

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**DETECCION DE β -LACTAMASA DE AMPLIO ESPECTRO Y
 β -LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO
EN *Escherichia coli* AISLADAS DE PACIENTES QUE ASISTEN
AL INSTITUTO GUATEMALTECO DE SEGURIDAD SOCIAL
EN LA CIUDAD DE ESCUINTLA.**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

VANESSA SALAZAR PINOT

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, mayo de 2005

DL
06
TC(2317)

JUNTA DIRECTIVA

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Roberto José Garnica Marroquín	Vocal IV
Br. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal V

Mayo, 2005

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES

Anibal Salazar de León
Maribel Pinot de Salazar

A MIS HERMANOS

Tania, Krysthal, Geraldine, Gersson, Kenny.

A MI ABUELITA

Imelda de Pinot

A MI CUÑADO

Axel Molina

A MIS AMIGAS

Jeniffer Paz, Gisella Ruiz, Nancy Cabrera
Veronica Itzep, Dina Letona, Tania Cardenas
Sandra Cordova, Carmen Estrada.

DEDICO ESTA TESIS

A

Mi Patria GUATEMALA

La Universidad de San Carlos de Guatemala

La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de Escuintla

Laboratorio Nacional de Salud.

Hospital Nacional de Chimaltenango

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis

Lic. Jorge Matheu

Licda. Isabel Palma

A mis revisores de tesis

Licda. Alba Marina Váldez

Lic. Martín Gil

A la escuela de Química Biológica

Con especial cariño

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
IV. JUSTIFICACIÓN	19
V. OBJETIVOS	20
VI. MATERIALES Y METODOS	21
VII. RESULTADOS	25
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
IX. CONCLUSIONES	41
X. RECOMENDACIONES	42
XI. BIBLIOGRAFIA	43
XII. ANEXOS	47

I. RESUMEN

Los datos contenidos en este estudio fueron obtenidos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes que asisten al Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en la Ciudad de Escuintla, los cuales sirvieron para determinar la prevalencia de β -lactamasas de amplio espectro (BLEA) y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), así como la magnitud de la resistencia antimicrobiana, y los tipos de muestras y servicios en que se aíslan con más frecuencia.

Estas cepas fueron recolectadas en un período de seis meses y se inocularon en el medio de agar tripticasa soya el cual fue preparado en el Laboratorio Nacional para su conservación, seguidamente fueron analizadas en el Laboratorio Nacional, siguiendo las normas de la NCCLS para bacterias gram negativo, mediante ensayos con el método de Bauer & Kirby para la determinación de la sensibilidad antibiótica.

Se pudo demostrar que sí existe la presencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEA y BLEE y que las muestras donde mayor frecuencia se aíslan son los cultivos de orina, aspirados y secreciones, así también los servicios que poseen mayor porcentaje de aislamientos de estas cepas fueron la consulta externa con 5.8% de BLEE y 8.6% de BLEA, y emergencia de pediatría con 5.8% de BLEE y 2.9% de BLEA sobre el total de muestras analizadas (104 muestras). Se debe tomar en cuenta que también existen cepas productoras de BLEE y BLEA intrahospitalarias ya que se vieron afectados el 5.8% de los pacientes con mas de 72 horas de permanencia en el hospital, por lo que las autoridades hospitalarias deben ejercer medidas preventivas para evitar infecciones nosocomiales.

Debido a la falta de información sobre esta problemática se deberían efectuar campañas de educación a la población para que se haga conciencia sobre el uso adecuado de los antibióticos y así evitar problemas consecuentes.

II. INTRODUCCIÓN

En general, los antibióticos β -lactámicos son los preferidos para el tratamiento de las infecciones bacterianas debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro. La causa más común de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es la producción de β -lactamasas (1).

El empleo de los antibióticos ocupa un lugar predominante en la terapéutica del médico general y del especializado, y el éxito o fracaso de la terapia depende de esta elección del medicamento, del modo de aplicación y de la vigilancia atenta de sus efectos (2).

Durante los últimos años, la introducción de nuevos antibióticos en el uso clínico normalmente es seguida por el rápido y progresivo desarrollo de resistencia en bacterias patógenas y potencialmente patógenas. Debido al amplio uso de antibióticos β -lactámicos, la producción más importante de resistencia es contra este tipo de antimicrobianos y uno de los mecanismos más estudiados es la producción de enzimas que destruyen el anillo beta lactámico con la consecuente inactivación del antibiótico (3).

Las BLEE son derivadas de beta lactamasas plasmídicas por sustitución de aminoácidos con alteración del sitio activo, lo que las hace más afines por las cefalosporinas de amplio espectro.

Por medio de este estudio se obtuvo datos los cuales nos dieron la magnitud de la resistencia antimicrobiana que se presenta en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, así como identificar las áreas hospitalarias en las cuales se da mayor resistencia y tomar las acciones para controlar el problema.

III. ANTECEDENTES

A. *Escherichia coli* características generales.

En la actualidad, la diarrea continúa ocupando un lugar preponderante como causa de enfermedad y muerte entre los lactantes y, aún cuando es un problema de países en vías de desarrollo, parece ser producto de la revolución industrial y de la urbanización. Ocupa el segundo lugar como causa de morbilidad a nivel mundial, precedida de las afecciones respiratorias. La exposición constante a enteropatógenos, como es el caso de la contaminación feco-oral, podría explicar de cierta manera el incremento en la incidencia de diarrea en los niños. Se estima que en países subdesarrollados el lactante presenta por lo menos de 3 a 10 cuadros de diarrea cada año durante sus primeros 5 años de vida (4).

En 1985 se marcó el centenario de la primera descripción de *Escherichia coli* por el pediatra germano Theodoro Escherich, varios autores atribuyen el descubrimiento a John Bray, Laurelle, en 1889, reconoció a *E. coli* como agente causante de peritonitis resultado de infección y perforación intestinal. Posteriormente Lesage sugirió que hay cepas inofensivas y cepas agresivas. Entre 1908 y 1910. Gahr investigó la etiología de la diarrea en niños y concluyó que *E. coli* desempeña un papel importante en esta enfermedad. En la década de los 20's en Alemania, Adam lleva a cabo una serie de estudios bacteriológicos y la denominó en ese entonces "Dyspepsie koli". Posteriormente en los años 30's Golschmidt profundiza el trabajo de Adam y demuestra que "Dyspepsie koli" podría ser identificada por métodos serológicos e introduce la técnica de aglutinación en placas empleándola para el estudio de diarrea nosocomial (4-7).

En la década de los 40's, Kauffman perfecciona un esquema de serotipificación basado en los antígenos bacterianos, somático (O), flagelar (H), y capsular (K), con fundamento en el antígeno somático, se ha podido clasificar a *E. coli* en serogrupos de los cuales aproximadamente se conocen 150 en la actualidad (4,8).

En el año de 1945, hay una aceptación general de que *Escherichia coli* es un agente causal de diarrea en el humano, al publicar John Bray el artículo que marca el reconocimiento sobre la asociación de *E. coli* con la diarrea del verano, confirmándose

posteriormente los hallazgos de Bray por otros investigadores. En 1955, Neter introduce el término de *Escherichia coli* enteropatógena para diferenciar aquellas cepas que han sido epidemiológicamente relacionadas con diarrea infantil (4,9,10).

Poco después del reconocimiento de *E.coli* como enteropatógeno, se hace aparente que no todas las cepas son igualmente virulentas y que los niños pueden infectarse con esta bacteria y permanecer sanos. En 1966 Taylor y Bettelheim determinan la producción de enterotoxigénica por *E.coli* de humanos, y mostraron que estas cepas podían producir diarrea en adultos, iniciando así la rápida sucesión de descubrimientos que dan la pauta para la caracterización de cepas enterotoxigénicas y sus enterotoxinas. Casi simultáneamente con el descubrimiento de *E.coli* enterotoxigénica durante los 60's Sakazaki y colaboradores demuestran que algunas cepas podían causar enfermedad disentérica, designándose posteriormente a esta bacteria *E.coli* enteroinvasiva perteneciente a un limitado número de serogrupos O (4,10).

En 1955 Duguid, descubre la presencia de apéndices en la superficie de algunas cepas de *E.coli* y establece la hipótesis de que estos apéndices (que después se denominaron fimbrias), promovían la adhesión de la bacteria a la mucosa intestinal, hipótesis que después fue confirmada por Smith, demostrando la presencia de pili de adhesión específicos conocidos como antígenos K-88 (en cerdos) o factor de virulencia (10).

Durante los pasados 100 años, *Escherichia coli* ha sido analizada de tal manera que es ahora la forma de vida más completamente estudiada sobre la tierra, a pesar de ser miembro común de la microbiota intestinal (del hombre y de los animales) que generalmente no produce enfermedad, ha emergido como un importante patógenos que es capaz de producir infecciones gastrointestinales serias. Esta cepas de *E.coli* productoras de cuadros entéricos poseen características de virulencia específicas que se correlacionan con su patogenicidad.

Escherichia coli es el microorganismos facultativos más predominante hallado en el intestino grueso del hombre, es el bacilo entérico más frecuentemente aislado en laboratorio. Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichiae y género *Escherichia*. Las Enterobacteriaceae son pequeños bastones gram negativo (0.5 por 3um)

no formadores de esporas, que pueden ser móviles o inmóviles. Cuando son móviles, el movimiento es por medio de flagelos peritriquiales, una propiedad que ayuda en la diferenciación de los bacilos entéricos de las bacterias flageladas polares de las familias Pseudomonadaceae y Vibrionaceae, los bacilos entéricos pueden tener un revestimiento laxo y mal definido denominado capa de limo como se observa en algunas *Escherichia* (11-13).

Las Enterobacteriaceae poseen paredes celulares complejas compuestas de mureína, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos dispuestos en capas. La capa de mureína y lipoproteína constituye aproximadamente el 20% de la pared celular total y es responsable de la rigidez celular. Las Enterobacteriaceae son organismos facultativos, bioquímicamente diversos y complejos. En condiciones anaerobias o con bajo oxígeno, atacan fermentativamente a los carbohidratos, pero con suficiente oxígeno, utilizan el ciclo del ácido tricarbóxico y el sistema de transporte de electrones para la producción de energía (11,14).

La composición antigénica de *E.coli* es compleja con más de 1701 antígenos somáticos (O), 56 antígenos flagelares (H) y numerosos antígenos capsulares (K), los antígenos K se dividen sobre la base del comportamiento físico en tres tipos principales, L, A y B, el tipo serológico de una *E.coli* se da en la forma: O, tipo K, tipo H, la clasificación serológica de las cepas de *E.coli* resulta útil para los estudios epidemiológicos. Se conocen algunos serotipos específicos asociados a una mayor virulencia (4,11,14).

Escherichia coli crece fácilmente en diversos medios de cultivo que comúnmente son utilizados, pueden ser recuperadas fácilmente de muestras clínicas en medios generales o selectivos a una temperatura de 37 grados centígrados, en condiciones aeróbicas; de muestras de heces puede ser aisladas en agar MacConkey o en agar EMB, en medios de cultivo, colonias circulares convexas y lisas de bordes bien definidos, algunas cepas producen beta hemólisis en agar sangre. En medios de aislamiento entérico muchas cepas aparecen como colonias fermentadoras, muchas cepas son no pigmentadas, móviles producen lisina descarboxilasa y utilizan acetato como única fuente de carbono, son indol positivo, aunque existen algunas cepas indol negativo, el 90% de las cepas son lactosa positivo aunque algunas cepas pueden ser típicamente lactosa-negativas, se pueden utilizar

distintas muestras para aislar a *Escherichia coli* tales como sangre, orina, puntas de catéter, heces, secreciones de heridas, etc. La tinción de Gram no permite distinguir a *E. coli* de otras bacterias Gram negativo y es necesario el cultivo seguido de una identificación metabólica, *E. coli* es una enterobacteria fermentadora, productora de gas (3,13,14).

1. Infecciones causadas por *Escherichia coli*

Escherichia coli es único entre otros patógenos oportunistas en cuanto se asocia con enfermedades gastrointestinales humanas, particularmente en niños y viajeros a países en desarrollo. *Escherichia coli* son bacilos Gram negativo que se aísla con más frecuencia en el paciente séptico, el foco de la infección suele ser el tracto urinario o el gastrointestinal. La mortalidad de septicemia por *E. coli* depende del origen de la infección y de la enfermedad subyacente, la mortalidad aumenta significativamente en pacientes inmunocomprometidos o con infecciones producidas por perforaciones intestinales (4).

Escherichia coli es un agente comensal del tubo digestivo. Se propaga desde él para infectar las estructuras contiguas, aprovechando cualquier interrupción de las barreras anatómicas normales, también existen datos epidemiológicos de que *E. coli* y otras Enterobacteriaceas tienen la tendencia a colonizar la piel y las mucosas en enfermos debilitados, lo que posiblemente explique la mayor frecuencia de estas infecciones en pacientes con enfermedades avanzadas (4,16).

Los cuadros de diarrea asociados con *Escherichia coli* se definen esencialmente por su mecanismo patogénico, más que por sus características bioquímicas o serológicas y a biología molecular. De acuerdo a los mecanismos de patogenicidad, los grupos son diferentes, pero comparten algunas características en común, la forma de interacción con la mucosa intestinal, la producción de toxinas (citotoxinas o enterotoxinas), la tendencia a manifestar un patrón típico de virulencia relacionado con un serotipo O:H específico, la inclinación a presentar las propiedades de virulencia codificadas en plásmidos y, además comúnmente los genes de virulencia son compartidos o relacionados entre las diferentes categorías de las cepas de *Escherichia coli* (4).

Escherichia coli es conocida en la actualidad como la causante de enfermedades gastrointestinales y se reconocen cinco clases de *E. coli*. Como agentes asociados con gastroenteritis puesto que forma parte de la flora fecal normal, la única forma de definir a *E. coli* diarreógeno es demostrando las características de virulencia. El mecanismo por el cual *E. coli* produce diarrea implica típicamente la adherencia de los microorganismos a un receptor glucoprotéico o glucopídico y la posterior producción de alguna sustancia nociva que lesiona las células intestinales o altera su función sin destruirlas. Las manifestaciones clínicas de la diarrea asociado con *E. coli* varía de un grupo a otro, la *E. coli* enterotoxigenica es una causa importante de diarrea infantil con deshidratación, diarrea acuosa, vómito y febrícula, dolor abdominal. *E. coli* enteroinvasiva ocasiona una enfermedad que no se puede distinguir de la disentería bacilar clásica. Son manifestaciones características la fiebre, la toxicidad general, el dolor abdominal espasmódico, el tenesmo y la urgencia con diarrea acuosa o sanguinoliente.

E. coli enteripatógena suele aparecer en lactantes y niños en los primeros años de vida que presentan una diarrea con moco pero sin sangre, puede haber fiebre, suele producir una enfermedad diarreica prolongada. *E. coli* enterohemorrágica puede causar una enfermedad diarreica anodina o un proceso caracterizado por dolor abdominal con diarrea que al principio es acuosa, pero que en unos pocos días se convierte en macroscópicamente sanguinolienta. *E. coli* enteroadherente no ha sido caracterizado a fondo en cuanto a la enfermedad que origina. Es frecuente la pérdida importante de líquidos con deshidratación, mientras que la fiebre, los vómitos y las heces macroscópicamente sanguinolientes son manifestaciones relativamente infrecuentes. Actualmente se han descubierto dos tipos más de *E. coli* la *Escherichia coli* enteroagregativa estas cepas se adhieren a la mucosa intestinal y favorecen la secreción de moco atrapando a las bacterias en la película de persistencia de la colonización y que tal vez contribuya a la malabsorción, esta se acompaña de efectos citopáticos sobre la mucosa intestinal, se acortan las vellosidades, hay necrosis en las puntas vellosas, con una respuesta inflamatoria leve. La *Escherichia coli* difusa adherente, la información aún es escasa el fenotipo difusamente adherente está mediado por fimbrias de superficie codificadas tanto en el cromosoma como en un plásmido que se ha llamado F1845, por existir pocos estudios no es posible una descripción clínica satisfactoria pero produce diarrea acuosa sin sangre (4,7,16).

E. coli se considera como la principal bacteria causante de infecciones urinarias, así como de colonizar la piel en personas debilitadas, se ha aislado frecuentemente en heridas de pacientes diabéticos (13,14,17,18)

B. El uso de los antibióticos

La era de los antibióticos comenzó hace 60 años, con la comercialización de la penicilina entonces se tenía la esperanza de que las enfermedades microbianas desaparecerían. Pero esa pretensión se fue revelando poco a poco imposible. Pronto aparecieron cepas de bacterias que habían desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos. Primero lo hicieron en los hospitales de los países desarrollados, pero pronto se transformaron en infecciones extrahospitalarias y, hoy, se encuentran extendidas por todo el mundo, amenazando nuestra capacidad para combatir muchas infecciones (1,18,20).

De forma paralela al rápido desarrollo de una amplia variedad de agentes antibacterianos desde los años cuarenta, se ha demostrado que las bacterias muestran una gran tendencia a desarrollar resistencia a cada agente nuevo que se introduce, por lo que la resistencia bacteriana va en aumento cada día y esta se reconoce ahora en todo el mundo como una amenaza seria al tratamiento de infecciones que ponen en peligro la vida (3,21).

El gran número de sustancias antimicrobianas que existen se explica por las alteraciones sufridas por el hospedero, por la aparición de nuevos microorganismos y por la resistencia de los agentes patógenos antiguos y modernos a los productos antimicrobianos que existían previamente; los cambios experimentados por el hospedero comprenden la prolongada supervivencia de los enfermos muy graves gracias al empleo de los antibióticos. Existen varios factores que intervienen en la selección de un agente antimicrobiano, en el momento de iniciar el tratamiento puede ignorarse la identidad del microorganismo infectante, en muchas ocasiones el tratamiento se inicia de forma empírica, el hospedero juega un papel muy importante en la selección de un antimicrobiano, se debe tomar en cuenta antecedentes alérgicos, edad, función renal, función hepático, embarazo, factores genéticos y lugar de la infección (4,18,22).

C. *Escherichia coli* y su resistencia antimicrobiana.

Las β -lactamasas son una familia de enzimas que excede a las 170, cuya actividad es hidrolizar el enlace amida cíclico de la penicilina G y otros β -lactámicos, inactivando al antibiótico. La especificidad de la β -lactamasa por un antibiótico β -lactámico determinará la eficiencia con la cual la bacteria hidroliza al antibiótico (1,11,23).

β -lactamasas sintetizadas por Gram negativo TEM-1 y SHV-1 codificadas en plásmidos y con un amplio espectro de actividad contra β -lactámicos permanecieron estables por muchos años, pero a principios de los años 80's aparecieron cepas bacterianas productoras de variantes de las enzimas anteriormente mencionadas, con capacidad para hidrolizar cefalosporinas de 3ª generación (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima) y fueron llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) Los microorganismos que más comúnmente sintetizan estas enzimas son: *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli*, pero también se han detectado en: *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burk*

holderia cepacia y *Capnocytophaga ochracea*. Cepas productoras de BLEE, han ocasionado brotes de infección intrahospitalaria, con multirresistencia a los antibióticos, dificultando el tratamiento y aumentando la morbimortalidad nosocomial (1,16,21,25,26).

En 1988 se reportaron BLEE codificadas en plásmidos y su origen fue debido a la transferencia del gen cromosomal que codifica para la BLEE llamada AmpC a plásmidos (7).

Una de las bacterias productoras de BLEE AmpC que mas comúnmente se han aislado es *Escherichia coli*, entre otras. Sea cual sea su origen genético

o, todas las BLEE tienen el mismo espectro de actividad y son inhibidas por el ácido clavulánico, pero las BLEE AmpC plasmídicas, poseen un comportamiento diferente, ya que estas presentan achatamiento en sus halos frente al ácido clavulánico aunque no siempre presentan este comportamiento. Además, los genes que codifican para las AmpC pueden ser transferidos a otras bacterias a través de la conjugación (15,28-31).

Las primeras cepas reportadas como productoras de BLEE pertenecían a las especies de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y fueron causantes de brotes de infección nosocomial en los Estados Unidos. La indiscriminada administración de cefalosporinas de espectro extendido, particularmente ceftazidima fue la principal causa de la aparición de estas cepas. Los brotes fueron controlados al reducir la utilización de ceftazidima junto con la implementación de medidas de control de infecciones (13,17,32-34).

Las pruebas de laboratorio para la identificación de resistencia antimicrobiana por parte de las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE presentan una concentración mínima inhibitoria (CMI) mayor o igual a 2 mg/ml para ceftazidima, cuando se utiliza un inóculo de 10⁵ UFC/ml, con o sin incrementos similares de la CMI de otras cefalosporinas de espectro extendido. Dependiendo del tipo de BLEE, *in vitro* puede observarse resistencia a cefotaxima y susceptibilidad a ceftazidima, por lo tanto, para la detección por el laboratorio de las cepas productoras de BLEE, se recomienda probar la susceptibilidad frente a varias cefalosporinas de 3^a generación (16,17,34).

En un intento para garantizar la detección por el laboratorio, el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS por sus siglas en inglés), recomienda que para la detección de BLEE en *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae*, deberá observarse una CMI mayor o igual a 2 mg/ml frente alguno de los siguientes antibióticos: cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima o aztreonam. Una vez detectado un aislamiento con una CMI elevada, se deben realizar pruebas confirmatorias, que consisten en utilizar ceftazidima y cefotaxima con y sin ácido clavulánico. Una disminución de tres veces o más en la CMI del antibiótico/ácido clavulánico frente al antibiótico solo, confirma una cepa productora de BLEE. También existen métodos comerciales como las cartas Vitek ESBL y las tiras Etest ESBL1 (14,28,29,35).

La bacteria de *E. coli* cuando produce una resistencia BLEE (β -lactasamasa de espectro extendido) se reconoce por una deformación del halo por inhibición de la β -lactamasa por parte del Ac. Clavulánico y la consiguiente acción de la cefalosporina de 3^a generación (CTX y CAZ) cefotaxima, ceftazidima, en la BLEA aparecera resistente a

Ampicilina y Ticarcilina, sin deformación entre el halo de cefotaxima, ácido clavulánico y ceftazidima (2,16,17,18).

La BLEE representa una resistencia antimicrobiana de amplio espectro, en donde esta presenta una resistencia no solo a los antibióticos de primera, segunda y tercera generación si no que también abarca a la mayoría de penicilinas y cefalosporinas, las BLEAS se encuentran en menor porcentaje que las BLEES,(ver anexo). Las BLEAS se encuentran naturalmente en *Klebsiella sp.*

Parte de la resistencia antimicrobiana en bacterias Gram negativo es debida a la reducción de entrada, causada por la disminución en la cantidad proteínas específicas porinas, esto produce un amplio espectro de resistencia frente a diferentes tipos de antibióticos como el cloranfenicol, trimetoprim, quinolonas y tetraciclinas así como los compuestos β -lactámicos, por este medio la resistencia es usualmente baja porque lo que logra es impedir u obstruir antes que prevenirla completamente y su significado clínico se ve solo cuando otro mecanismo de resistencia es activado (28,36,37).

D. Producción de β -lactamasas.

Las betalactamasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del anillo β -lactámico dando lugar a productos inactivos desde el punto de vista microbiológico. Los genes que codifican estas enzimas se distribuyen ampliamente en el reino bacteriano y se encuentran en cromosoma o en los plásmidos (11,18,23).

Las betalactamasas de las bacterias Gram positivas se liberan al ambiente extracelular y la resistencia se manifestará sólo cuando este presente una gran población de células. No obstante, las betalactamasas de las células Gram negativo permanecen dentro del periplasma (16,38).

Existen muchas enzimas betalactamasas diferentes con la misma función pero que difieren en sus secuencias de aminoácidos y en su finalidad por diferentes sustratos

betaláctamicos, algunos betaláctamicos son hidrolizados por muy pocas enzimas y son mucho más lábiles.

Los inhibidores de la betalactamasa como el ácido clavulánico son moléculas que contienen anillo beta lactámico y actúan como inhibidores suicidas uniéndose a las betalactamasas y evitando que destruyan a los betaláctamicos por si mismas tienen poca actividad bactericida (3,29).

E. Penicilinas y cefalosporinas.

Las penicilinas pueden dividirse en varias clases basándose en su actividad antibacteriana existen penicilinas naturales que son las penicilinas G y las penicilina V, y aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas estas son derivados de la ampicilina y atraviesan más rápidamente los canales existentes en los poros de las bacterias Gram negativo, estas son destruidas por las B-lactamasas de *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* (12,30).

La segregación de enzimas designadas como betalactamasas es un instrumento de la resistencia tanto de bacterias Gram positivo como Gram negativo. Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico liberando ácido peniciloico o cefalosporoico que son biológicamente inactivos (1,2).

Las cefalosporinas se distinguen de las penicilinas por la presencia de un anillo de dihidrotiacina en vez del anillo de tiazolidina de 5 carbonos que está unido al anillo β -lactámico de 4 carbonos, gracias a su configuración las cefalosporinas han podido ser modificadas químicamente para obtener compuestos que poseen propiedades farmacológicas y microbiológicas por lo que es útil dividir las en generaciones, las cefalosporinas inhiben la biosíntesis de la pared celular y son bactericidas (7,18,29).

F. Inhibidores de las β -lactamasas.

La pieza final del rompecabezas de las proteínas reconocedoras de penicilina es la aparición de inhibidores de las β -lactamasas, los compuestos se asemejan lo suficiente a los antibióticos betalactámicos como para unirse a las β -lactamasas, ya sea en forma reversible o irreversible, para proteger de la destrucción a los antibióticos. Son más eficaces cuando actúan como bombas suicidas absorbiendo toda la enzima disponible. No es sorprendente que estos compuestos, que pueden imitar a los betalactámicos en lo que respecta al funcionamiento, también poseen una actividad antibacteriana limitada por sí mismos. Los tres inhibidores de la actividad de las β -lactamasas que han tenido aplicación en medicina clínica son el ácido clavulánico, el sulbactam, y el tazobactan. Los tres inhibidores son eficaces contra la penicilinasas del estafilococo y tienen eficacia variable contra las enzimas cromosómicas de las bacterias Gram negativo (14,16,39).

Las β -lactamasas de las bacterias Gram negativo son más complicadas. La mayoría de las enterobacterias contienen enzimas cromosómicas constitutivas que se producen a bajo nivel y que varían según su especie. La inducción de altos niveles de estas enzimas cromosómicas sobre todo cefalosporinasas, aumentan el nivel de resistencia y expande la cobertura eficaz de las enzimas a otras resistentes a la acción de los betalactámicos, como las cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos (16,17).

Varios factores determinan la eficacia de combinaciones de inhibidores, antibióticos, enzimas y cepas bacterianas específicas. Estos factores incluyen la magnitud con la que los antibióticos o los inhibidores inducen la actividad β -lactamasa, la actividad de enzima producida, y la eficacia del inhibidor contra el tipo específico de β -lactamasa producida. Entre las β -lactamasas de amplio espectro algunas son bloqueadas por diferentes inhibidores en tanto que otras no son afectadas por su presencia (16,17,35).

G. Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

La resistencia bacteriana se define como "una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de

permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico (16,18,40).

La resistencia bacteriana obliga al desarrollo y utilización de nuevos antibacterianos, que son más costosos y a veces más tóxicos que los empleados habitualmente. Cuando se lanza al mercado un fármaco antibacteriano, se define el espectro de microorganismos sobre los cuales es eficaz, pero luego este patrón va cambiando a medida que la droga se utiliza clínicamente, llegando en algunos casos a caer en el desuso (16,30,32).

En cuanto a los microorganismos Gram negativo, tenemos que las enterobacterias están desarrollando resistencia frente al aztreonam y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación mediante la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEES). El primero de estos casos se reportó en Alemania en 1983. Luego este tipo de resistencia se fue difundiendo y actualmente *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* son los microorganismos más frecuentemente asociados con producción de BLEES. La incidencia es variable; por ejemplo tenemos un estudio en los Estados Unidos donde se encontró que el 9% de 906 aislados de enterobacterias eran cepas productoras de BLEES (16,29,32).

H. Bases Genéticas de la resistencia.

La aparición de resistencia bacteriana se debe a cambios estructurales y fisiológicos que van a neutralizar los efectos del antibiótico. Estos cambios ocurren por dos mecanismos genéticos principales.

a. Mutaciones en un gen cromosómico:

Los cambios en el cromosoma pueden ser debidos al azar o a la influencia de agentes físicos o químicos y no necesariamente debido a la exposición al antibacteriano. Es posible que cualquier población grande de bacterias sensibles a antibióticos contenga algunos mutantes que sean relativamente resistente a fármacos (14,16,29,40).

En algunos casos, la mutación es en una sola fase y ocasiona un alto grado de resistencia, en otros, la aparición de mutantes resistentes puede necesitar de varias fases o pasos, y cada uno de ellos genera solo mínimas alteraciones en la sensibilidad. Luego de ocurrida la mutación, esta puede transferirse en sentido vertical a las células hijas (34,35).

b. Introducción de un plásmido R de resistencias:

Es la adquisición, por parte del microorganismo, de genes para la resistencia transportados en plásmidos extracromosomales, mediante transducción, transformación o conjugación.

Este mecanismo es más frecuente que el mutacional, se disemina rápidamente aún entre diferentes especies bacterianas, puede conferir resistencia a varios antibióticos a la vez y a diferencia del anterior, no suele producir una desventaja adaptativa, es decir, no disminuye la tasa de crecimiento de la bacteria ni la hace perder sus propiedades (35,40).

La resistencia de las bacterias se ha convertido en un problema mundial, los laboratorios de microbiología clínica siempre han hecho pruebas de susceptibilidad de los aislamientos de bacteria a los agentes antimicrobianos con el fin de guiar la terapia, no obstante, los laboratorios hoy en día tienen una función más amplia, que incluye la vigilancia de los patrones de susceptibilidad de los microorganismos con el fin de detectar nuevos patrones de resistencia (16,41).

I. Bases bioquímicas de la resistencia:

El conocimiento de las bases bioquímicas explican el fracaso de la antibioticoterapia en determinados casos o las infecciones recurrentes. Las bacterias disponen, crean o logran la resistencia mediante diversos recursos biológicos que explican la rapidez de su adaptación a un ambiente desfavorable entre estos recursos destacan como más importantes:

- Disminución de la permeabilidad bacteriana para impedir el acceso del fármaco

- Reducción de la afinidad a la enzima blanco de la droga
- Modificación de la enzima blanco del antibiótico
- Segregación de enzimas inactivadoras del quimioterapéutico

A cada uno de los principales grupos de antibióticos puede ser afectado por uno o varios de los mecanismo citados, por cuyas causas resulta de interés describir las bases bioquímicas de la resistencia.

La aparición cada vez más frecuente y diversa de los mecanismos de resistencia a nivel microbiano y sobre todo en aquellas bacterias patógenas facultativas e incluso oportunistas, ha traído consecuencias importantes en términos de morbilidad y mortalidad y millonarias pérdidas no sólo humanas sino económicas. El impacto de la diseminación de estas cepas escapa a los cálculos establecidos y en la mayoría de los casos no se ha dado la relevancia real y pertinente al problema que se afronta. Como es tal vez menos complicado evitar que tratar en este caso específico, es de suma importancia poder reconocer, descubrir, tratar eficazmente y prevenir las infecciones por microorganismos resistentes. Este estudio sirve de herramienta para que pueda utilizarse el laboratorio de microbiología de rutina: "la lectura interpretativa del antibiograma". Esta puede ser aplicada en las bacterias más frecuentes y constituye una herramienta sencilla y accesible que permite hacer inferencias sobre los mecanismos de resistencia más estudiados. El antibiograma es un test de resistencia o sensibilidad de las bacterias colocadas bajo la acción de antibióticos diversos (6,39,42).

Lo anterior representa un importante aporte para un mejor y mayor enfoque en el tratamiento antibiótico del paciente infectado con estas cepas y a la vez suministra un control de calidad al informe y diagnóstico microbiológico (1,5,6,14,39).

El problema de la resistencia constituye un factor que conduce a cambios permanentes en la prescripción antibiótica y está en función del tiempo y el uso de un antimicrobiano. La exposición a los antibióticos incluye las prescripciones profilácticas preoperatorias y las terapias en sí, teniendo en cuenta que también hay contacto con los antibióticos de uso animal, vegetal y particularmente los utilizados como promotores de crecimiento en especies animales.

Para definir y enfrentar la resistencia de un microorganismo, deben conocerse los mecanismos de resistencia, los datos obtenidos en el laboratorio clínico y conjugarlo con la experiencia clínica. En el laboratorio puede evidenciarse tanto la resistencia intrínseca como la adquirida; no obstante la extrínseca o adquirida por ser impredecible, es la que debe descubrirse de una manera oportuna pues es la causa más importante de falla terapéutica. La resistencia clínica es definida como la discrepancia entre la susceptibilidad *in vitro* y el efecto visto en el huésped (6,15,22).

El uso de B-lactámicos particularmente en el tratamiento de los bacilos gram negativo ha permitido un aumento de los aislados de bacterias gram positivo. La presión selectiva y los diferentes mecanismos de transmisión y recombinación genética, han dado origen a diferentes patrones de resistencia en estas bacterias, los cuales se presentan de manera frecuente a nivel mundial (5,11,14).

Los mecanismos moleculares que conducen a la expresión de resistencia en bacterias patógenas y potencialmente patógenas, son múltiples y variados. Igualmente la posibilidad de transmisión horizontal de estos mecanismos ya sea a nivel inter o intraespecie han producido serios problemas terapéuticos que actualmente se ve abocada la comunidad médica (21,25,39).

a. Resistencia intrínseca/natural (cromosómica).

- i. Impermeabilidad de la membrana: la membrana externa de *Pseudomonas* es 100 veces más impermeable que la membrana de *E. coli*.
- ii. Sistemas de bombas de flujo activo del antibiótico
- iii. La B-lactamasa AmpC que a niveles basales confiere a penicilina G, aminoipenicilinas y las cefalosporinas de primera y segunda generación. Esta B-lactamasa no es inhibida por las combinaciones de B-lactámicos, tales como aminopenicilinas con ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

b. Resistencia adquirida. Este tipo de resistencia es causante de la mayoría de las fallas terapéuticas pues es la que se puede desarrollar a través del tiempo.

c. Resistencia por producción de β -lactamasas. Es uno de los principales mecanismos de resistencia de diversas bacteria. La enzima responsable en la mayoría de los casos de resistencia a β -lactámicos es la AmpC, la cual es codificada por el mismo gen, su producción puede ser por inducción o por represión siendo esta última la más frecuente.

Es por ello que la velocidad con la cual el fármaco ingrese a la bacteria es fundamental para evadir la acción de las β -lactamasas que pueda encontrarse en el espacio periplásmico (32).

Resistencia medida por las bombas de flujo activo del antibiótico hacia el exterior. Este es un mecanismo descrito más recientemente y el cual se evidenció cuando toda la resistencia a los beta lactámicos diferentes a los carbapénem no pudo ser atribuida completamente a la baja permeabilidad de la membrana externa, pues en algunos casos aislados que demostraban alteraciones de las porinas, conservaban su sensibilidad a otros B-lactámicos. Este mecanismo se debe a una hiperproducción de proteínas de la membrana externa bacteriana que no afectan la permeabilidad pero que conforman un sistema de flujo activo de antibióticos con una amplia especificidad de sustrato (26,33,43).

Los antibióticos b-lactámicos son los preferidos para el tratamiento de las infecciones bacterianas debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro. La causa más común de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es la producción de β -lactamasas. La diseminación de cepas productoras de β -lactamasas, así como de los genes que las codifican, invalidó a la benzilpenicilina utilizada contra los estafilococos y a la ampicilina administrada contra enterobacterias, *Haemophilus sp.* y *Neisseria sp* (7,8).

IV. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana es una problemática desde años atrás y en aumento, la cual puede ocasionar problemas serios de salud si no se da una pronta solución.

E.coli debido al uso indebido de los antibióticos ha provocado que algunas cepas sean productoras de β -lactamasa provocando así una resistencia antimicrobiana poco conocida en nuestro país, con este estudio se va a obtener datos de la resistencia antimicrobiana para detectar la magnitud en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en el departamento de Escuintla, para luego trasladar la información a las autoridades competentes a fin de tomar las medidas y acciones encaminadas al control de las mismas.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Determinar la prevalencia de BLEA y BLEE de las cepas aisladas de *Escherichia coli* en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en la ciudad de Escuintla.

B. Objetivos Específicos

1. Determinar el perfil resistencia que presentan las cepas de *Escherichia coli* durante el periodo de estudio.
2. Determinar el tipo de muestra, género, y salas en donde se encuentra el mayor porcentaje de resistencia de las cepas aisladas de *Escherichia coli*.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo

Muestras de pacientes que son referidas a la sección de microbiología del laboratorio clínico del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en el Departamento de Escuintla.

B. Medios

1. Recursos Humanos

Autor: Vanessa Salazar Pinot

Asesores: Lic. Jorge Matheu.

Licda. María Isabel Palma

Personal profesional y técnico del Laboratorio del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de Escuintla y del Laboratorio Nacional de Salud.

2. Recursos Materiales

a) Equipo

- i. Incubadora
- ii. Balanza Analítica
- iii. Refrigeradora
- iv. Mechero
- v. Autoclave
- vi. Impresora
- vii. Computadora

b) Materiales

- i. Guantes desechables
- ii. Asas en Argolla y el punta
- iii. Cajas de Petri descartables medida 85mm X 15mm
- iv. Tubos de ensayo
- v. Erlenmeyer de 250ml, 500 ml y 1000ml
- vi. Probeta de 10ml, 100ml, 500ml
- vii. Hisopos estériles
- viii. Papel pH
- ix. Papel Mayordomo
- x. Papel bond tamaño carta

c) Reactivos y medios de cultivo

- i. Estándar de Mc Farland 0.5
- ii. Agar Mueller-Hinton
- iii. Caldo Trypticase Soya
- iv. Solución Salina al 0.85%
- v. Discos de antibióticos de amikacina, amoxicilina-acido clavunato, ampicilina-sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefamandol, cefazolina, cefepime, cefoperazona, cefotaxima, cefofetan, cefpodoxime, ceftazidima, ceftriaxoma, cefuroxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, levofloxacina, lomefloxacina, mezlicilina, nitrofurantoina, norfloxacina, piperazidina-tazo (a), piperacilina, tetraciclina, ticarcilina-clavunato, tobramicina, trimetoprin-sulfa, trimetoprina.

C. Recolección de muestra.

Las muestras van ser recolectadas en un período de seis meses en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en el Departamento de Escuintla, en la sección de microbiología, primero se procederá a la identificación de la muestra por medio de la

ayuda del aparato AutoScan 4 de MicosScan, seguidamente se tomará una colonia de agar MacConkey y se inoculará en agar tripticasa soya el cual va ser utilizado como un medio de transporte, se incubará 24 horas a 37C y se conservará a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.

D. Transporte de las muestras.

Al término de cada mes se llevarán las muestras las cuales se colocarán en gradillas de duroport dentro de cajas de cartón para ser transportadas hacia el laboratorio Nacional lugar donde se llevará acabo la confirmación de cada una de ellas.

E. Procedimiento para la realización del Test de Difusión por Disco

1. Preparación y Estandarización del Inóculo: En un tubo de ensayo con solución salina agregar pequeñas cantidades del inóculo purificado a fin de ajustar la turbidez a 0.5 de la escala de Mc Farland, por comparación visual con el estándar.

2. Inoculación de las Placas: Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo, introducir un hisopo estéril esperar que este absorba bien el inóculo y seguidamente escurrir el exceso sobre las paredes del tubo de ensayo; colocar un mechero cerca del área de trabajo cubrirse inmediatamente en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo.

3. Aplicación de los Discos de Antibióticos en las Placas inoculadas: Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculadas con pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia de 2 cm entre uno y otro disco teniendo cuidado de no colocar más de seis discos por caja pequeña y 12 por caja grande.

4. Incubación: Incubar las placas invertidas a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados.

5. Lectura de las Placas e Interpretación de Resultados: Después de 24 horas de incubación examinar cada placa y medir los diámetros de inhibición. Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con las Tablas 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I y los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado, según NCCLS.

F. Diseño de Investigación

1. Recolección de muestras y datos, análisis de muestras y detección de cepas de *Escherichia coli* BLEE y BLEA en pacientes que asisten al Instituto Guatemalteco de Seguridad Social.
2. Análisis de Datos e ingreso al programa whonet: tendencias, asociaciones y gradiente de exposición.
3. Recomendaciones de las acciones a tomar.

VII. RESULTADOS

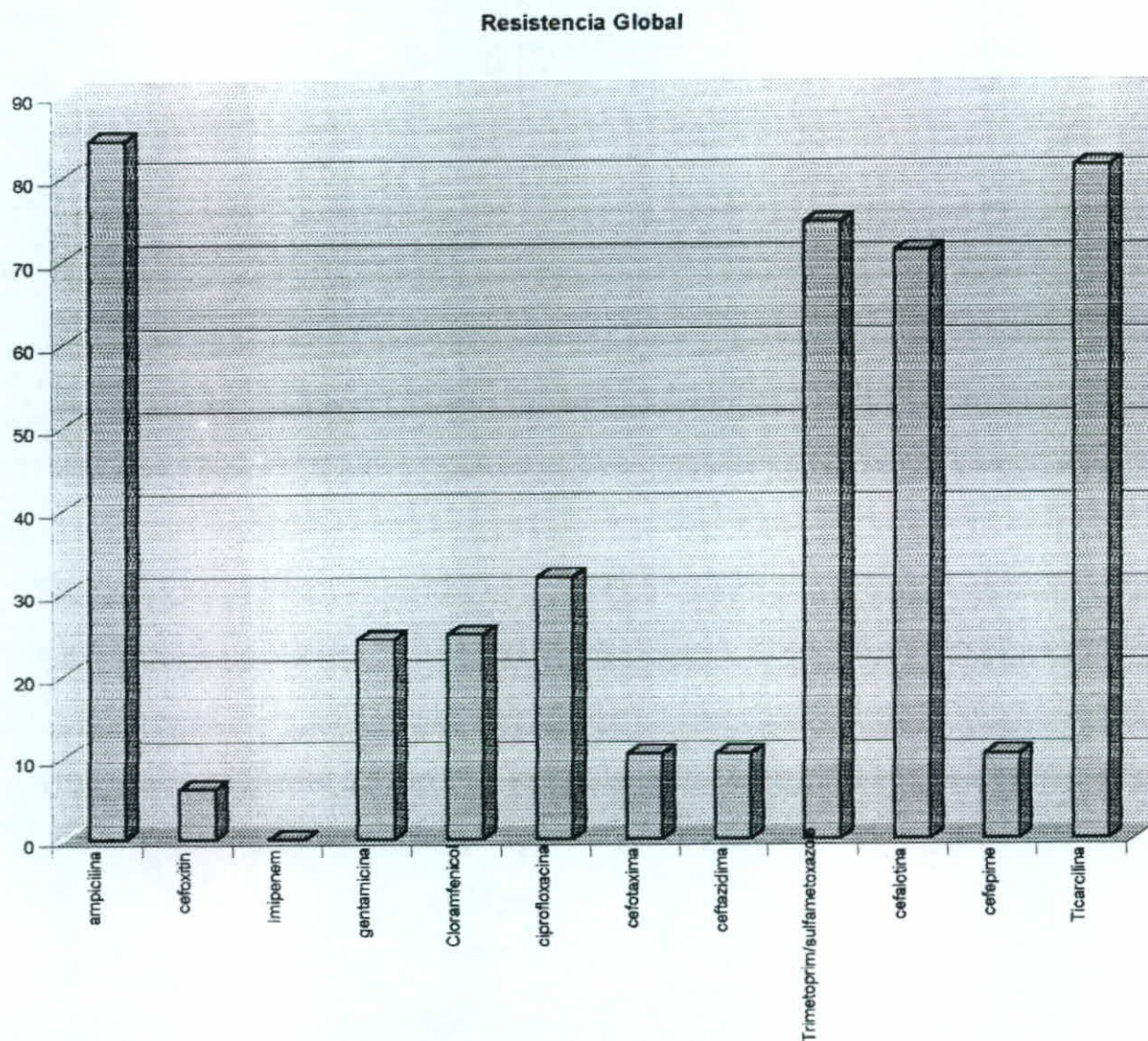
En la tabla 1 se presentan los resultados expresados en porcentaje de 104 muestras analizadas de cepas de *Escherichia coli* las cuales presentan resistencia global con respecto a diferentes antibióticos ensayados con el método de difusión de disco.

Tabla 1 Resistencia Global de Aislamientos de *Escherichia coli* con respecto a antibióticos ensayados por el método Bauer & Kirby

ANTIBIOTICO	% DE RESISTENCIA (n=104)
AMPICILINA	87.5
CEFOXITIN	6.2
IMIPENEM	0
GENTAMICINA	24
CLORANAMFENICOL	25
CIPROFLOXACINA	31.9
CEFOTAXIMA	10.4
CEFTAZIDIMA	10.4
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	74.5
CEFALOTINA	71.1
CEFEPIMA	10.3
TICARCILINA	81.2

Fuente: de datos Experimentales.

GRÁFICA 1 Resistencia Global de Aislamientos de *Escherichia coli* frente a diversos Antibióticos (n=104)



En la gráfica 1 se observa un alto porcentaje de resistencia frente a los antibióticos de: ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefalotina, y ticarcilina

En la tabla 2 se presentan los porcentajes de los servicios del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en la ciudad de Escuintla que obtuvieron mayor resistencia frente a los diferentes tipos de antibióticos a los que fueron sometidos mediante ensayos por el método de Bauer & Kirby, siendo estos la consulta externa y emergencia de pediatría

TABLA 2 Resistencia Global de Aislamientos de *Escherichia coli* por Servicio

SERVICIO	% DE RESISTENCIA	(n=104)
CONSULTA EXTERNA DE MEDICINA	45	
GINECOLOGÍA/OBSTETRICIA	26	
EMERGENCIA DE PEDIATRIA	33	

Fuente: Datos Experimentales.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la resistencia global de aislamientos de *Escherichia coli* por tipo de muestra expresados en porcentaje, las cuales fueron expuestas a diferentes antibióticos.

TABLA 3 Porcentaje de Aislamientos por tipo de Muestra Ensayados por el Método de Bauer & Kirby.

TIPO DE MUESTRA	% DE RESISTENCIA (n=104)
ASPIRADO	8
CULTIVO DE ORINA	82
SECRECIONES	11
LIQUIDOS	3

Fuente: Datos Experimentales

GRÁFICA 3

AISLAMIENTOS POR TIPO DE MUESTRA.



En la gráfica 3 se observan los porcentajes de resistencia por tipo de muestra de las cuales el cultivo de orina es la muestra en la que se observó el mayor porcentaje de resistencia total.

En la tabla 4 se presentan los porcentajes de resistencia total frente a diversos antibióticos de cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasa de espectro extendido.

TABLA 4 Porcentaje de Resistencia total de BLEE encontrada en cepas de *Escherichia coli* mediante el método de Bauer & Kirby.

ANTIBIOTICO	% DE RESISTENCIA (n=104)
AMPICILINA	*100
CEFOXITIN	37.5
IMIPENEM	0
GENTAMICINA	66.7
CLORANFENICOL	50
CIPROFLOXACINA	42.9
CEFOTAXIMA	*62.5
CEFTAZIDIMA	*75
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	100
CEFEPIME	*20
TICARCILINA	*100

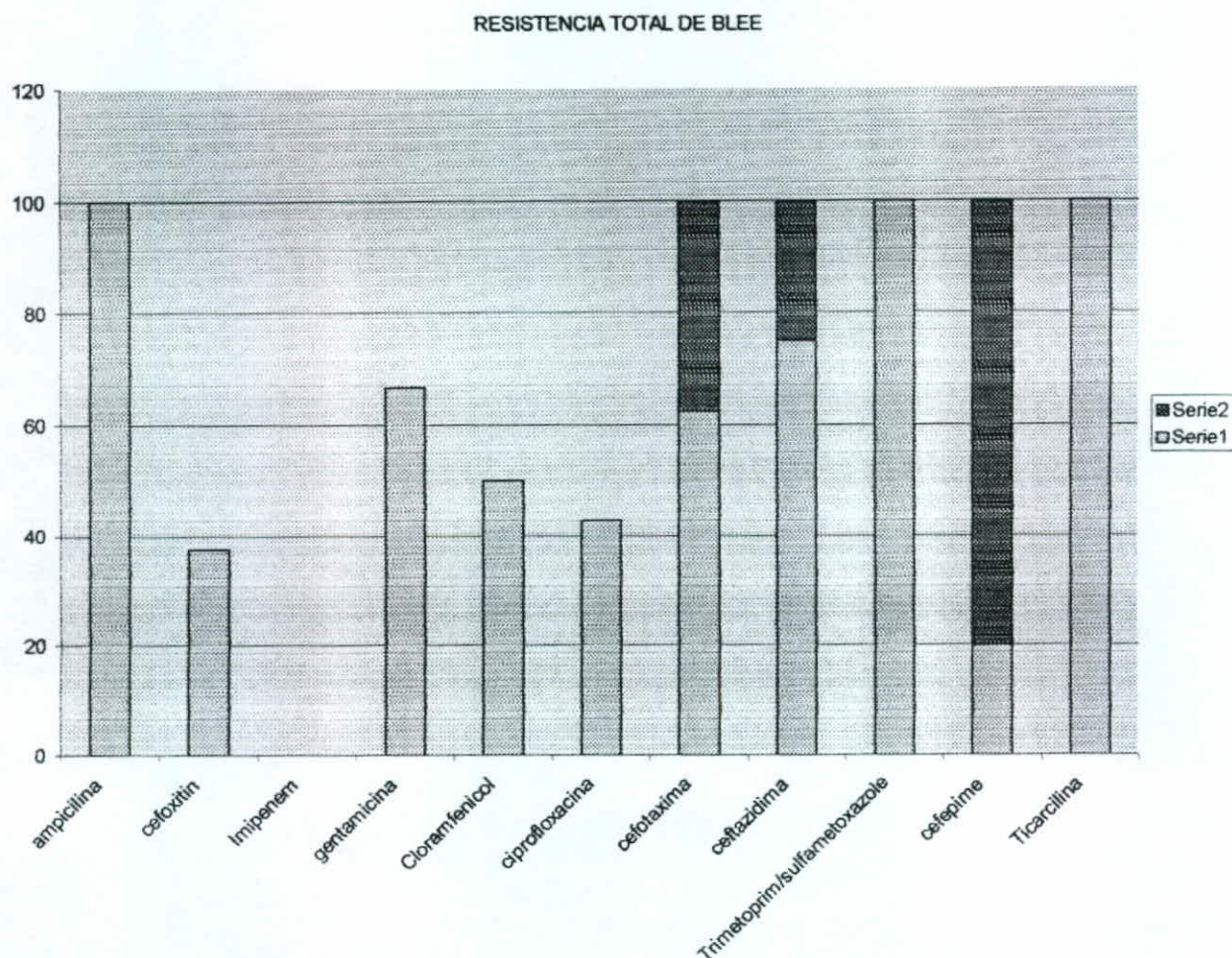
Fuente: Datos Experimentales

* Sin un análisis de BLEE

GRÁFICA 4

Resistencia Total de BLEE

En gráfica 4 se puede observar que las cepas de *Escherichia coli* además de presentar BLEE, presentaron resistencia a los siguientes antibióticos: ampicilina, gentamicina, cloramfenicol, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol y ticarcilina.



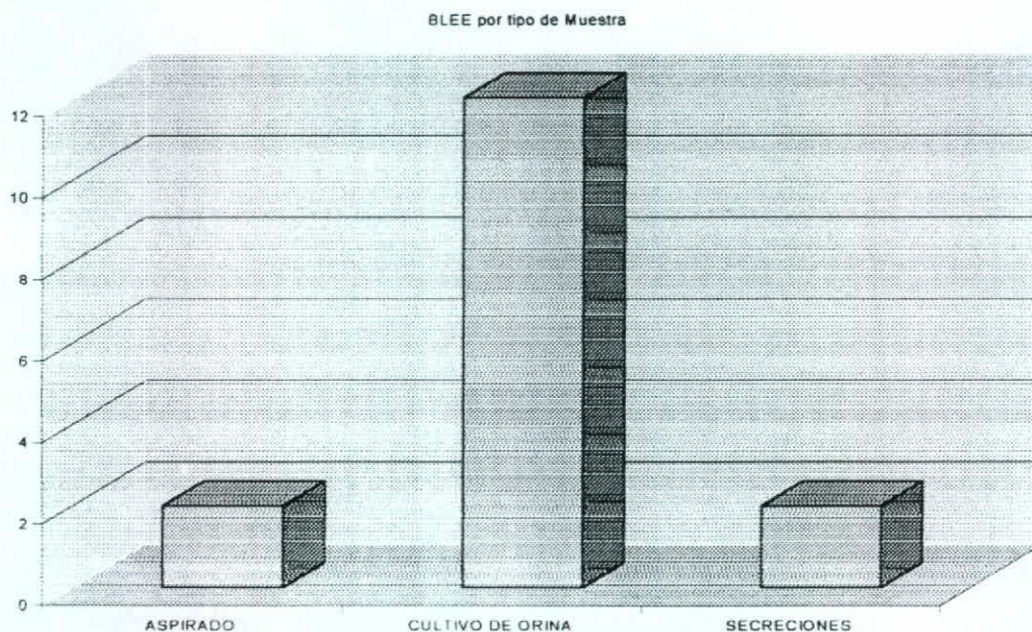
En la Gráfica 4 se puede observar que en la serie 1 se presenta la resistencia *in vitro* de las cefalosporinas cefotaxima, ceftazidima, cefepime, y en la serie 2 se presenta la resistencia *in vivo* de las mismas.

En la tabla 5 se presentan 16 muestras que presentaron BLEE las cuales fueron aisladas de 104 cepas de *Escherichia coli*, estas están ordenadas por tipo de muestra y se puede observar que los tipos de muestras en donde se aislaron más frecuentemente las BLEE fueron los cultivos de orina, de los aspirados y secreciones se obtuvo un solo caso respectivamente.

TABLA 5 **Número de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE por tipo de Muestra.**

TIPO DE MUESTRA	No. DE BLEE	(n=16)
ASPIRADO	2	
CULTIVO DE ORINA	12	
SECRECIONES	2	

Fuente: datos Experimentales



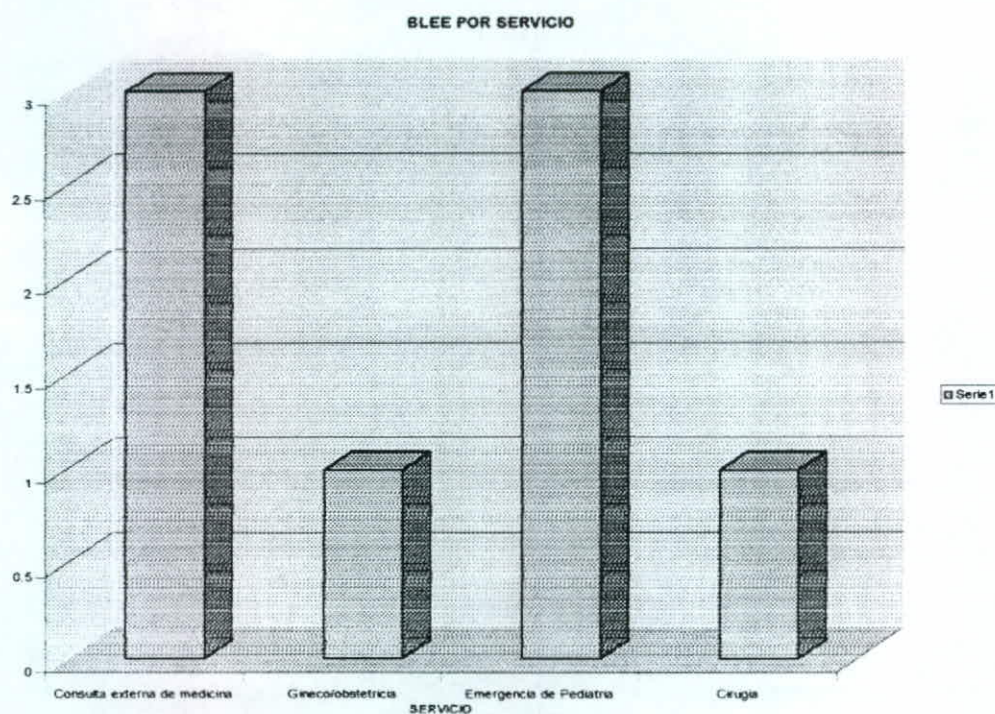
En la tabla 6 se presentan 16 cepas de *Escherichia coli* que presentaron BLEE de las 104 cepas analizadas, aisladas de los diferentes servicios del Instituto Guatemalteco de Seguridad social en la Ciudad de Escuintla.

TABLA 6 Número de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE encontradas en diferentes servicios.

SERVICIO	N. BLEE (n=16)
CONSULTA EXTERNA DE MEDICINA	6
GINECOLOGÍA/OBSTETRICIA	2
EMERGENCIA DE PEDIATRIA	6
CIRUGIA	2

Fuente: Datos Experimentales.

GRÁFICA 6 BLEE POR SERVICIO



En la gráfica 6 se observa los servicios en los que se aislaron cepas productoras de BLEE, además podemos ver que los servicios que presentaron mayor número de BLEE fueron la consulta externa de medicina y la emergencia de pediatría.

En la tabla 7 se presentan las cepas productoras de BLEAS, además los porcentajes de resistencia de estas cepas frente a diversos antibióticos.

TABLA 7 Número de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEAS frente a diferentes antibióticos ensayados mediante el método de Bauer & Kirby.

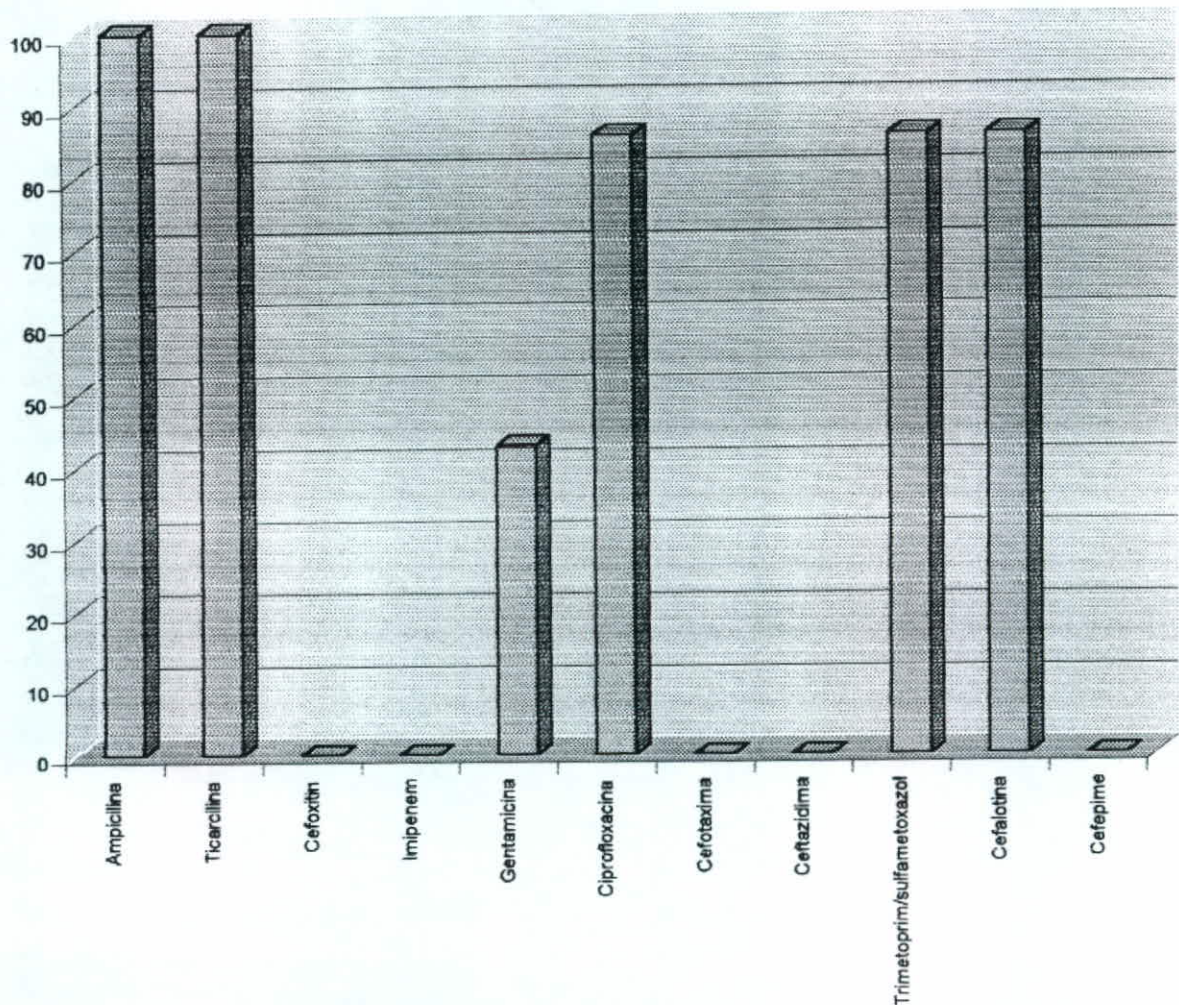
ANTIBIOTICOS	% DE RESISTENCIA (n=104)
AMPICILINA	100
TICARCILINA	100
CEFOXITIN	0
IMIPENEM	0
GENTAMICINA	42.9
CIPROFLOXACINA	85.7
CEFOTAXIMA	0
CEFTAZIDIMA	0
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	85.7
CEFALOTINA	85.7
CEFEPIME	0

Fuente: Datos Experimentales.

GRÁFICA 7

Total Número de cepas productoras de BLEAS

Gráfica 7.
Total Número de cepas productoras de BLEAS



Fuente: datos Experimentales.

En la gráfica 7 podemos observar que estas cepas además de la producción de BLEAS, presentan una amplia resistencia a varios antibióticos no b-lactámicos en los que podemos mencionar a la gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefalotina.

En la tabla 8 se presentan 26 cepas que presentaron BLEA por tipo de muestra de las 104 cepas analizadas, se debe observar que los cultivos de orina fueron las muestras que reportan mayor número de BLEAS.

TABLA 8 Número de cepas de *Escherichia coli* Productoras de BLEA por tipo de muestra ensayadas por el método de Bauer & Kirby

TIPO DE MUESTRA	N. DE BLEAS (n=14)
ASPIRADO	2
CULTIVO DE ORINA	10
SECRECIONES	2

Fuente: Datos Experimentales.

En la tabla 9 se presentan los números de cepas productoras de BLEAS aisladas de los diferentes servicios del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en la ciudad de Escuintla, y se puede observar que los servicios donde se aislaron mayor número de BLEAS fue: consulta externa y emergencia de pediatría

TABLA 9 Número de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEA por servicio ensayadas mediante el método de Bauer & Kirby.

SERVICIO	N. DE BLEA (n=14)
CONSULTA EXTERNA DE MEDICINA	9
EMERGENCIA DE PEDIATRÍA	3
CIRUGÍA	2

Fuente. Datos Experimentales.

En tabla 10 se presentan los porcentajes de resistencia de cepas que no fueron productoras de BLEAS o BLEES.

TABLA 10 Porcentaje de Resistencia en cepas que no presentan BLEA, ni BLEE.

ANTIBIOTICOS	% DE RESISTENCIA (n=104)
AMPICILINA	0
CEFOXITIN	0
IMIPENEM	0
GENTAMICINA	18.4
CLORAMFENICOL	22.2
CIPROFLOXACINA	30.8
CEFOTAXIMA	0
CEFTAZIDIMA	0
TRIMETORPIM/SULFAMETOXAZOL	76.3
CEFALOTINA	65.8
CEFEPIME	8.3
TICARCILINA	0

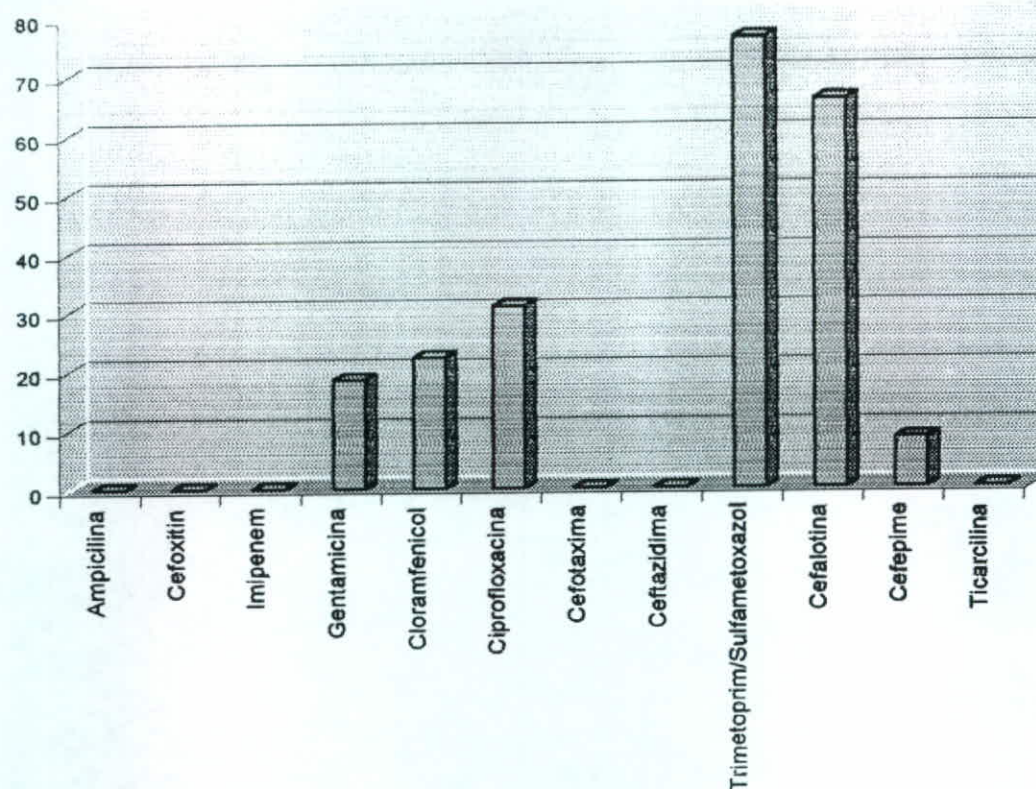
Fuente: Datos Experimentales.

GRÁFICA 10 Resistencia de cepas que no presentan BLEA ni BLEE.

En la gráfica 10 se observa una resistencia común de las cepas de *Escherichia coli* las cuales producen una resistencia normal a diferentes antibióticos a los que fueron sometidas.

Gráfica 10

RESISTENCIA DE CEPAS QUE NO PRESENTAN BLEA NI BLEE



Fuente Datos Experimentales.

En la tabla 11 se presentan el total de casos de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE y BLEA de pacientes que asistieron al Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en la ciudad de Escuintla en un periodo de seis meses.

TABLA 11 Total de Número de casos de resistencia de BLEA y BLEE en cepas de *Escherichia coli*.

TIPO DE RESISTENCIA	N. DE CASOS (n=30)
BLEA	14
BLEE	16

Fuente : Datos Experimentales.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La evaluación de la resistencia antimicrobiana, en cuanto a la presencia de cepas productoras de β -lactamasa de amplio espectro (BLEA), y β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) es importante, ya que brinda información valiosa para conocer la magnitud de esta resistencia y tomar las medidas preventivas sobre este problema.

Se analizaron un total de 104 cepas de *Escherichia coli* de las cuales se presentaron 16 cepas que fueron productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) esto corresponde al 15.4% del total de las muestras analizadas, lo cual se puede observar en la tabla 4, además de la BLEE, presentaron porcentajes altos a diferentes antibióticos así como también la presencia de BLEAS por lo que es un dato muy importante ya que esto obliga a la utilización de nuevos antibacterianos que son más costosos y muchas veces más tóxico que los empleados comúnmente. El mayor número de BLEE aisladas fueron obtenidas de cultivos de orina de pacientes que asistieron a la consulta externa (12 de las 16 cepas aisladas), el número restante (4 de 16 cepas aisladas) corresponden a cepas de muestras de aspirados y de infecciones en sitios quirúrgicos lo cual se puede observar en la tabla 5.

La literatura reporta que la producción de β -lactamasa representa una resistencia antimicrobiana de amplio espectro, en donde está presente una resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación y debido al uso indiscriminado de antibióticos han creado una amplia resistencia, un grupo que se ha visto afectado son los pacientes inmunosuprimidos, diabéticos, hipertensos, y pacientes hematológicos. La mayoría de los datos obtenidos en este estudio corresponden a pacientes que asistieron a la consulta externa de medicina, y urgencia pediátrica.

En la gráfica 6 podemos observar que el mayor número de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE (12 de 16 cepas aisladas) corresponden a pacientes de la comunidad, por lo que se podría inferir que sean pacientes que hayan presentado infecciones urinarias previas y sometidos a tratamientos para la erradicación de éstas, tratamientos que probablemente hayan sido empíricos o no se haya cumplido a cabalidad con el esquema del régimen indicado. Habría que evaluar cada caso para determinar qué presión selectiva se ha ejercido sobre estas cepas de *Escherichia coli* y poder determinar si la aparición de la resistencia bacteriana se debe a transferencia por otras enterobacterias o a la introducción de un plásmido de resistencia.

La resistencia con los antibióticos no β -lactámicos se pueden comparar en las tablas 4, 7 y 10, las cuales muestran un aumento de la resistencia debido a la presencia de las cepas productoras de BLEE y BLEA comparadas con aquellas que no las presentan, por lo que podríamos inferir que el aumento de la resistencia de los antibióticos no β -lactámicos esta relacionada con la presencia de cepas productoras de BLEE o BLEA.

Escherichia coli es el microorganismo que causa infecciones urinarias más frecuentemente y se confirmó que esta bacteria es sumamente capaz de crear resistencia a los antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos ensayados para evaluar la susceptibilidad de cepas de *E. coli* productoras de BLEE que presentaron resistencia fueron: cefotaxima (62.5%), ceftazidima (75%), y cefepime (20%) lo cual se observa en la tabla 4, se debe observar que esta es realmente un falsa resistencia porque estas cepas presentaron BLEE y la resistencia real *in vivo* de estos antibióticos es del (100%) es aquí donde radica la importancia de la determinación de BLEE dentro del laboratorio porque esta nos indica si la bacteria es realmente resistente o susceptible a las diversas cefalosporinas, ya que el médico al desconocer la existencia de esta, trata con antibióticos más fuertes creando una amplia resistencia no solo a cefalosporinas si no que también a los antibióticos de otras familias, aumentando así los costos del tratamiento, y muchas veces los pacientes son que son sometidos a terapias antibióticas por largos períodos causando daño renal, o en el peor de los casos la muerte por la ineficacia de los mismos.

Respecto a las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de material clínico de pacientes hospitalizados (se aislaron 4 de las 16 muestras analizadas), se puede inferir que estos pacientes hayan adquirido esta bacteria dentro del hospital ya que fueron aisladas de secreciones de pacientes que ya tenían más de 72 horas de estar internados.

En la tabla 7 se puede observar que de las cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasa de amplio espectro (BLEA) se obtuvieron un total de 14 casos, de los cuales 12 fueron aisladas de la comunidad y 2 corresponden a aislamientos de pacientes hospitalizados. En la tabla 8 se puede observar que la mayoría fueron aisladas de cultivos de orina y coincide con el porcentaje de BLEE aisladas por lo que se pensaría que estas cepas han sufrido una transferencia de resistencia de una bacteria a otra.

Los antibióticos utilizados en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana que presentaron resistencia a las cepas *Escherichia coli* productoras de BLEA fueron: ampicilina, ticarcilina.

La mayoría de las cepas estudiadas presentaron resistencia a antibióticos β -lactámicos, así como un alto porcentaje de resistencia a los antibióticos de: gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol., obteniendo así una resistencia elevada, esto es alarmante porque se está dando origen a cepas multirresistentes. Un aspecto importante que debemos observar es el servicio donde se aisló el mayor porcentaje de resistencia debido a que los pacientes pertenecían a consulta externa y emergencia de pediatría, se puede decir que todos los pacientes son pacientes que pertenecen a la comunidad, en este tipo de pacientes no se sabe con certeza si adquirieron esta resistencia fuera del hospital ya que no se cuenta el historial médico de los mismos, para saber si estos ya habían sido internados en hospitales Nacionales anteriormente o dentro del mismo IGSS.

Para poder enfrentar la resistencia antimicrobiana, se deben conocer los mecanismos de resistencia, con los datos obtenidos en el laboratorio clínico y conjugados con la experiencia clínica se podrían disminuir los altos índices de resistencia, este último juega un papel fundamental debido a que la prescripción antibiótica en función de tiempo y uso constituyen un factor primordial para producción de la resistencia. El personal médico debe investigar si

el paciente padeció de infecciones anteriormente y si estas han sido tratadas con antibióticos β -lactámicos debido a que la aparición de una cepa de *Escherichia coli* productora de BLEA o de BLEE es muy importante ya que nos indica si está sufrió una transferencia de esta resistencia debido a que BLEE no es un mecanismo propio de las *E. coli* lo cual indica que la debió de adquirir por medio de otras enterobacterias ya que la BLEE normalmente encontrada en cepas de *Escherichia coli* son transmitidas por otras enterobacterias.

IX. CONCLUSIONES

1. Mediante el método de susceptibilidad antibiótica de Bauer & Kirby se aislaron cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de amplio espectro y β -lactamasas de espectro extendido en pacientes que asistieron al Instituto Guatemalteco de Seguridad Social en la ciudad de Escuintla.
2. El mayor porcentaje de β -lactamasa de espectro extendido fue aislado en cultivos de orina de pacientes de la comunidad.
3. El mayor porcentaje de β -lactamasas de amplio espectro fue aislado de cultivos de orina de pacientes de la comunidad.
4. La mayoría de cepas *Escherichia coli* presentaron una alta resistencia a cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación además a los antibióticos de: gentamicina, cloramfenicol, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina, ticarcilina.
5. La resistencia de los antibióticos no β -lactámicos se ve aumentada con la presencia de β -lactamasas de amplio espectro y β -lactamasas de espectro extendido.
6. Existen cepas de *Escherichia coli* dentro del área hospitalaria productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y β -lactamasas de amplio espectro (BLEA).

X. RECOMENDACIONES

1. Que el uso de los antibióticos se base en los resultados obtenidos en el antibiograma y si se inicia un tratamiento empírico, que éste se ajuste seguidamente al agente etiológico aislado y a su respectiva sensibilidad antibiótica.
2. Utilizar de manera racional los antibióticos para prevenir y controlar la resistencia bacteriana.
3. Educar a los pacientes para que cumplan con el tratamiento antibiótico en la dosis y tiempos establecidos.
4. Dentro del hospital ejercer un mecanismo de vigilancia eficaz a través del comité de infecciones nosocomiales para la detección de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE y BLEA y generar medidas de prevención y control.
5. Evitar la automedicación de antibióticos.
6. Tomar en cuenta que la resistencia *in vitro* de los antibióticos β -lactámicos cuando estos presentan BLEE es menor que la que se presenta *in vivo*.
7. Se debe ampliar el número de estudios sobre la resistencia antimicrobiana en nuestro país ya que existe muy poca información sobre este problema.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Bergolio. Antibióticos. 5ta. Ed. Argentina: Panamericana 1993 pp.(9,161).
2. Dubois SK, Marriot MS, Amyes SGB. TEM and SHV-derived extended spectrum b-lactames: relationship between selection, structure, and function. J Antimicrob Chemother 1995; (p. 35:7-32.9).
3. Mims, *et.al.* Microbiología Médica. 2ª ed. España:. Editorial Harcourt Brace, 1999. (p.185).
4. Romero Cabello, Herrera Benavente, Síndrome diarreico infeccioso. Mexico D.F. Editorial médica Panamericana, 2002. (p.93-97).
5. Laurelle L. Etude Bactériologique sur les péritonites par perforation. La cellule 1989. (p.5,60-123).
6. Nataro JP, Kapper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1998. (p.11:142-201).
7. Kauffmann F. The Serology of the *E. coli* Group. J inmunol 1997. (p.57-71).
8. Bray J Isolation of antigenically homogeneous strain of Bact. *Coli* neopolitanum for summer diarrhea of infants, journal of Pathology and Bacteriology 1995, (p.57:239-247).
9. Giles C, Sangster G. Smith J Epidemic gastroenteritis of infants. J Clin Pathol 1955 (p 8:276-281).
10. Neter E, Wesphal O, Luderitz, Gino RM. Demonstration on antibodies against entopathogenic *Escherichia coli* in sera of children of varios ages. Pediatrics 1955, (p. 16:801-808).
11. Zinsser *et. al.* Microbiología. 18ava. Edición Buenos Aires: Panamericana, 1987 (p.690-699).
12. Jones RN, Pfaller MA, Doern GV, *et.al* Antimicrobial activity and spectrum.
13. Weiner J, Quinn JP, Bradford PA. Multiple antibiotic-resistant Klebsiella and *Escherichia coli* in nursing homes. JAMA 1999; (9282:517-523).
14. Investigation of eight broad-spectrum b-lactam drugs: A 1997 surveillance trial in 102 medical center in the United States. Diagn Microbiol infect Dis. 1998 (p. 119:428-430).

15. Rice L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum β -lactamases. *Chest* 2001; 119 (suppl2): 396S
16. Koneman EW, *et al.* *Diagnostico Microbiológico texto y atlas a color*. 5th ed. Editorial médica. Buenos Aires Argentina: Panamericana. 2001. (p. 785-844).
17. Harrison, *et al.* *Principios de medicina Interna*. 12^a edición, México:editorial Interamericana McGraw-Hill, 1991. (p.706-708).
18. P. Murray, "et. al" *Microbiología médica*. Madrid España: Mosby/Doyma libros, 1992 (p.107-109).
19. Nelson, *Tratado de Pediatría* 14^a edición volumen I. España: editorial Interamericana McGraw-Hill. 1992 (p. 880-881).
20. Wesley A. Volk, *Microbiología básica* 7^a edición México editorial Harla, 1992 (p 545-546).
21. American Society for Microbiology. Task force on antimicrobial resistance Report, Washington, DC. SMS 1994.
22. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998; 27 supl 1:32-41.
23. Wong-Beringer A. Therapeutic challenges associated with extended-spectrum, β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella*.
24. Sarde M, *et al.* *Agentes Antimicrobianos Consideraciones Generales*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1994.
25. Salvatierra-González R, Benguigui Y, eds. *Resistencia Antimicrobiana en las Américas; Magnitud del problema y su Contención*, Organización Panamericana de la Salud OPS, 200 (p. 39-60).
26. Quintiliani R, Sahm DF, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, In: *Manual of Clinical Microbiology*, Murray PR, Jo Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (ed.). 7th 1999, (p.1505-1525).
27. Lepper PM, Grusa E, Reichi H, Hogel J, Trautmann M. Consumption of imipenem correlates with β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; (p. 46: 2920-2925).
28. Klugmann K. Resistencia a los Antimicrobianos; Una Amenaza Mundial. 2000 Número Doble (p. 28,29:1-37).

29. Estudios de la Resistencia a los Antimicrobianos. Derechos Reservados. 2001. 3 febrero 2004.

Disponible en [Http://www.who.int/medicines/library/monitor/edm28-29sp.PDF](http://www.who.int/medicines/library/monitor/edm28-29sp.PDF)

30. Cardoza-Amador JI, Pineda-Fuentes MA, Bolado-Martinez E, Cano-Gualito EI. Resistencia Bacteriana: reporte del servicio de medicina interna del Hospital General del Estado en Hermosillo, Sonora, México (1994-1999). *Acta Med Son* 2000; (p. 1: 15-18).

31. Dr. Scope. "educación Médica Continua", Derechos Reservados 2000. 5 febrero del 2004
Disponible en <http://www.contenido.htm>

32. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsushashi S. Trasferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole an cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *serratia marcescens*. *Infection* 1983; (p 11:315-317).

33. Yu WL, Pfaller MA, Winokur PL, Jones RN. Cefepime MIC as a predictor of the extended-spectrum b-lactamase type in *Klebsiella pneumoniae*, Taiwan. *EID*. 2002; (98:1-5).

34. National Committee for Clinical Laboratory Standars. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Aproved standard M7-A4. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standars; Vol 21, N. 1, January 2001.

35. National Committee for Clinical Laboratory Standars. Aproved standard M100S10: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: NCCLS 2000

36. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* (1995; 8:557-584).

37. American Society for Microbiology. Task force on antimicrobial resistance.- Report, Washington, DC. AMS 1995.

38. Black JA, Moland S, Thomson N. A simple disk tes for detección of plasmid-mediated AmpC Production in *Klebsiella*. Abstract D-534. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, 2002.

39. Schiappa, DA, Hayden MK, Matushek MG, et. al Cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infections: a case-control and molecular epidemiologic investigation. *J inf Dis* 1996; (p.174:529-537).

40. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases.

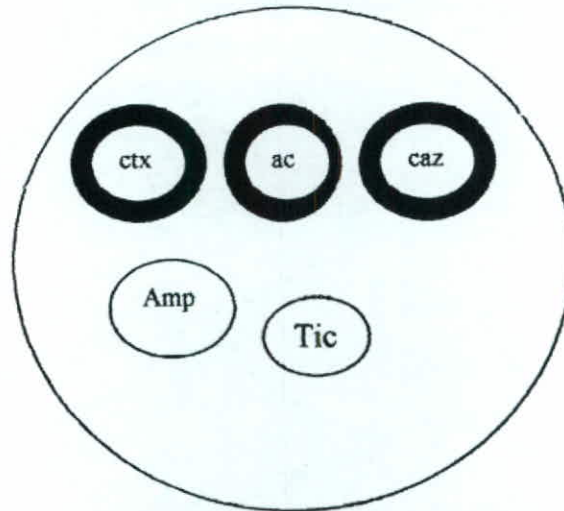
41. Departamento de Biología Molecular. Mecanismos Moleculares de la Resistencia Bacteriana: Tratamiento de la Resistencia Bacteriana. México, 1994. 15 de marzo 2004.

Disponible en [http://www.vol 36 No 4 mecanismosmolecularesderesistencia.htm](http://www.vol36no4molecularesderesistencia.htm).

42. Pineda-Fuentes MA, Cardoza-Amador JI, Bolado-Martínez E, Cano-Gualito La. Susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos de gérmenes aislados en el Hospital General del Estado de Sonora, 1994-1999. Bol Clin Hosp Infant Edo Son 2000; (p. 17:95-101).
43. Stratton CW. Extended-spectrum B-lactamases: Dilemmas in deection and therapy. Antimicorbics and Infectious diseases. Wesletter 1997; 16: 57-61. Irure, J.J. Resistencia antimicrobiana y politica de antibióticos: MRSA, GISA y VRE. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Vol 23, Sup 1. 15 de marzo 2004. Disponible en <http://www.cfnavarra.es/salud/anal/biblio11/bsuple7.html>.

XII. ANEXOS

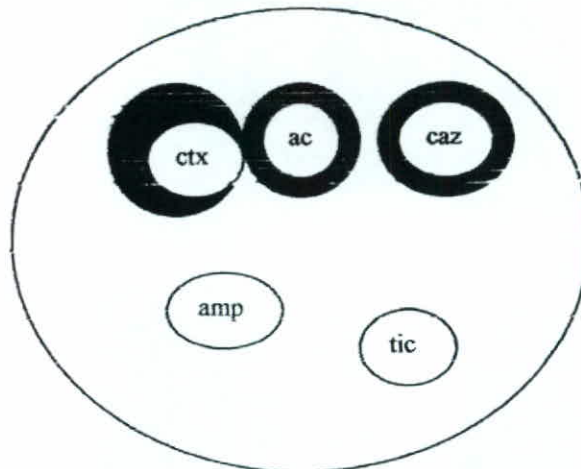
Gráfica 1 Antibiograma de una BLEA



*Cefotaxima susceptible (ctx), ceftazidima susceptible (caz), ácido clavulánico resistente o susceptible (ac), ampicilina resistente (Amp), ticarcilina resistente (Tic).

Las BLEAS debido a una mutación genes pueden convertirse en BLEES

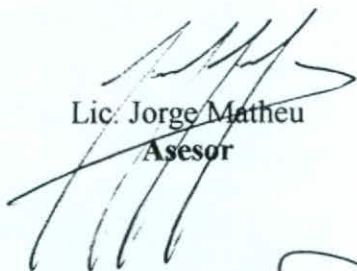
Gráfica 2 Antibiograma de una BLEE.



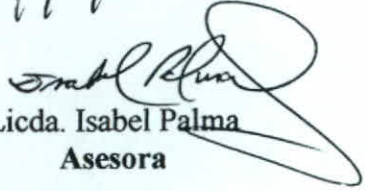
*Cefotaxima susceptible (ctx) y puede observarse una deformación del halo, hacia el ácido clavulánico, ceftazidima susceptible (caz), ácido clavulánico susceptible (ac), ampicilina resistente (Amp), ticarcilina resistente (Tic).



Br. Vanessa Maribel Salazar Pinot
Autora



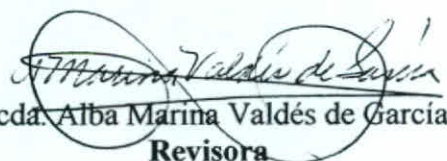
Lic. Jorge Matheu
Asesor



Licda. Isabel Palma
Asesora



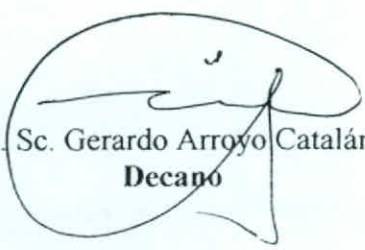
Lic. Martín Gil
Revisor



Licda. Alba Marina Valdés de García
Revisora



Licda. Alba Marina Valdés de García
Directora



M. Sc. Gerardo Arroyo Catalán
Decano