmidos se replican y se transmiten independientemente del cromosoma bacteriano. La replicación y la transcripción de los plásmidos dependen de las proteínas de su hospedero, pueden donar resistencia a antibióticos, producir antibióticos, degradar compuestos complejos, producir colicinas, enterotoxinas, enzimas de restricción y de modificación.
- **Proteínas fijadoras de penicilina:** proteínas enzimáticas que catalizan las reacciones de transpeptidación y carboxipeptidación durante la síntesis del peptidoglicano, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, es decir están encargadas de la síntesis de la pared bacteriana.
- **Prueba de Screening:** Prueba de tamizaje, que permite seleccionar a los posibles candidatos en un plan de estudio.
- **Sinergismo:** Fenómeno de superposición de los halos de inhibición entre dos antibióticos.
- **Transposones:** son fragmentos de ADN incorporados en el ADN cromosómico. Tienen la particularidad de que son capaces de saltar de un lado a otro del [genoma](#) durante la recombinación genética que tiene lugar durante la división celular. Se ha demostrado que una de cada diez veces que esto ocurre, el transposón modifica el [ADN](#) de sus inmediaciones, ya sea arrastrando un [gen](#) codificador de un [cromosoma](#) a otro, rompiéndolo por la mitad o haciendo que desaparezca del todo.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1: Brenner D.J. Enterobacteriaceae. En: Krieg N.R., Holt J.G., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1984; 408-516.

2: Konem E. Allen S. Dowell V, Fanda W. W. Sommers H. Wineb W. *Diagnóstico Microbiológico*, 3a Edición, Argentina, Editorial Médica Panamericana S.A. 1991 pp. : 591-594.

3: Farmer III, J.J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification, En: Murray, P, Baron, E., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 7ª Ed. ASM, Washington DC, 1999; 442-458.

4: Prats, G., Mirelis, B. Enterobacteriaceae. En: Perea, E. J. eds. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Doyma, Barcelona, 1992; 624-646.

5: Prats, G. Flora normal y microorganismos patógenos en ginecología y obstetricia. En: Cabero, L. ed. *Patología infecciosa en ginecología y obstetricia*. Hoechst Marion Roussel, Barcelona, 1999; 1-20.

6: Sancho, J. Epidemiología y etiología quirúrgica de las complicaciones infecciosas postoperatorias. En: Álvarez, F. ed. *Complicaciones infecciosas en el postoperatorio de cirugía abdominal*. Ergon, S.A., Madrid, 2000, 3-20.

7: Prats, G, Mirelis, B. Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. Escherichia coli. En: García – Rodríguez, J. y Picazo, J. eds. Microbiología Médica. Mosby/Doyma S.A., Madrid, 1996; 223-238.

8: Bopp, C., Brenner, F., Wells, J., Strockbine, N. Escherichia, Shigella, and Salmonella En: Murray, P., Jo baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., Yolken, R., eds. Manual of Clinical Microbiology, 7ª Ed. ASM, Washington DC; 1999: 459-474.

9: Hooton, T. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. J. Antimicrob Chemother 2000; 46 (Suppl. 1): 1-7.

10: Navarro F, Miro E. Mirelis B. . Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enfermedades Infecciosas Microbiológica Clínica 2002; 20: 225 – 34.

11: Pritout, J., Sanders, C., Sanders, E. Antimicrobial resistance with focus on  $\beta$ -lactam resistance in gram –negative bacilli. Am J. Med 1997; 103:51-59.

13: Mensa, J., Gatell, J., Jiménez de Anta, M., Prats, G. Guía terapéutica antimicrobiana. 10ª Ed. Masson S.A., Barcelona, 2000.

14: Livermore, D., Williams, J.  $\beta$ -lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. En: Lorian, V. ed. Antibiotics in laboratory medicine. 4<sup>a</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1996; 502 – 578.

15: García de Loma, J., Navarro, D., Gimeno, C. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. En: García Sánchez, J., López, R. y Prieto, J. eds., Antimicrobianos en medicina. Prous Science, Barcelona, 1999; 19-28.

16: García, J., Fresnadillo, M., Arce, J., García E. Antibióticos betalactámicos. En: García Sánchez, J.; López, R., Prieto, J. eds., Antimicrobianos. Prous Science, Barcelona, 1999; 213 – 226.

17: Dr. Zamora Marín R, Dr. Areu Regateiro A, Dr. Guardián, Dr. Manresa R, Dra. Julieta Sánchez y Morales Sirgado R. Cefalosporinas. Acta Médica 1998; 8 (1); 40 – 7.

18: Davis, B. Quimioterapia. En: Davis, B.; Dulbecco, R.; Eisen, H., Ginsberg, H. eds. Tratado de Microbiología. 4<sup>a</sup> Ed. Masson S.A., Barcolna, 1996; 193 – 219.

19: Livermore, D.  $\beta$ -lactamases mediated resistance and opportunities for its control. J. Antimicrob Chemother 1998; 41 (Suppl. D): 25-41.

20: Dra. Lillian Cordiés Jackson, Dr. Looney Andrés Machado Reyes y Dra. María Lillian Hamilton Cordies. Principios generales de la Terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica* 1998; 8 (1): 13 – 27.

21: Livermore, D.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.

22: Moellering, R., Jr. Meeting the challenges of  $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob Chemother* 1993; 31 (Suppl A): 1-8.

23: Sawai, T., Mitsushashi, S., Yamagishi, S. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of  $\beta$ -lactamases in gram – negative rod bacteria resistant to alpha – aminobenzylpenicillin. *Jpn J Microbiol* 1968; 12: 423 – 434.

24. *Edgar Cruz Garcia, Ma. Guadalupe Miranda Novales*. Perdiendo la batalla: resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEES) y estrategias de control. [Enfermedades Infecciosas y Microbiología 2005 Volumen 25, Numero 1, enero-marzo.](#)

25: Bush, K. Classification of  $\beta$ -lactamases: group 1, 2a, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemoter* 1989; 33: 264 – 70.

26: Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.

27: Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ¿Ejercicio intelectual o necesidad clínica?. *Enfermedades infecciosas Microbiológicas Clínica* 2002; 20: 176-86.

28: Rayo Morfín Otero, Eduardo Rodríguez Noriega. Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido: su importancia como patógenos nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas* 1999; 19 (3): 116 – 32.

30: Sanders, C., Laconis, J., Bodey, G., Samonis, G. Resistance to ticarcillinpotassium clavulanate among clinical isolates of the family Enterobacteriaceae: role of PSE-1  $\beta$ -lactamase and high levels of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1365-1369.

31: Miró, E., del Cuerpo, M., Navarro, F., Sebaté, M., Mirelis, B., Prats, G. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolate with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J. Antimicrob Chemother* 1998; 42:535-538.

32: Wu, S., Dornbusch, K., Kronvall, G., Norgren, M. Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY – type  $\beta$ -lactamase: confirmation that the plasmid mediated cephamycinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1350 – 1357.

33: Jacoby, G., Bush, K. (2000) Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended – spectrum and inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases. Internet: <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.

34: Sabaté, M., Tarragó, R., Miró, E., Vergés, C., Navarro, F., Barbe, J., Prats, G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime – hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1970 – 1973.

35: Oteo F. Ignacio F. ¿Qué de nuevo en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos?. *Enfermedades infecciosas Microbiológicas Clínica* 2002;20: 28-33.

36: Pujol M. Peña C. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínica* 2003; 21; 69-71.

37: Alpuche Aranda C, Danza Timana C. Infecciones Nosocomiales por bacterias Gram Negativas resistentes a Cefalosporinas de espectro extendido: asociados de dos peligrosos enemigos . *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas* 2002; 22(4): 192 – 199.

38: Ramón J. Pascual A, Cantón R, Martínez L, GEIH . *Escherichia coli* y *Klebsilla pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH – BLEE 2000). *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínica* 2003 21:77-82.

39: Steward D. Christine, Kamile Raheed J, Hubert K Susannah, Biddle W. James, Raney M. Patty, Anderson J. Gregory, Williams P. Portía, Brittain L. Kelley, Oliver Antonio, Mc. Gowan E. John, and Tenover C. Fred. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 Laboratories Using the National Committee for Clinical laboratory standards Extended - Spectrum  $\beta$  – Lactamase Detection Methods. *Journal Of Clinical Microbiology*, August 2001; 39; (8): 2864 – 2872.

40: Zemelman Raúl, Valenzuela G. Lissette, Dominguez Y. Mariana, Bello T. Helia, Gonzales R. Gerardo y Zemelman M. Claudia Detección de  $\beta$ - Lactamasa de espectro extendido en el laboratorio de Microbiología. *Rev. Chil. Infect.* 2003; 19 (2): S 92 – 95.

41: Lebessi E., Della grammatics H, T Tassios P, Tzowelekio L.S, Joannidou S. Foustoukou M. And Legakis N. Extended - Spectrum  $\beta$ - Lactamase- Producing *Klebsilla Pneumoniae*

in a Neonatal Intensive Care Unit in the High Prevalence Area of Athens, Greece. *Journal Of Clinical Microbiology*, March 2002; 40(3): 799-804.

42: Romero L., Pascual A., Martínez, Hernández J.R., Navarro M.D. y Rodríguez Baño J. Relación Clonal y demografía de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el período 1995 – 2001 en el Área Norte de Sevilla.

43: M' Zali, F., Chanawong, A., Kerr, K., Birkenhead, D., Hawkey, P. Detection of extended – spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the E- test ESBL. *J. Antimicrob Chemother* 2000; 45:881-885.

44: Carter W. Michael, Oakton J. Karen, Warner Marina, and Livermore M. David. Detection of Extended – Spectrum  $\beta$ - Lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method, November 2000; 38 (11): 4228 – 4232.

45: Evaluation of Stability of Cefotaxime (30- ug) and Ceftazidime (30 - ug) Disks Impregnated with with Clavulanic Acid (10 ug) for Detection of Extended – Spectrum  $\beta$ - Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2000; 38 (7): 2796-2797.



51. Beatriz Sánchez Artola. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Revista Electrónica de Medicina Intensiva. Artículo nº C6. Vol 4 nº 8, agosto 2004.

52 Linares-Rodríguez JF, Martínez-Menéndez JL. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:86-93.

53 Muñoz JL, García-Rodríguez JA .Detección de mecanismos de resistencia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:72-4.

54 Fernández Riverón F, López Hernández J, Ponce Martínez LM, Machado Betarte C. Resistencia bacteriana. Rev Cubana Med Milit 2003;32(1).

55. Dr. Jaime Forero Gómez. Beta lactamasas de espectro extendido en pediatría . pediatría Organo oficial de la sociedad colombiana de pediatría 2002. volumen 37 N 4.

56.Palucha A, Mikiewics W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 489-499.

57. Silva, J., Aguilar, C., Becerra, Z., Lopez-Antunano, Garcia R. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of enterobacteria in Mexico. *Microb Drug Resist* 1999; 5:189-193.

## **ANEXOS**

**Cuadro N° 1: Enterobacterias Aisladas en el HNDAC, Julio – diciembre del 2003.**

Tipo de Especie	Masculino	Femenino	Intrahospitalario	Extrahospitalario	Total
<i>Escherichia coli</i>	80	292	112	260	372
<i>Escherichia fergusonii</i>	11	50	11	50	61
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	17	21	10	31
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	8	8	3	11
<i>Klebsiella ozanae</i>	3	4	4	3	7
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	1		2	2
<i>Klebsiella planticola</i>		2		2	2
<i>Proteus mirabilis</i>	10	14	9	15	24
<i>Proteus vulgaris</i>	1	2	1	2	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	6	6	4	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	1	8	1	9
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	2	3	2	5
<i>Citrobacter freundii</i>	8	3	10	1	11
<i>Citrobacter diversus</i>	1		1		1
<i>Morganella morganii</i>	1			1	1
<i>Salmonella tiphy</i>	2		1	1	2
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>402</b>	<b>195</b>	<b>357</b>	<b>552</b>

**Cuadro N° 2: Especies de Enterobacterias Distribuidas en relación al Sexo y Procedencia.**

Tipo de Especie	Sexo			Sexo			Total General
	Masculino		Total	Femenino		Total	
	Intrahospitalario	Extrahospitalario		Intrahospitalario	Extrahospitalario		
<i>Escherichia coli</i>	42	38	80	70	222	292	372
<i>Escherichia fergusonii</i>	4	7	11	7	43	50	61
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	1	14	8	9	17	31
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2	3	7	1	8	11
<i>Klebsiella ozanae</i>	2	1	3	2	2	4	7
<i>Klebsiella aerogenes</i>		1	1		1	1	2
<i>Klebsiella planticola</i>					2	2	2
<i>Proteus mirabilis</i>	5	5	10	4	10	14	24
<i>Proteus vulgaris</i>	1		1		2	2	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	1	4	3	3	6	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	1	8	1		1	9
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3		3		2	2	5
<i>Citrobacter freundii</i>	7	1	8	3		3	11
<i>Citrobacter diversus</i>	1		1				1
<i>Morganella morganii</i>		1	1				1
<i>Salmonella tify</i>	1	1	2				2
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>60</b>	<b>150</b>	<b>105</b>	<b>297</b>	<b>402</b>	<b>552</b>

**Cuadro N° 3: Valoración de la prueba de Tamizaje(Screening) para la Detección de BLEE Según la NCCLS.**

<b>Tipos de Especie</b>	<b>Presuntivas de Blee</b>	<b>Productoras de Blee</b>
<b>Escherichia coli</b>	<b>79</b>	<b>62</b>
<b>Klebsiella pneumoniae</b>	<b>20</b>	<b>18</b>
<b>Proteus mirabilis</b>	<b>7</b>	<b>5</b>
<b>Escherichia fergusonii</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
<b>Klebsiella oxytoca</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Citrobacter freundii</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
<b>Otros</b>	<b>12</b>	<b>4</b>
<b>Klebsiella ozanae</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Klebsiella planticola</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Enterobacter Cloacae</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>Enterobacter agglomerans</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
	<b>138</b>	<b>98</b>

**Cuadro N° 4: Aislamientos de Enterobacterias en Relacion al Tipo de Muestra y Sexo.**

	Sexo		Total	Sexo		Total	Total General
	Masculino			Femenino			
Tipo de Muestras	Hopitalizado	Ambulatorio		Hopitalizado	Ambulatorio		
Urocultivo	53	52	105	75	277	352	457
Secreción Bronquial	8	1	9	3	1	4	13
Secreción Faringea	2		2	2	1	3	5
Secreción Uretral		2	2				2
Secreción Vaginal				1	12	13	13
Secreción Pulmonar				1		1	1
Secreción Biliar	1		1	2	1	3	4
Secreción Umbilical	2		2				2
Secreción Endotraqueal	7		7	2		2	9
Secreción Uterina				1		1	1
Semen		2	2				2
Susescara	1		1	3		3	4
LCR	1		1				1
Tejidos	3		3	3		3	6
Punta de Sonda				1		1	1
Abscesos	9	2	11	6	3	9	20
Hemocultivo	3	1	4	5	2	7	11
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>60</b>	<b>150</b>	<b>105</b>	<b>297</b>	<b>402</b>	<b>552</b>

**Cuadro N° 5: Enterobacterias Productoras de Blee distribuidas en relación al Sexo y Procedencia.**

Tipo de Especie	Sexo		Total	Sexo		Total	Total General
	Masculino Blee			Femenino Blee			
	Hospitalizado	Ambulatorio		Hospitalizado	Ambulatorio		
Escherichia coli	17	4	21	22	19	41	62
Escherichia fergusonii	1	1	2	1		1	3
Klebsiella pneumoniae	9	1	10	4	4	8	18
Klebsiella oxytoca				3		3	3
Klebsiella ozanae				1		1	1
Klebsiella aerogenes							
Klebsiella planticola					1	1	1
Proteus mirabilis	1	1	2		3	3	5
Proteus vulgaris							
Enterobacter aerogenes							
Enterobacter cloacae	1		1				1
Enterobacter agglomerans					1	1	1
Citrobacter freundii	3		3				3
Citrobacter diversus							
Morganella morganii							
Salmonella tiphy							
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>7</b>	<b>39</b>	<b>31</b>	<b>28</b>	<b>59</b>	<b>98</b>

**Cuadro N° 6: Enterobacterias Productoras de Blee distribuidas según el tipo de Muestra en relación al Sexo y Procedencia.**

Tipo de Muestras	Sexo			Sexo			
	Masculino Blee			Femenino Blee			
	Hopitalizado	Ambulatorio		Hopitalizado	Ambulatorio		
Urocultivo	19	5	24	21	23	44	68
Secreción Bronquial	3	1	4	1		1	5
Secreción Faringea				1		1	1
Secreción Uretral							
Secreción Vaginal					3	3	3
Secreción Pulmonar							
Secreción Biliar							
Secreción Umbilical							
Secreción Endotraqueal	6		6	1		1	7
Secreción Uterina							
Semen		1	1				1
Susescara				1		1	1
LCR	1		1				1
Tejidos				2		2	2
Punta de Sonda				1		1	1
Abscesos	2		2	2	1	3	5
Hemocultivo	1		1	1	1	2	3
	32	7	39	31	28	59	98

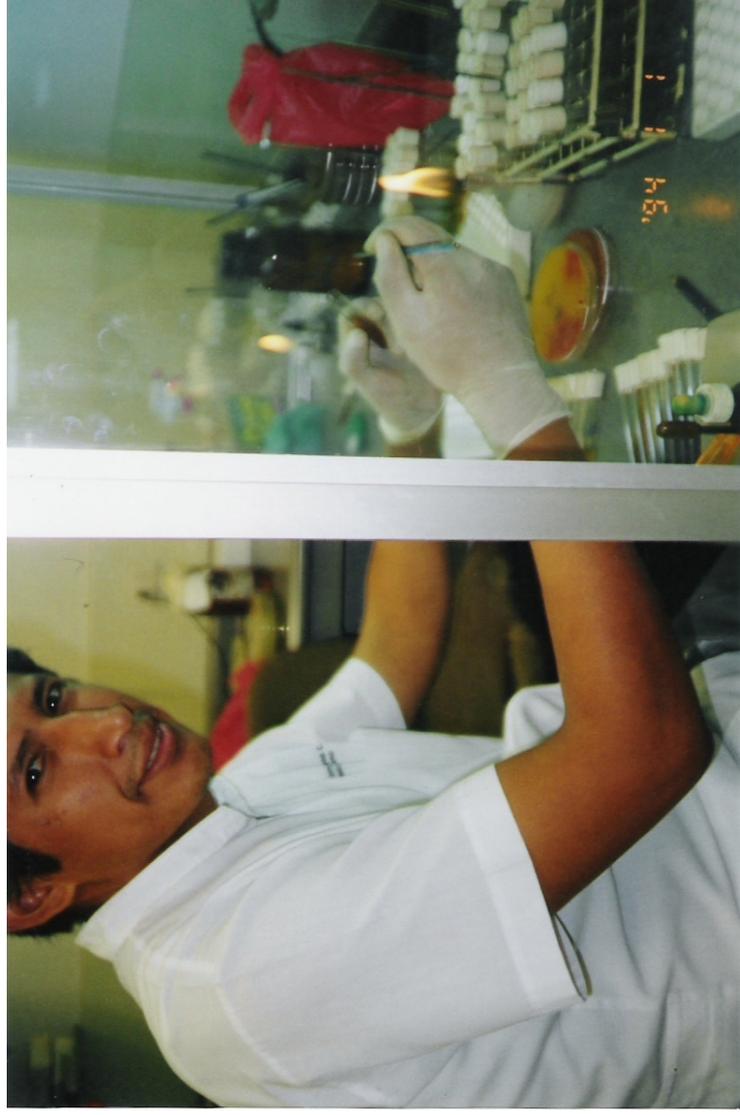
**Cuadro N° 7: Enterobacterias Productoras de Blee Distribuidas según el Tipo de Aislamiento.**

Tipo de Especie	Urocultivo	Secr endot	Secr bronq	Secr farin	Abscesos	Sec vag	Hemocult	Tejidos	Punta sonda	LCR	semen	subescara	
<i>Escherichia coli</i>	45	4	1	1	5	2	1	1		1	1		62
<i>Escherichia fergusonii</i>	2	1											3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	1	2				2		1				18
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1							1				1	3
<i>Klebsiella ozanae</i>		1											1
<i>Klebsiella planticola</i>	1												1
<i>Proteus mirabilis</i>	5												5
<i>Enterobacter cloacae</i>			1										1
<i>Enterobacter agglomerans</i>						1							1
<i>Citrobacter freundii</i>	2		1										3
	68	7	5	1	5	3	3	2	1	1	1	1	98

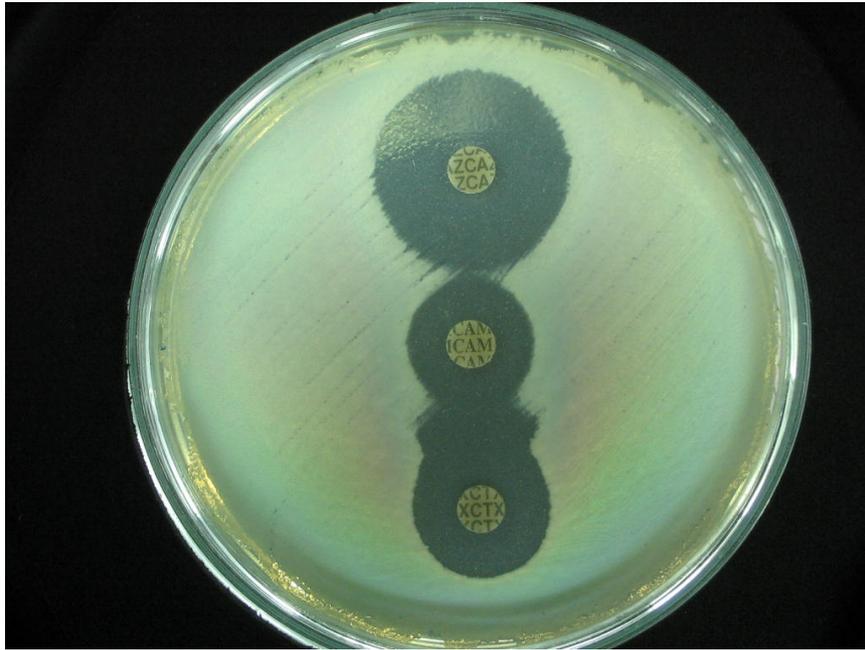
**Cuadro N° 8: Enterobacterias Productoras de Blee Distribuidas en relación al Grupo Etareo y Tipo de Muestra.**

Gupos Etareos	Urocultivo	Sec. Bronquial	Sec. Faringea	Sec. Endotraqueal	Sec. Vaginal	Semen	Subescsra	LCR	Tejidos	Abscesos	Hemocultivo	Total
[ 0 - 9 ]	16	1	7								1	25
[ 10 - 19 ]	5								1	1		7
[ 20 - 29 ]	9									1	1	11
[ 30 - 39 ]	4	1			1			1		1	1	9
[ 40 - 49 ]	7				1		1					9
[ 50 - 59 ]	7	1			1	1				2		12
[ > 60 ]	20	3							1	1		25
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>98</b>

**PERSONAL Q COLABORÓ CON EL PROSESAMIENTO DE LAS MUESTRAS JAJAJAJ...**



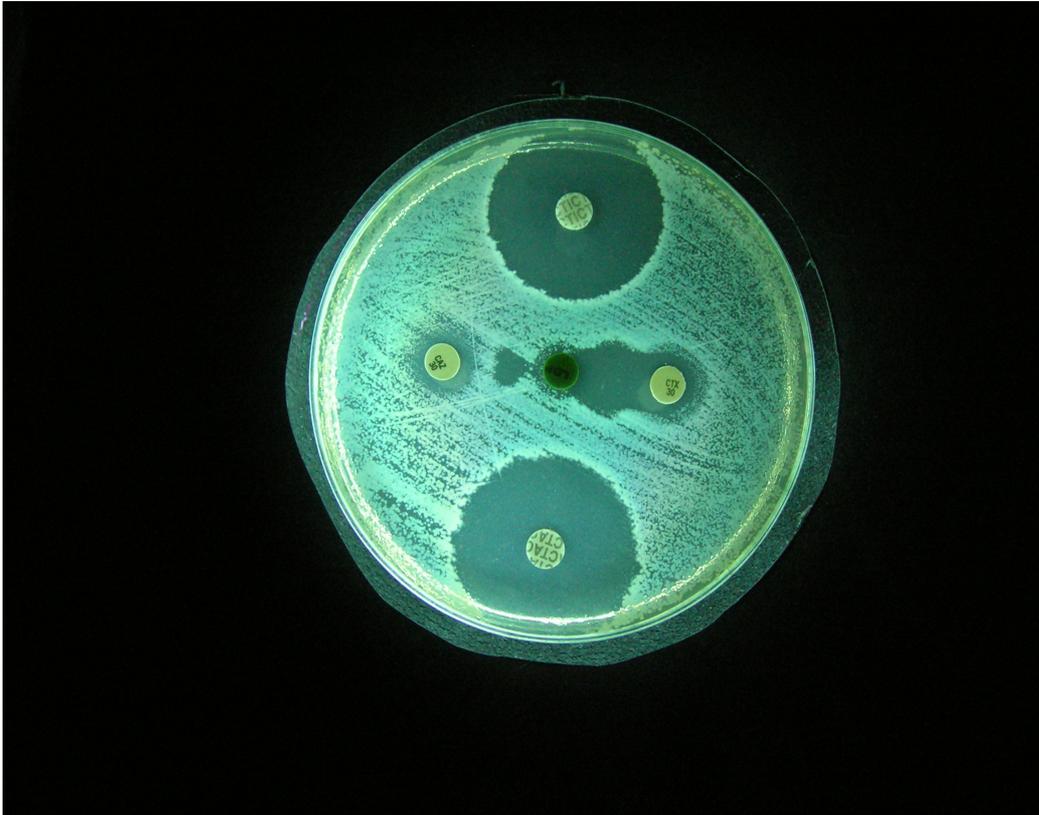
## SINERGISMO



## COMPARACION ENTRE C3G INDIVIDUALES Y ASOCIADOS AL ACIDO CLAVULÁNICO



**SINERGISMO**



**ANTIBIOGRAMA CON RESISTENCIA BACTERIANA**



**MEDIOS DE AISLAMIENTO PRIMARIO**



**BATERÍA BIOQUÍMICA DE ENTEROBACTERIAS**

....

