

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

DETERMINACIÓN DE β -LACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO (BLEA) Y β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN ENTEROBACTERIAS PROVENIENTES DE LA UNIDAD PERIFÉRICA DEL INSTITUTO GUATEMALTECO DE SEGURIDAD SOCIAL DE LA ZONA 11

Informe de Tesis

Presentado por

MANUEL ANTONIO NÁJERA CERÓN

Para optar al título de

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2005

INDICE

I	RESUMEN.	2
II	INTRODUCCION.	4
III	ANTECEDENTES.	6
	A. Características de las enterobacterias.	6
	1. Características bioquímicas.	6
	2. Estructura antigénica.	7
	3. Variación genotípica.	8
	4. Acción patógena.	8
	B. Mecanismos de acción de los antibióticos.	9
	C. Principales antibióticos utilizados en enterobacterias.	10
	D. Resistencia bacteriana.	12
	1. Mecanismos genéticos.	12
	2. Mecanismos bioquímicos de resistencia bacteriana.	14
	3. Resistencia antimicrobiana enzimática (β -lactamasas).	15
	4. Esquema de clasificación para enzimas β -lactamasas.	16
	5. β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA).	18
	6. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEAs.	19
	7. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).	22
	8. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEEs.	23
	9. Vigilancia de resistencia a los antibióticos.	28
IV	JUSTIFICACION.	30
V	OBJETIVOS.	31
VI	HIPOTESIS.	32
VII	MATERIALES Y METODOS.	33
VIII	RESULTADOS.	37
IX	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	41
X	CONCLUSIONES.	45
XI	RECOMENDACIONES.	46
XII	REFERENCIAS.	47
XIII	ANEXOS.	51

I. RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un problema que ha adquirido importancia en todo el mundo, ya que es la causa de porcentajes altos de mortalidad que anualmente resulta en gastos millonarios para su erradicación. En Guatemala se han realizado numerosos estudios orientados a resistencia antimicrobiana intra hospitalaria, pero en pacientes ambulatorios, el tema es desconocido, por lo que es de suma importancia sentar un precedente en cuanto a la población en general exenta de ambientes hospitalarios.

En esta investigación, se analizaron los perfiles de susceptibilidad antibiótica de enterobacterias provenientes de diferentes tipos de muestras de pacientes que acudieron a la unidad periférica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de la zona 11, durante los meses de abril a junio del 2004. Se obtuvieron 382 aislamientos de enterobacterias correspondientes a 18 especies. Las más frecuentes, que aportaron el mayor número de aislamientos de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), fueron: *E. coli* con el 72 % y *K. pneumoniae* con el 10 %.

El objetivo de este estudio, fue establecer la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEA y BLEE en muestras biológicas establecidas. Se determinó que la prevalencia de BLEA fue de 61.5 % (intervalo de confianza de 95 %, 56-66) y la prevalencia de BLEE fue de 14.4 % (intervalo de confianza de 95 %, 11-18 %). El aislamiento e identificación de las enterobacterias, se realizó por medio del sistema automatizado MicroScan (Dade Behring). La confirmación de los aislamientos productores de BLEEs y BLEAs se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) mediante el método de difusión de disco. El tipo de muestra en donde se observó el mayor número de aislamientos con resistencia antibiótica, fue el cultivo de orina, con un 57 % de casos positivos para BLEA y un 13 % para BLEE.

Se determinó, que la mayor resistencia observada dentro de la lista de antibióticos evaluados para esta investigación, fue exhibida principalmente en aquellos antibióticos que tienen una amplia distribución y fácil acceso a la comunidad. Entre las familias de antibióticos que más resultaron afectadas por la producción de BLEAs y BLEEs tenemos al grupo de penicilinas, principalmente Ampicilina.

En cuanto al grupo de antibióticos β -lactámicos, la familia de cefalosporinas, en el caso de BLEAs, presentó una efectividad aceptable excepto con las de primera generación, principalmente Cefalotin. De las cefalosporinas de 2da, 3ra, y 4ta, generación se obtuvo muy buena actividad antimicrobiana, no así para las cepas productoras de BLEEs, en donde se encontró una resistencia total. Se determinó que la familia de monobactames es efectiva contra cepas de resistencia intermedia como BLEAs pero inútil contra BLEEs. Imipenem fue el antibiótico β -lactámico con mejor efectividad antimicrobiana, incluso en comparación ante antibióticos no β -lactámicos

Respecto al grupo de antibióticos no β -lactámicos, la familia de los aminoglucósidos, fue la más efectiva, constituyendo la segunda opción en donde mejores resultados de susceptibilidad se obtuvieron, con relación del total de antibióticos evaluados. Siendo principalmente Amikacina, el segundo en la lista después de Imipenem, tanto en antibióticos β -lactámicos como no β -lactámicos.

II. INTRODUCCION.

Para sobrevivir en la presencia de antibióticos, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia. Uno de los más eficaces y más esparcidos es la síntesis de enzimas que desactivan los antibióticos. La producción de estas enzimas generalmente se debe a la adquisición de genes provenientes de otras bacterias, por transferencia "horizontal" (es decir, de una bacteria a otra perteneciente a una especie o a un género diferente por oposición a la transferencia "vertical" de una generación a la siguiente). Las opciones terapéuticas en las cuales se ve afectada la eficacia de los antibióticos, se debe principalmente a cualquier tipo de resistencia que adquiere la bacteria. Las BLEAs, corresponden a un mecanismo de resistencia enzimático de la bacteria contra los antibióticos β -lactámicos. Una bacteria al tener como mecanismo de resistencia a las BLEAs, hace que las opciones en cuanto a tratamiento con antibióticos, se reduzcan aun más, cuando éstas mutan a BLEEs.

Un grupo mayoritario de antibióticos, utilizados ampliamente en infecciones por enterobacterias en diferentes partes anatómicas del cuerpo humano, son los β -lactámicos, entre los que destacan las penicilinas y cefalosporinas. El conocer los mecanismos de resistencia *in vitro* en las bacterias nos permite determinar la evolución de la resistencia y proponer alternativas para controlar este problema. Debido a que en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), se atiende a una gran cantidad de pacientes ambulatorios, se buscará establecer el comportamiento de las bacterias BLEAs y BLEEs encontradas en los aislamientos de dicha institución, con respecto a los diferentes antibióticos utilizados para infecciones causadas por enterobacterias.

Los pacientes que se exponen a periodos prolongados de hospitalización, adquieren por contacto con el ambiente, un grado considerable de resistencia bacteriana en las infecciones que presentan, por lo que es más común que se desarrolle la resistencia bacteriana en dichos establecimientos. En pacientes ambulatorios, como los que acuden a la unidad periférica del IGSS de la zona 11, este comportamiento, no es común observarlo, por lo que es de suma importancia establecer la prevalencia y porcentaje de enterobacterias productoras de BLEEs y BLEAs en la población.

Para la realización de esta investigación se recolectaron cepas de enterobacterias aisladas de muestras de todo tipo (excepto coprocultivos), provenientes de la unidad periférica del IGSS de la zona 11, a las cuales se le efectuó su confirmación y se le estableció su perfil de multirresistencia en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Salud (LNS).

III. ANTECEDENTES

Las enterobacterias constituyen una amplia familia de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos que no forman esporas, y que pueden o no tener flagelos peritricos. La formación o la producción de cápsula esta limitada a los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* (1).

Estos microorganismos tienen pocas exigencias nutritivas y cierta resistencia a agentes externos. Son especies que pueden habitar en el intestino grueso del hombre y animales, suelos, agua, y material en descomposición. Algunas de estas especies se encuentran como saprofitos en el medio ambiente, y la gran mayoría esta asociada con el hombre y animales constituyendo una gran variedad de la microbiota aerobia Gram negativo que coloniza el tubo digestivo. En ciertas ocasiones estos microorganismos pueden producir procesos patológicos intra o extra intestinal (2- 4).

Las enterobacterias en general pueden causar daño al huésped, cuando éste altera su condición normal brindando a la bacteria un ambiente perfecto para que produzca enfermedades tales como abscesos, neumonía, infecciones en las vías urinarias, intestinales y de heridas, meningitis y septicemia. Por lo que son responsables de muchas de las infecciones oportunistas. Junto con los bacilos Gram negativo no fermentadores constituyen la causa más importante de infecciones hospitalarias (1-3).

Los principales géneros de la familia Enterobacteriaceae son: *Shigella*, *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Cedecea*, *Koserella*, *Arenilla* y *Tatumella* (3, 5)

A. Características de las enterobacterias.

1. Características bioquímicas.

Las enterobacterias se definen como bacilos Gram negativo aerobios y anaerobios facultativos de 2 a 4 μm de longitud por 0.4 a 0.6 μm de ancho, con extremidades redondas. Pueden presentar movilidad gracias a que en algunos casos se cuenta con flagelación peritrica, no producen oxidasas, pero reducen los nitratos y descomponen la glucosa por fermentación (1, 6).

Estas características les permiten a las enterobacterias ser separadas de otras familias de bacilos Gram negativo, en especial de la familia *Vibrionaceae* (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*), bacilos curvos con flagelación polar, aerobios y anaerobios facultativos, que son oxidasa positiva y descomponen la glucosa por fermentación, y de la familia *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), constituida por bacilos móviles con flagelo polar, aerobio estricto, que son oxidasa positivos y atacan la glucosa por oxidación (1,6).

La mayoría de métodos empleados en el diagnóstico de enterobacterias se basan en la fisiología bacteriana; con el transcurso del tiempo se han ido desarrollado una gama de pruebas bioquímicas para identificar la especie causante de la patología. Cada especie tiene características específicas (Anexo 1) (3, 7-9).

2. Estructura antigénica.

Entre las estructuras antigénicas presentes en las bacterias que producen estímulos inmunológicos en el hospedero, se pueden mencionar las siguientes:

- a) Antígeno somático o antígeno O: se refiere a la pared celular, la cual está constituida por una fina capa de peptidoglucano, recubierta por la membrana externa compuesta de lipopolisacáridos, que es común en la mayoría de bacilos Gram negativo (1).
- b) Antígeno capsular o antígeno K: algunas especies presentan antígenos superficiales o antígenos k, de naturaleza polisacárido, ya en forma de cápsula bien definidas (*E. coli*, *Klebsiella* sp.) o de una fina capa mucosa (antígeno M o mucoide de *Salmonella*, antígeno Vi de *S. typhi*), que recubren el antígeno O. Interviene en la acción patógena por sus propiedades antifagocitarias (2, 10).
- c) Antígeno flagelar o H: cepas móviles que presentan antígenos flagelados proteicos y termolábiles, de importancia en la clasificación de serotipos (1).
- d) Antígeno de las fimbrias o antígeno F: son antígenos proteicos relacionados con la capacidad de adherencia en las células epiteliales (1).

3. Variaciones genotípicas.

Un comportamiento frecuente en enterobacterias es la aparición de variaciones genotípicas por mutación o mecanismos de transferencia genética que pueden afectar tanto la constitución antigénica como los caracteres bioquímicos. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser auto transferibles entre bacterias (1).

Estos fenómenos de variación son importantes, pues permiten explicar las dificultades que existen en la clasificación de las enterobacterias, ya que los géneros son difíciles de delimitar (1, 10).

4. Acción patógena.

Las enterobacterias presentan los siguientes factores determinantes de patogenicidad:

- a) Antígenos estructurales de superficie, antígenos capsulares (antígenos K) y fimbrias (antígenos F) que actúan por sus propiedades antifagocitarias, o de seroresistencia o su capacidad de adherencia (1).

También algunas enterobacterias pueden desarrollar glicocalix que les permiten adherirse a materiales inertes (catéteres, prótesis) y expresar su acción patógena (1).

- b) Bacteriocinas: Son proteínas que presentan propiedades tóxicas frente a cepas de la misma especie o de especies relacionadas que les facilita la colonización de las mucosas al inhibir el desarrollo de especies relacionadas. Algunas cepas de enterobacterias (*E. coli*, *K pneumoniae*, *S marcescens*) producen Bacteriocinas (1).
- c) Endotoxinas: algunas cepas producen enterotoxinas que actúan ya sea por acción tóxica directa sobre las células del epitelio intestinal o del endotelio vascular (enterotoxinas citotóxicas) o produciendo un estímulo funcional, generalmente a través de la adenilciclasa (enterotoxinas citotóxicas). Las enterotoxinas mejor conocidas son las de *E. coli*, pero también se han señalado en otras enterobacterias (*Salmonella*, *Shigella*, etc.) (1, 6).

B. Mecanismos de acción de los antibióticos.

Los antibióticos son sustancias químicas sintetizadas por microorganismos que poseen acción antimicrobiana. Estos agentes antimicrobianos se pueden clasificar según su origen, efecto antimicrobiano, espectro de actividad y mecanismo de acción (11-12).

1. Origen:

- Naturales: se obtienen a partir de microorganismos (hongos, bacterias, etc.).
- Sintéticos: se obtienen totalmente por síntesis química.
- Semisintéticos: se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos (11-12).

2. Efecto:

- Bacteriostático: la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano. Sirven para complementar los mecanismos defensivos del huésped.
- Bactericida: su acción es letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados (11-12).

3. Espectro de actividad:

- Amplio: actúan sobre un gran número de especies microbianas (ej. TETRACICLINA).
- Intermedio: actúan sobre un número limitado de microorganismos (ej. MACROLIDOS).
- Reducido: actúan sobre un pequeño número de especies microbianas (ej. POLIMIXINA) (11-12).

4. Mecanismo de acción:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad celular.
- Inhibición de la síntesis proteica.
- Inhibición de la síntesis de ADN y ARN (Anexo 2) (11-12).

C. Principales antibióticos utilizados contra enterobacterias.

Las penicilinas y las cefalosporinas, tienen en común un anillo cíclico β -lactámico que a la vez es el talón de Aquiles de estos compuestos.

- 1. Penicilinas:** Compuestas por un anillo β -lactámico unido a un anillo de tiazolidina con una cadena lateral que les confiere diferentes características. Al manipular la cadena, se logra modificar a los compuestos y obtener diferentes clases penicilinas. Algunas bacterias poseen enzimas llamadas β -lactamasas, que alteran el anillo β -lactámico y logran inactivar el medicamento. Estos fármacos actúan alterando la síntesis de pared bacteriana, inhibiendo enzimas que crean uniones peptídicas como: transpeptidasa, carboxipeptidasa, endopeptidasa; conocidas como proteínas unidoras de penicilinas (PBP) y activando el sistema autolítico endógeno. Tienen efecto principalmente contra bacterias Gram positivo. Existen penicilinas naturales como la benzilpenicilina (penicilina G), fenoximetil penicilina (penicilina V); semisintéticas resistentes a las penicilinasas como: meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina; y de espectro extendido como: ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina. Las carboxipenicilinas y ureidopenicilinas tienen incremento de actividad contra Gram negativo. (13-14).
- 2. Cefalosporinas:** Se componen de un anillo β -lactámico unido a uno de dihidrotiazina. El mecanismo de acción es similar a de las penicilinas, interfiriendo con el mecanismos de síntesis de la pared bacteriana, además de su acción contra las PBP. Las modificaciones sobre los anillos, determinan las diferentes generaciones que existen de cefalosporinas, dando lugar a las de primera, segunda, tercera y cuarta generación presentando cada una diferente espectro de acción. Las cefalosporinas de primera generación tienen buena actividad contra microorganismos Gram positivo, pero baja actividad contra Gram negativo (cefalotina, cefazolina). Las de la segunda generación son estables contra ciertas β -lactamasas incrementando su actividad contra Gram negativo. Su actividad se extiende a *Enterobacter* y *Serratia*. No son activas contra *Pseudomonas* (13-14).

Las de tercera generación son menos activas que las de primera generación en relación a bacterias Gram positivo siendo más activas contra la familia *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*. Presentan más estabilidad frente a β -lactamasas. Su espectro incluye algunos bacilos Gram negativo, además de *Pseudomonas*. Los de cuarta generación tienen un espectro de acción, que incluye la mayoría de bacterias Gram positivo y negativo y *Pseudomonas*. La alteración de las PBP, junto con los cambios de la pared externa de la bacteria (pérdida de canales o porinas), son los mecanismos responsables de la resistencia a este grupo farmacológico. La cefepima y la ceftiproma son cefalosporinas de la cuarta generación, su diferencia con las de tercera generación radica en ser más estables a la hidrólisis de las β -lactamasas e inducen débilmente las enzimas de esa índole. De este modo actúan contra muchas enterobacterias resistentes a otras cefalosporinas, pero siguen siendo sensibles a otras, que expresan β -lactamasas mediadas por plásmidos de espectro extendido (13-14).

3. Monobactam (Aztreonam): Es un β -lactámico con anillo monocíclico. Tiene actividad limitada contra aerobios Gram negativo (parecida a aminoglicósidos, sin ser nefrotóxico). Indicado en cistitis, pielonefritis y en algunos pacientes con alergia a las penicilinas (13-14).

4. Carbapenemes: Son antibióticos naturales, que se caracterizan por poseer una elevada eficacia contra microorganismos Gram positivo y estabilidad frente a las β -lactamasas.

El imipenem es un antibiótico, que no se hidroliza por la acción de β -lactamasas pues poseen buena afinidad contra PBP de bacterias Gram positivo y Gram negativo, además de actividad contra una gran variedad de anaerobios. Son potentes inductores de cefalosporinasas. Es el antimicrobiano con mayor espectro que se conoce, es capaz de actuar contra cocos y bacilos Gram positivo y Gram negativo, aerobios y anaerobios, de importancia clínica. Entre los microorganismos que presenta resistencia natural están: *P. maltrophilia*, *Flavobacterium*, *Chlamydia*, *Mycoplasmas*, *Mycobacterium*, *Enterococo faecium* y *E. faecalis*, otros microorganismos tales como: *P. aeruginosa*, *Estafilococo Coagulasa Negativa* y *B. fragilis* pueden desarrollar resistencia adquirida e

inducir la aparición de b-lactamasas en especies como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomona* y otras bacterias (15).

Se indican en infecciones del tracto urinario (ITU) complicadas, pielonefritis complicadas e infecciones severas por *Pseudomonas*. Puede haber sensibilidad cruzada con penicilinas, elevación de enzimas hepáticas y ocasionalmente flebitis asociada con su uso (13).

- 5. Inhibidores de las B-lactamasas:** son llamados inhibidores suicidas. Se unen a la enzima cambiando su estructura e inhibiéndola. Entre estos podemos mencionar al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (15).

D. Resistencia bacteriana

1. Mecanismos genéticos.

Las mutaciones constituyen la base fundamental de la variabilidad genética, estos mecanismos aumentan y aceleran de forma considerable los procesos biológicos de diversificación y de evolución (16).

A nivel molecular, una mutación es un cambio en la secuencia de nucleótidos de ADN, con lo cual se modifica la información contenida en la molécula y da por resultado la formación de una proteína alterada. Las mutaciones bacterianas espontáneas, que ocurren durante condiciones normales de desarrollo, se presentan en la proporción de 1 en 10^6 ó 10^{10} bacterias por generación, lo cual significa que solo una célula bacteriana de cada diez mil millones, sufre comúnmente un cambio mutacional de alguna clase (16).

Esta transferencia evolutiva puede llevarse a cabo mediante tres mecanismos distintos que son:

- a) **Conjugación:** Es un tipo de recombinación genética cuyo resultado es la formación de un nuevo individuo que deriva algunos de sus genes de dos antecesores genéticamente diferentes. La conjugación es un importante mecanismo de adquisición de resistencia microbiana y consiste en el pasaje de genes (determinantes R) desde una bacteria resistente a una sensible, mediante acoplamiento directo entre las bacterias por la formación de un Pili sexual (16).

Para que ocurra la conjugación entre bacterias y la formación del Pili sexual, es necesaria la intervención de un grupo de genes denominado factor de transferencia de la resistencia, sin el cual no pueden realizarse los procesos (16).

El complejo determinante R, más el factor de transferencia de la resistencia es conocido como factor R. La aparición de resistencia por factores es muy importante entre bacterias Gram negativo, en especial entre enterobacterias (16-19).

- b) Transducción: es la transferencia de un bacteriófago que sirve como transmisor, de una pieza de ADN de una bacteria a otra. Generalmente, sólo se transporta mediante un fago temperado, un gen de una célula bacteriana a otra por ciclo (16, 19).
- c) Transformación: Es cuando el ADN de un bacteria, se incorpora a la estructura genética de otro organismo, estableciendo un genotipo nuevo (16, 19).

En el proceso de transformación, las bacterias sensibles pueden incorporar ADN del medio ambiente y si este posee genes que codifican para resistencia, la bacteria se convierte en resistente para uno o más antimicrobianos. El origen del ADN del medio ambiente radicaría en el hecho de que algunas bacterias, en ciertas fases de su crecimiento, son capaces de excretar ADN. La mutación puede aparecer también por cambios en el cromosoma debidos al azar o a la influencia de agentes físicos o químicos y, de hecho, no necesariamente debidos a la exposición al antimicrobiano, como se demuestra por la observación de que muchos microorganismos aislados antes de la aparición de los antibióticos han presentado mutaciones, que los han hecho insensibles a los mismos (17).

Aunque el antimicrobiano no es el causante de la mutación, tiene, sin embargo, un papel importante en la selección de las cepas resistentes, ya que cuando el antimicrobiano se administra a un paciente colonizado en el que existen cepas sensibles y otras con mutaciones (cepas resistentes), el antimicrobiano eliminará a los microorganismos sensibles dejando a los resistentes (17).

Entre los microorganismos capaces de inducir la producción de enzimas β -lactamasas, en otras bacterias que no presentan resistencia alguna, están: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por este mecanismo se produce resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, penicilinas y aminoglucósidos (17-18).

2. Mecanismos bioquímicos de resistencia bacteriana.

En la naturaleza se encuentran bacterias que son, por sí mismas, resistentes a los antibióticos, y bacterias que pueden llegar a desarrollar mecanismos de resistencia que pueden deberse a mutaciones en diversos genes, o a la adquisición de material genético heterólogo (20).

Entre los mecanismos de resistencia que las bacterias utilizan para evadir la acción de los antibióticos están:

- Mediante el empleo de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano. Se trata de una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que pueden eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos (20-22).
- Provocando una disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (20-22).
- Induciendo la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos. De esta forma la producción de enzimas β -lactamasas, inhiben a los antibióticos β -lactámicos. En años recientes la aparición de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) que incluyen a las antibetalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), han dificultado el uso de estos antibióticos (20-22).
- Un último mecanismo, es el que algunas bacterias ejercen contra antibióticos, cuando estos se unen a proteínas esenciales en la bacteria. La resistencia bacteriana se produce cuando el microorganismo modifica dichas proteínas, cambiando su función o produciendo enzimas distintas (20-22).

3. Resistencia antimicrobiana enzimática (B-lactamasas)

Se considera que la resistencia microbiana ocurre por la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible. Este hecho involucra necesariamente la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo, que se transmite a sus descendientes, por lo cual, resultan también insensibles al antimicrobiano en cuestión (12).

Si bien cualquier microorganismo puede desarrollar resistencia a los antimicrobianos, este fenómeno ha sido estudiado más ampliamente en las bacterias, por lo que ha sido necesario el empleo de un sistema de clasificación (11).

En el caso de las β -lactamasas dicho esquema se basa en la funcionalidad de sus características. A continuación se presentan los tres grupos mayoritarios de enzimas que se definen por sus perfiles inhibitorios y el empleo de diferentes sustratos:

Grupo 1: cefalosporinasas, que no son inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico (11).

Grupo 2: penicilinasas, cefalosporinasas, y β -lactamasas de amplio espectro (BLEAs) que generalmente son inhibidas por inhibidores que operan en sitios activos directos de las β -lactamasas.

Grupo 3: meta- β -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenems, que son pobremente inhibidas por la mayoría de moléculas β -lactámicas. Las características funcionales para este grupo, han sido correlacionadas con estructuras moleculares de secuencias de aminoácidos de β -lactamasas conocidas mediante electroforesis (11).

Estas β -lactamasas han sido designadas por el comité internacional de bioquímica para nomenclatura como enzimas que hidrolizan amidas, aminas y otros tipos de enlaces entre carbono y nitrógeno, separadas en base al sustrato (amidas cíclicas). Estas enzimas son la causa mayoritaria de la resistencia bacteriana contra los antibióticos β -lactámicos, y han sido tema de extensas investigaciones en microbiología, bioquímica y genética (11).

Hasta el momento, se han investigado y descrito, más de 190 proteínas bacterianas con la habilidad de interactuar con la variedad de moléculas β -lactámicas que pueden servir

como sustrato o como inhibidor. Debido a la diversidad de características enzimáticas de las β -lactamasas, se han realizado innumerables fundamentos con el fin de categorizar estas enzimas según sus atributos bioquímicos (11).

4. Esquema de clasificación para enzimas B-lactamasas:

Las β -lactamasas fueron clasificadas cuando las cefalosporinas (β -lactamasas con altos rangos de hidrólisis de cefalosporinas), fueron diferenciadas de las penicilinasas (enzimas con buena actividad hidrolítica de penicilinas) (11).

El esquema de clasificación funcional, que gran cantidad de investigaciones utilizan para nombrar a las β -lactamasas, sigue teniendo buena aceptación hoy en día. Este se basa en algunas clasificaciones anteriores tales como:

- a. Clasificación según Sawai (1968): se basó en la respuesta que las penicilinasas y cefalosporinasas producían al ponerse en contacto con antisueros que emplean un discriminador adicional (11).
- b. Esquema según Richmond-Sykes (1973): incluyó a todas las β -lactamasas provenientes de bacterias Gram negativo, de esa época, clasificando a las enzimas en 5 grupos mayoritarios basados en sus perfiles de sustrato (11).
- c. Extensión del esquema de Richmond y Sykes por Sykes y Matthew (1976): hizo énfasis en el plásmido-mediador de las β -lactamasas que podía diferenciarlas mediante el empleo de un campo isoelectrónico (11).
- d. Esquema de Mitsuhashi e Inove (1981): se añadió la categoría de β -lactamasa hidrolizante de cefuroxime a la clasificación de penicilinasas y cefalosporinasas que se venía manejando (11).
- e. Esquema según Bush (1989): incluyó enzimas de bacterias provenientes de todas las fuentes de aislamiento, siendo éste el primer esquema que correlacionó sustratos y propiedades inhibitorias con la estructura molecular del enzima (11, 23).

Existió una clasificación basada en los rasgos genotípicos con los que cuenta la bacteria, pero enfrentó el problema de que no consideró los puntos de mutaciones en los que se puede alterar grandemente la especificidad del sustrato e inhibir la susceptibilidad,

cambiando el grupo al que una enzima fue asignada. Por consiguiente, las β -lactamasas fueron clasificadas por la secuencia de aminoácidos. Esta clasificación fue propuesta por Ambler (11, 23).

Esta clasificación es estable, como se refleja en las relaciones fundamentales y no puede distorsionarse por las mutaciones. Dicho esquema (secuencia-base) tiene la simplicidad, de reconocer sólo cuatro clases, designadas de la A a la D. Las clases A, C y D comprenden los grupos distintos evolutivamente de las β -lactamasas serina, y la clase B contiene el tipo Zinc (11, 23).

En la actualidad existe una buena relación entre las clases reconocidas fenotípicamente por Bush y las que emplean el esquema molecular. La clasificación de un modelo de β -lactamasa ideal, debe de incluir todos los parámetros discutidos anteriormente. Sin embargo, esto no siempre puede ser posible y no es necesario que lo sea. Entre los requerimientos mínimos deben incluirse los perfiles de los sustratos para penicilinabensatidica y cefalotidime o cefalotin, como referencia en sustratos. Las opciones de sustratos adicionales podrían variar acorde a las características de cada enzima. A menudo, los perfiles del sustrato de un enzima modelo, sugieren que la resistencia fenotípica de la producción de estos organismos indica que solo un enzima esta presente (24).

Si un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* es resistente a las cefalosporinas de espectro extendido pero susceptible a inhibidores β -lactámicos combinados; en presencia de β -lactamasa de espectro extendido, el perfil del sustrato debe incluir cefotaxime, ceftazidime, y aztreonam como sustrato discriminante obteniendo la secuencia enzimática, es posible que la clase molecular de una enzima pueda saberse antes de que se realice una caracterización completa. Si la clase D de las penicilinasas es identificada, dentro de los sustratos se debe incluir oxacilina, y cloxacilina. Los perfiles inhibitorios deben incluir ácido clavulánico como requerimiento mínimo. Se deben agregar otros inhibidores, para describir las características completas del enzima. Las enzimas que hidrolizan a los Carbapenemes, se pueden inhibir por la acción de EDTA y pCMB (12).

Estudios anteriores han determinado la presencia de β -lactamasas plasmídicas de amplio espectro, siendo dos tipos los mayoritarios. Las de la familia SHV y TEM, de las cuales se derivan nuevas β -lactamasas (24).

5. B-lactamasas de espectro ampliado (BLEA).

Este tipo de enzimas se derivan de las β -lactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV-1), con la diferencia de que además de que confieren resistencia a amino y ureidopenicilinas, amplían el espectro hidrolítico a cefalosporinas de segunda generación y monobactames. Las BLEAs hidrolizan amino y ureidopenicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas) y monobactámicos; no hidrolizan carbapenemes (24).

La acción hidrolítica de estas enzimas se ve contrarrestada por los inhibidores de las β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). En la clasificación de Bush *et al* de 1995, se las engloba en el grupo 2be, debido a sus características de hidrólisis (oxiimino- β -lactamasas) y a su origen en las β -lactamasas plasmídicas clásicas (TEM y SHV pertenecientes al grupo 2b) (24-25).

Otro tipo de BLEAs, son las derivadas de TEM o SHV que confieren resistencia a inhibidores de las β -lactamasas. Se diferencian de las β -lactamasas 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 β -lactamasas. Pertenecen al grupo 2br de la clasificación de Bush *et al* de 1995 (24).

Recientemente se han descrito nuevas β -lactamasas 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 β -lactamasas, también de espectro ampliado, son las carbapenemasas descritas recientemente en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*. Al contrario de las BLEAs, las β -lactamasas *ampC* no se inhiben por ácido clavulánico (24-25).

Las β -lactamasas de tipo TEM, incluidas en los grupos 2b, 2be y 2br de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros, constituyen la clase molecular A. Se encuentran ampliamente difundidas entre las bacterias Gram negativo, probablemente, por su codificación plasmídica y la inclusión del determinante genético, en el seno de un transposón. En algunas especies, como *Escherichia coli*, se observa que del 30 al 50 por ciento de los aislamientos clínicos poseen una β -lactamasa de tipo TEM. Actualmente, hay descritos más de 40 tipos diferentes de TEM, que representa el 20 por ciento de todas las β -lactamasas conocidas (24-26).

Anteriormente, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los cefalosporinas aminotiazolicas, caía en valores de 8 o 16 $\mu\text{g/ml}$. Las bacterias productoras de BLEA, eran identificados como sensible, según las normas de la NCCLS, sin embargo cepas productoras de BLEA que dan este nivel tan bajo de resistencia se asociaban con fallo terapéutico en animales y pacientes (25, 27).

6. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEAs.

El sitio con mayor frecuencia de aislamiento de BLEAs, han sido muestras procedentes de pacientes hospitalizados, aunque también se da el caso en muestras de origen comunitario. La resistencia que se observa en dichos aislamientos, se debe a la transferencia por conjugación entre diferentes especies bacterianas. En algunos casos, los plásmidos transferidos llevan asociada resistencia (24).

Al unirse a otros grupos de plásmidos que contienen también algún tipo de resistencia, se da lugar a microorganismos multirresistentes. Podemos detectar brotes con diseminación de un plásmido de diferentes especies de enterobacterias productoras de BLEA con un plásmido común, o por diseminación de una cepa multirresistente (epidemia clonal). El sitio anatómico de mayor frecuencia en cuanto a ser un reservorio adecuado para estos microorganismos multirresistentes es el tubo digestivo, promoviendo la transferencia de resistencia entre las especies bacterianas (24).

En 1963 se identifica por vez primera una β -lactamasa de tipo TEM, la TEM-1, en una cepa clínica aislada en Grecia. En 1969 se identifica la TEM-2 y durante los 15 años siguientes no se encuentran nuevas TEM (25-26).

Uno de los países en detectar los primeros aislamientos clínicos de BLEAs, fue Alemania (1983), encontrándose *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y sensibles a cefoxitina. Posteriores análisis demostraron que la resistencia de dichas cepas, era debida a la producción de una β -lactamasa plasmídica transferible derivada de SHV-1 que se denominó SHV-2. Desde entonces, se han descrito por todo el mundo numerosas enzimas tipo TEM y SHV con este fenotipo de resistencia. En España, la especie con mayor frecuencia aislada en brotes nosocomiales ha sido *K. pneumoniae*, seguida de *E. coli*. También se han encontrado otras especies como *Salmonella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, etc. El brote nosocomial más importante descrito hasta el momento, tuvo lugar ente los años 1993-1995 en el Hospital de Bellvitge, España (24).

Esta epidemia fue debida a la diseminación clonal de una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEA. Este brote afectó a 150 pacientes, de los que el 69,6 por ciento estaban ingresados en la unidad de cuidado intensivo (UCI). La cepa epidémica era resistente a cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, gentamicina y ciprofloxacina y producían dos tipos de b-lactamasas tipo SHV transferibles por conjugación (24).

En Francia, a finales de los 80, se detectaron las primeras epidemias de infección hospitalaria por *K. pneumoniae* productora de BLEA. Un estudio multicéntrico realizado en la UCI de 10 países europeos, demostró que el 22,8 por ciento de aislamientos de *Klebsiella* spp eran productoras de BLEA, siendo *K. pneumoniae* la especie más importante (24).

Las β -lactamasas generalmente predominantes son de *Klebsiella* pero se está extendiendo a otras bacterias. Estas enzimas aparecieron en 1994 en 20 a 25 por ciento de los aislamientos de *Klebsiella* de algunas UCI del Sur y Oeste de Europa y posiblemente alcancen una amplia distribución como las enzimas TEM-1 (25).

De 1994 a 1997 se observó un aumento en la proporción de bacterias productoras de BLEAs resistente a piperacilina/tazobactan (desde 31 al 63 por ciento; la mayoría con CMI = 128 ± 4 $\mu\text{g/ml}$). También se observó aumento en la proporción de aislamientos de *K. oxytoca* hiperproductora de β -lactamasa de 8 al 21 por ciento (25).

De 1978 a 1986, fueron desarrollados nuevos β -lactámicos, como las cefalosporinas de tercera generación, los monobactames y los inhibidores suicidas. Las enzimas TEM-1 y TEM-2 eran incapaces de hidrolizar estos nuevos sustratos. En 1984 se describe la TEM-3, una variante de TEM-2 que contiene 3 cambios en su secuencia de aminoácidos y que es capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación. Estas nuevas enzimas constituyen una nueva clase (cuya primera representante es la SHV-2, aislada un año antes) que se conoce con el nombre de β -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado (grupo 2be de Bush, Jacoby y Medeiros). Durante los siguientes 6 ó 7 años, se produjo una diversidad de β -lactamasas de tipo TEM (24-26).

Se aíslan y caracterizan más de 30 variantes de TEM-1 y TEM-2 que presentan el espectro de sustrato ampliado o una menor sensibilidad a los inhibidores suicidas (24-26).

La evolución de las β -lactamasas de tipo TEM ha seguido, aparentemente, varios caminos: a) cuantitativo, que implica el aumento de la presencia de la enzima tanto en la población (diseminación de los genes mediante plásmidos y transposones) como en los individuos (aumento en la producción por mutaciones en el promotor o por aumento en el número de copias del plásmido portador); y b) cualitativo, que implica una especialización de la enzima en la hidrólisis de nuevos sustratos mediante la adquisición de mutaciones (26).

En 1990, comienzan a aislarse variantes de TEM con menor sensibilidad a los inhibidores suicidas de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Con estas nuevas variantes se inaugura un nuevo grupo en la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros: el 2br. Tras el uso tentativo de varias denominaciones, en la actualidad parece ampliamente aceptado el nombre de IRT (Inhibitor Resistant TEM) para estas nuevas enzimas. De forma similar a lo acontecido con las TEM de espectro ampliado, las IRT muestran un rápido proceso de diversificación. En unos pocos años se han descrito 13

variantes moleculares, todas ellas resultado de un cambio, o de la combinación de varios cambios, en alguno de los aminoácidos siguientes: Met₆₉, Trp₁₆₅, Met₁₈₂, Arg₂₄₄, Arg₂₇₅ y Asn₂₇₆ (24-26, 28).

Durante los últimos 6 años las IRT y las TEM de espectro ampliado han coexistido sin mezclar sus mutaciones. De hecho, la inclusión en la misma molécula de enzima de los dos tipos de mutaciones confería solamente el fenotipo de ampliación del espectro, perdiéndose la resistencia a los inhibidores (26).

7. B-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las β -lactamasas de amplio espectro (BLEAs), tienen su dominio sobre penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), tienen lugar cuando hay mutaciones cercanas al sitio activo (29).

Las BLEEs tienen un espectro de resistencia más amplio, en el cual está contenido el dominio de las BLEAs y cefalosporinas de tercera y cuarta generación así como monobactams (29).

El mecanismo bacteriano común de resistencia para antibióticos β -lactámicos, es la producción de enzimas β -lactamasas que destruyen la estructura del anillo β -lactámico de las penicilinas como drogas (30).

El control genético de la producción de β -lactamasas es inducido por un plásmido o cromosoma. Una gran cantidad de plásmidos provienen de las enzimas TEM-1, TEM-2, y SHV1 (grupo 2b según Bush), estas enzimas le confieren resistencia a penicilinas pero no para las nuevas cefalosporinas. Estas enzimas hidrolizan drogas como ceftazidim, cefotaxim, y aztreonam, pero tienen pequeños efectos en cefamicina-cefoxitin y cefotetan (30).

Las BLEEs (grupo 2be) han mutado de los genes de las TEM-1 y SHV-1, acarreados en los plásmidos que fueron transmitidos de otros organismos. Cambios minoritarios relativos en la secuencia de los genes originales han causado alteraciones significativas en la afinidad del enzima hacia el sustrato (24-26, 30).

La hidrólisis de ceftazidime, cefotaxime y aztreonam ha ocurrido en rangos mayores de 10 por ciento de las benzilpenicilina. Estas enzimas pueden ser bloqueadas por inhibidores de las β -lactamasas como el ácido clavulánico (24-26, 30).

8. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEEs.

Un estudio realizado en un hospital de Barcelona España (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) entre 1997 y 1999, demostró la presencia de enterobacterias productoras de BLEAs y cefamicinasas (por el método de disco difusión), con los siguientes resultados: 35 cepas de *Escherichia coli* (0.45 por ciento de las cepas aisladas de esta especie bacteriana); 9 de *Klebsiella pneumoniae* (1.83 por ciento); 2 cepas de *Salmonella enterica* (0.11 por ciento); y una de *Proteus mirabilis* (0.11 por ciento), portadoras de las enzimas investigadas (n = 13800 cepas de enterobacterias) (14, 31).

Las *E. coli* productoras de BLEEs, fueron CTX-M-9 (27 cepas); SHV-2 (6 cepas); TEM-10 (1 cepa) y TEM-12 (1 cepa). CTX-M-9, actualmente predominante, ha aumentado su incidencia cinco veces (0.45 por ciento) respecto al trienio anterior (0.08 por ciento en 1994-1996. Como dato nuevo, se ha observado la presencia de cefamicinasas plasmídicas tipo CMY-2 en una cepa de cada una de las siguientes especies *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* y *Proteus mirabilis* (31).

Un estudio sobre cepas de *E. coli* productoras de BLEE, realizado en la comarca de Bierzo España, entre el 2001 y 2002, señaló que la frecuencia de producción de BLEE en *E. coli* encontrada en dicha área de salud, fue baja (0,6 por ciento) y similar a la media (0,5 por ciento) obtenida en un estudio multicéntrico español. Varios estudios realizados en España, indican que la incidencia ha oscilado entre un 0 y un 2,4 por ciento. La mayor parte de cepas (85 por ciento) han sido de procedencia extrahospitalaria, porcentaje mayor al obtenido en otros estudios. En este sentido, en los últimos años se viene observando un incremento importante en la frecuencia de aislamientos extrahospitalarios, hecho destacable ya que inicialmente el hallazgo de estas cepas se limitaba al ámbito hospitalario (32).

Un estudio realizado en Perú durante los meses de octubre y noviembre del año 2000, se determinó la diversidad genética de 10 aislamientos bacterianos provenientes de pacientes hospitalizados y muestras ambientales procedentes de una unidad de cuidados intensivos de neonatos de un hospital de Lima, utilizando el patrón de banda de ADN ribosomal y plasmídico. Posteriormente, se caracterizó la resistencia antimicrobiana y sus principales factores utilizando electroforesis de punto isoeléctrico, *Southern Blotting* y PCR. Finalmente se evaluó la capacidad de transferencia de la resistencia mediante ensayos de conjugación bacteriana (33).

En todos los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, se observó el mismo perfil plasmídico. Los aislamientos de *E. cloacae* mostraron un mismo patrón genético, además se encontraron cuatro genotipos distintos de *K. pneumoniae* altamente relacionados. Todos los aislamientos produjeron β -lactamasa de espectro extendido Tipo SHV-5 transferible a otras especies. La presencia de enzimas BLEEs o BLEAs, es la causa más importante de resistencia a los agentes antimicrobianos β -lactámicos, las cuales actúan hidrolizando el anillo oximino-aminotiazolil, inactivando así las penicilinas, monobactames y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (33).

Las SHV son β -lactamasas plasmídicas, aunque en algunas especies son codificadas por genes cromosomales. Un ejemplo de ello es la enzima SHV-1 que es codificada por un gen cromosomal en *K. pneumoniae* (propia de la especie), pero su espectro de acción es menor, considerada por ello una β -lactamasa de amplio espectro. La SHV-5, es una enzima plasmídica mutante, que presenta sustituciones en las posiciones Ser₂₃₈, Gly₂₃₈, Lys₂₄₀ y Glu₈. Tales cambios, así como otros en otras variantes de esta enzima, son responsables del incremento en su espectro de acción, por lo que se consideran a estas enzimas como BLEEs. La capacidad de transferir la resistencia está asociada a la presencia de plásmidos u otros genes denominados transposones y puede ocurrir entre diversas especies bacterianas (33).

En un estudio que se realizó en Colombia, durante el periodo de abril del 2001 a abril del 2002 en el Hospital Universitario Clínica San Rafael de Bogotá, se caracterizaron microbiológica y molecularmente aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE. Se tipificaron 15 aislamientos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y por amplificación de secuencias de ADN repetidas (REP-PCR). La susceptibilidad antimicrobiana y la producción de BLEE se determinaron de acuerdo con las normas de NCCLS. Las β -lactamasas se evaluaron por isoelectroenfoque y PCR. El 80 por ciento de estos aislamientos se asociaron con infección nosocomial y de éstos, el 91,7 por ciento provenía de unidades de cuidado intensivo (27, 34).

La susceptibilidad antibiótica mostró 13 patrones de resistencia; 87 por ciento de los aislamientos presentaron corresponsencia a amikacina, 53 por ciento a gentamicina, 33,3 por ciento a ciprofloxacina, 40 por ciento a cefepime, 66,7 por ciento a piperacilina/tazobactam, 60 por ciento trimetoprim/sulfametoxazol y 46,7 por ciento a cloranfenicol. Todos fueron sensibles a imipenem (27, 34).

En la mayoría de los aislamientos se detectó producción simultánea de β -lactamasas del tipo TEM y SHV y el 93,3 por ciento produjo ceftazidimasa de punto isoeléctrico (PI) 8.2 del tipo SHV-5. Los 15 aislamientos fueron agrupados por PFGE y REP-PCR en 11 y 12 patrones electroforéticos, respectivamente. Ésta variabilidad genética está relacionada con infecciones nosocomiales de origen endógeno más que por infecciones cruzadas. Estos resultados permiten sugerir que el empleo simultáneo del gel de isoelectroenfoque y la prueba biológica, mejora el nivel de detección y la especificidad de acción de alguna de las enzimas separadas electroforéticamente. Una β -lactamasa con actividad hidrolítica sobre cefalosporinas de tercera generación (especialmente sobre ceftazidima) y con un punto isoeléctrico de 8,2 fue descrita inicialmente en aislamientos de Chile y catalogada como BLEE-SHV-5 (34).

En este estudio, en 14 de 15 aislamientos de *K. pneumoniae* se encontró BLEE tipo SHV-5 que también se ha informado con relativa frecuencia en México y Argentina, lo cual sugiere que este tipo de BLEE codificada en plásmidos se ha diseminado en países de Latinoamérica (34).

Las principales enterobacterias asociadas a infecciones en neonatos, pacientes con cáncer neutropénico, y otros pacientes con enfermedades subyacentes son *E. coli* y *K. pneumoniae*. Estas bacterias han sido uniformemente susceptibles al antimicrobiano oximino- β -lactam. Sin embargo, desde la descripción inicial de BLEEs producidas por cepas de *K. pneumoniae* en 1983, y *E. coli* en 1987, han sido resistentes a cefalosporinas de amplio espectro, esta resistencia, se ha ido incrementando (26-25).

Se han observado muchos informes de brotes causados por estos organismos en los centros de cáncer, pediátrico, geriátrico, y pacientes atendidos en sus casas por enfermeras. Sin embargo, las descripciones epidemiológicas de infecciones del torrente sanguíneo causadas por BLEEs producidas por *K. pneumoniae*, y *E. coli*, están limitadas, tanto como los datos clínicos con respecto al tratamiento. En la actualidad, los carbapenemes se recomiendan para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos productores de BLEEs. Sin embargo, esta recomendación es principalmente basada en los efectos *in vitro*, los resultados de experimentos con animales, y datos clínicos muy limitados (24-26, 35).

Un estudio realizado en Río de Janeiro Brazil, entre 1996 a 1997, puso de manifiesto el descubrimiento de una nueva enzima. La *Serratia marcescens* Rió-5, una de las 18 BLEEs producidas por cepas aisladas en varios hospitales de Río de Janeiro, exhibieron un alto nivel de resistencia a aztreonam (CMI de 512 μ g/ml) un grado menos elevado a cefotaxime (CMI de 64 μ g/ml), y menos aún para ceftazidime (CMI de 8 μ g/ml). Las cepas productoras de plásmidos de BLEEs con un punto isoeléctrico de 7.5 para el gen *bla*, no fueron clasificadas con aquellos otros plásmidos mediados por la clasificación de BLEEs citada por Ambler (24, 36).

La secuencia y clonación del gen *bla*, reveló un nuevo código para la clase A de β -lactamasas en función del grupo 2be, designando BES-1 (β -lactamasa de espectro extendido de Brasil). Esta enzima tiene 51 por ciento de igualdad con el cromosoma de la clase A de penicilinasas de *Yersinia enterocolitica* Y56, con la cual estaba más cercanamente clasificada (24, 36).

Presenta 47 a 48 por ciento de similitud con la β -lactamasa CTX-M con la cual estaba clasificada como BLEE, además de tener en común con dicha enzima, una alta actividad de hidrólisis con la cefotaxime. La enzima BES-1, tiene una significativa actividad de hidrólisis frente a ceftazidime, alta afinidad por aztreonam y baja susceptibilidad a tazobactam así como al ácido clavulánico (24, 36).

Un estudio realizado en Chile muestra que el problema de las BLEEs, es de magnitud mundial. Fue primero descrito en Europa, luego en América y Asia. La prevalencia es muy variable de país a país y también en diferentes centros. En Estados Unidos, las enterobacterias varían de 0-25 por ciento, con un promedio nacional del 3 por ciento, según información del CDC; entre aislamientos de *K pneumoniae* varía de 5 a 10 por ciento en pacientes hospitalizados, en unidades no críticas y críticas respectivamente. En Europa varía de 1 a 40 por ciento. En Asia varía de 0.1 a 12 por ciento. Con lo que respecta a Chile, se han realizado pocos estudios, detectándose alrededor de 1.4-6,1 por ciento en *E. coli*, 30-36.4 por ciento en *K. pneumoniae* y 0-25 por ciento en *K. oxytoca*. Es sabido que los pacientes que cursan con infecciones causadas por organismos productores de BLEE presentan mayor riesgo de falla al tratamiento antimicrobiano usualmente utilizado, concentrándose los mayores aislamientos de éstos, en las unidades de pacientes críticos, y servicios quirúrgicos. Asociado a esto está el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, en pacientes que presentan aislamientos con bacterias resistentes. Factores asociados a la presencia de estas enzimas son: hospitalización prolongada, permanencia en unidades críticas, intubación endotraqueal, ventilación mecánica, catéter urinario, catéter venoso, uso previo de antibióticos (35).

En un principio los brotes fueron asociados a cepas productoras de un solo tipo de β -lactamasa, actualmente los brotes se asocian a cepas productoras de múltiples β -lactamasas. Aún no ha sido incorporada a la práctica de rutina en el laboratorio de microbiología, un diagnóstico efectivo de BLEEs y BLEAs que pueda ser utilizado en la mayoría de los centros asistenciales. En Guatemala solo algunos hospitales de la capital realizan el diagnóstico de bacterias productoras de BLEEs y BLEAs, basados en las normas de la NCCLS, careciendo la mayoría de hospitales departamentales de dichas prácticas (12, 27).

Existen alternativas comerciales de sensidiscos con la combinación de cefalosporina de tercera generación más ácido clavulánico; así como métodos comerciales automatizados, que permiten la detección de dichas enzimas (12, 27).

Actualmente, se han descrito alrededor de 190 tipos de BLEEs, y se les ha encontrado en una variedad de géneros bacterianos de enterobacterias (*E. coli* y *K. pneumoniae* principalmente, pero también descritas en *Enterobacter* spp, *Salmonella* spp, *Proteus* spp, *Citrobacter* spp, *Morganella morganii*, *P.aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Capnocytophaga ochracea*) (35).

9. Vigilancia de la resistencia a los antibióticos.

Las infecciones nosocomiales en todo el mundo representan un alto costo económico, además de la mortalidad y morbilidad que pueden causar. Numerosas instituciones encargadas en el control de las infecciones nosocomiales han sido creadas en todo el mundo a raíz del problema. Instituciones como la National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS), que reportó más del 5 por ciento de infecciones agudas en pacientes hospitalizados en los EEUU, con un promedio de 2 millones de infecciones al año que representa 2 millardos de dólares anuales además de las 20,000 muertes relacionadas por año con infecciones nosocomiales. En España se crearon los Servicios de Medicina Preventiva y Salud Pública en los hospitales de la red de la Seguridad Social, con la misión de desarrollar la epidemiología hospitalaria (37).

La red de vigilancia PRONARES se implementó en Chile en noviembre de 1997, con el fin de promover la vigilancia de resistencia antimicrobiana en patógenos prevalentes. Se ha contado con la participación de 11 centros de diferentes regiones del país: Iquique, Valparaíso, Viña del Mar, Concepción, Osorno y seis hospitales de la Región metropolitana (Ezequiel González Cortés, Félix Bulnes, San Juan de Dios, San José, Sótero Del Río y Barros Luco Trudeau). La forma de procesar las muestras, ha sido mediante las recomendaciones de la NCCLS, y los resultados se han analizado por medio del programa de computación WHONET (diseñado para vigilancia), el cual nos permitiera detectar y monitorear el problema de la resistencia bacteriana (38, 27).

Las cepas estudiadas son clasificadas como susceptibles, de susceptibilidad intermedia o resistente según normas del NCCLS 2000, cuyos parámetros están incluidos en el programa WHONET (38, 27).

Los resultados del primer semestre de este año reportan 5.251 cepas de diferentes síndromes clínicos. En infecciones del tracto urinario (ITU), *Escherichia coli* (1.088 cepas) demostró alta susceptibilidad a todos los antimicrobianos, *Klebsiella* (1.000 cepas) demostró un perfil de resistencia más elevado, al comparar cepas nosocomiales y de la comunidad, las primeras mostraron un perfil de mayor resistencia. Mantener una red nacional de vigilancia de resistencia se hace cada vez más necesario para orientar el uso adecuado de antibacterianos y evitar así que el fenómeno aumente (38).

Otro de los programas puestos en práctica para combatir el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos, es la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos, que tuvo sus inicios en Argentina a comienzos de 1997. Este programa lo conforman 20 países que informan anualmente los porcentajes de resistencia de bacterias entéricas como *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. En el 2000, la vigilancia se expandió a otras especies que se encuentran en la comunidad y en hospitales (39).

La evaluación del desempeño de las instituciones participantes, se lleva a cabo anualmente por un centro de referencia, el Laboratorio Nacional de Patógenos Entéricos en Canadá, mediante un envío anual de 15 muestras de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* (cinco de cada una). Además, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS "Dr. C.G. Malbrán", Argentina, envía un panel de 10 cepas desconocidas, entéricas y no entéricas, dos veces al año a Bolivia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Paraguay, Perú y Nicaragua entre otros. A nivel nacional, Guatemala cuenta con numerosos programas de vigilancia epidemiológica dirigidos por el Laboratorio Nacional De Salud, los cuales recopilan información anualmente de diferentes instituciones hospitalarias en todo el país (37, 39).

IV. JUSTIFICACIÓN.

La resistencia antimicrobiana que han adquirido las enterobacterias a nivel mundial, es alarmante, y es la causa de un alto índice de mortalidad que puede avanzar a mayores consecuencias, de seguir en la misma línea respecto del abuso de los antibióticos, además del daño económico que representa para la población.

Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes, son observadas generalmente en pacientes con hospitalizaciones prolongadas por factores que van desde permanencia en unidades críticas, intubación endotraqueal, ventilación mecánica, catéter urinario, catéter venoso o uso previo de antibióticos, entre otros. En pacientes que se encuentran exentos de un ambiente hospitalario no es común esperar que se produzcan infecciones por bacterias multirresistentes, por lo que es de suma importancia establecer el nivel de resistencia bacteriana que pueda existir en la población ambulatoria de Guatemala, así como investigar los perfiles de resistencia que presentan dichas bacterias, frente a los antibióticos que generalmente se utilizan para combatir este tipo de infecciones.

El aporte que esta investigación brinda, se basa en establecer el porcentaje de resistencia bacteriana mediada por enterobacterias productoras de β -lactamasas de amplio espectro y de espectro extendido, en pacientes que acuden a la consulta externa de la unidad periférica del instituto Guatemalteco de seguridad social de la zona 11. Así como establecer el comportamiento que dichas bacterias presentan frente a los diferentes antibióticos empleados.

Actualmente, la ciudad capital, son muy pocas las instituciones que incluyen metodologías, para detección de bacterias multirresistentes dentro de sus procedimientos. En el área rural, la situación es aún más precaria, ya que en los hospitales nacionales no se cuenta con la metodología y además se desconoce del tema. Es necesario sentar un precedente que ponga de manifiesto la presencia de enterobacterias multirresistentes en pacientes ambulatorios, para que se puedan tomar estrategias preventivas y correctivas con el fin de poder hacer frente a esta situación.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general.

- 1 Establecer la prevalencia de las bacterias productoras de BLEEs y BLEAs, en los aislamientos de la unidad periférica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de la zona 11.

B. Objetivos específicos.

1. Determinar el porcentaje de BLEEs en enterobacterias aisladas de muestras (no coprológicas) provenientes de pacientes que asisten a la periférica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de la zona 11.
2. Determinar el porcentaje de BLEAs en enterobacterias aisladas de muestras (no coprológicas) provenientes de pacientes que asisten a la periférica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de la zona 11.
3. Determinar el porcentaje de BLEEs y BLEAs por tipo de muestra.
4. Determinar la relación de resistencia antimicrobiana en los aislamientos de las BLEAs y BLEEs, frente a antibióticos no β -lactámicos.

VI. HIPOTESIS

Esta investigación es de tipo descriptivo, por lo que no se plantea hipótesis.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo:

Pacientes con infecciones debidas a enterobacterias, procedentes de la policlínica del IGSS de la zona 11.

B. Muestra:

Se analizaron 382 cultivos de enterobacterias aislados de pacientes ambulatorios, que fueron enviados al Laboratorio de Microbiología de la Policlínica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de la zona 11.

C. Recursos:

1. Humanos:

Br. Manuel Antonio Nájera Cerón (Tesista).

Lic. Jorge Matheu (Asesor).

Licda. Patricia de Arroyo (Asesora).

2. Físicos.

Materiales.

- Botellas de dilución bacteriológica.
- Bandeja para dilución bacteriológica.
- Tubos de ensayo de 13 x 10 mm. con rosca.
- Tubos Ependorf.
- Hisopos estériles.
- Asa bacteriológica.
- Pinzas de laboratorio.
- Guantes de látex estériles.
- Papel mayordomo.
- Bata blanca.

Reactivos.

- Placas NUC 33 (Uropatógenos), NC 31 (para Gram. negativo), PC21 (para Gram. positivo)
- Cepas ATCC. (*E. coli* 25922, *E. coli* 35218, y *K. pneumonie* 700603).
- Placas de agar Muller-Hinton (4mm de espesor) almacenadas de 2 a 8 °C.
- Tubos con caldo tripticasa soya (4 a 5 ml.) almacenados de 2 a 8 °C.
- Estándar 0.5 de Mcfarland.
- Discos de antibióticos comerciales (amoxicilina / ácido clavulánico, ceftazidima y cefotaxima).
- Solución salina estéril al 0.85 %

Equipo.

- Incubadora a 35 °C.
- Refrigeradora.
- Mechero de Bunsen.
- Sistema automatizado MicroScan (Date Behring).
- MicroScan RENOK (apacador de líquido de dilución).

D. Metodología.

1. Toma de muestra (procesamiento preliminar. IGSS).
 - Recepción de muestra e inoculación en medios de cultivo indicados (orocultivo: agar sangre de carnero (ASC), secreciones varias: ASC, agar chocolate (ACho), agar MacConkey (AMK), urocultivos: agar cromocult).
 - Incubación: 37°C/24-48 Hrs. Ambiente microaerofílico para cepas sembradas en ASC, Cromocult y Acho, ambiente aerobio para cepas sembradas en AMK.
 - Identificación de enterobacterias: los aislamientos en los que hubo crecimiento bacteriano, se procesaron en el MicroScan, tomando las colonias sospechosas de acuerdo a la morfología de las mismas y la tinción Gram que presentaron. (enterobacterias: bacilos Gram negativo, oxidasa negativa).

- Identificación por MicroScan: este aparato realizó numerosas pruebas bioquímicas que permitieron identificar certeramente a la bacteria estudiada. Además realizó un antibiograma con 25 antibióticos en los que se incluyeron los β -lactámicos.
- Detección de BLEEs y BLEAs: el aparato expuso la bacteria contra los diferentes antibióticos, β -lactámicos y no β -lactámicos, clasificándola como resistente, intermedio o susceptible de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria (MIC) que presentó. A la vez que indicó la sospecha de BLEE. La confirmación se realizó utilizando la metodología propuesta por la NCCLS. Posteriormente se ingresaron los resultados obtenidos (positivos o negativos) para que el aparato emitiera un reporte final. La identificación de BLEAs se realizó mediante la interpretación del reporte final.
- Metodología propuesta por la NCCLS (Anexo 3).

2. Confirmación final (LNS):

- Transporte de muestras: se trasladaron al LNS, todas las cepas positivas para BLEA y BLEE, en caldo tripticasa soya.
- Almacenamiento de cepas: todas las muestras se resembraron en ASC incubadas en ambiente microaerofílico durante 24 horas a 37 °C. Las cajas que presentaron crecimiento, fueron resembradas en caldo tripticasa soya y glicerina, para luego almacenarlas a -70 °C.
- Identificación de las cepas: a las muestras positivas para BLEEs obtenidas en el IGSS, se les realizó una identificación confirmatoria manual tomando en cuenta los parámetros establecidos en el anexo 1.
- Realización de antibiograma (metodología):
 1. Se realizó una suspensión de la colonia en solución salina, tomando como base el estándar de Mcfarland 0.5.
 2. Con un hisopo estéril, se esparció la solución uniformemente por toda la caja con agar Muller-Hinton, se dejó reposar por aproximadamente tres minutos antes de colocar los discos de antibióticos.
 3. Se colocó a una distancia de 3 cm., los discos de antibióticos específicos para bacterias Gram negativo.

4. Se Incubó a 37°C/24Hrs. en ambiente microaerofílico.
 5. Se midieron los halos de inhibición observados alrededor de los discos de antibióticos y se compararon con los resultados tabulados para dicho grupo de bacterias en las tablas de la NCCLS, y se clasificaron en resistente, intermedio y susceptible (27).
- Confirmación para BLEEs (esta metodología propuesta por la NCCLS se muestra en el anexo 3).
 - Análisis de resultados: los resultados obtenidos se ingresaron al programa WHONET de acuerdo a los siguientes parámetros: tipo de muestra, microorganismo aislado, resultado de antibiograma, y enterobacterias productoras de BLEE positivas. El análisis de los resultados se hizo por medio del programa, el cual realizó diferentes frecuencias con las cuales fue posible graficar los resultados tomando en cuenta los objetivos trazados para la investigación.

E. Diseño de la investigación.

- **Población:** pacientes con diferentes patologías con muestras de enterobacteria.
- **Dato poblacional:** El # poblacional era desconocido por lo que se asumió que es infinito para el cálculo de “n”.
- **No. de muestra:** prevalencia = P (+ a β -lactamasa) = P1: BLEE, y P2: BLEA
- **Se asumirá la máxima variación posible** $\sigma^2 = 0.25$
- **Limite de error de $\Delta = 0.05$ (5%).**
- **Nivel de confianza:** 95%
- **Programa utilizado:** EPI Info V 6.0
- **n = 382** casos de enterobacterias.
- **Diseño de muestreo:** No probabilístico por cuota.
- **Análisis:** prevalencia estimada para BLEEs y BLEAs con intervalo de confianza del 95 por ciento en población. Estadística descriptiva para variables: tipo de muestra, microorganismo aislado, resultado de antibiograma, y enterobacterias productoras de BLEE positivas, a través de tablas y gráficas.

IX. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el porcentaje de enterobacterias productoras de BLEA y BLEE, aisladas a partir de muestras provenientes de pacientes ambulatorios de la unidad periférica del IGGS de la zona 11. Entre los tipos de muestras que se tomaron en cuenta se encuentran: orina, exudado de orofaringe, secreción de oído, secreción vaginal, secreción uretral, secreciones varias y secreción de úlcera. Se recuperó un total de 382 cepas, aislándose 18 especies de enterobacterias, encontradas de abril a junio del 2004. Estas enterobacterias son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella ozaenae*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia fergusonii*, *Proteus penneri*, *Salmonella paratyphi A*. En la Tabla 1. Se presenta un resumen de los resultados obtenidos en esta investigación.

Tabla 1. Porcentaje de enterobacterias productoras de BLEA y BLEE por tipo de muestra.

Enterobacteria	# Aislamientos	BLEA	BLEE	Tipo de muestra (cultivo)						
				A	B	C	D	E	F	G
<i>E. coli</i>	279	159	52	265	2	0	10	0	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	40	38	2	34	0	0	1	0	5	0
<i>E. cloacae</i>	17	9	0	13	2	0	1	0	1	0
<i>P. mirabilis</i>	12	4	0	9	0	1	1	0	1	0
<i>M. morganii</i>	9	8	0	8	0	0	0	1	0	0
<i>K. oxytoca</i>	7	6	1	7	0	0	0	0	0	0
Otros	18	11	0	13	1	1	1	0	2	0
Total	382	235	55	349	5	2	14	1	10	1

A: orina, B: oído, C: secreciones varias, D: vagina, E: uretra, F: garganta, G: úlcera.

Fuente: datos experimentales.

En la Tabla 2. Se presenta el porcentaje de BLEA y BLEE por tipo de muestra. Se observa que el cultivo de orina fue el más frecuente en presentar aislamientos positivos para BLEA y BLEE.

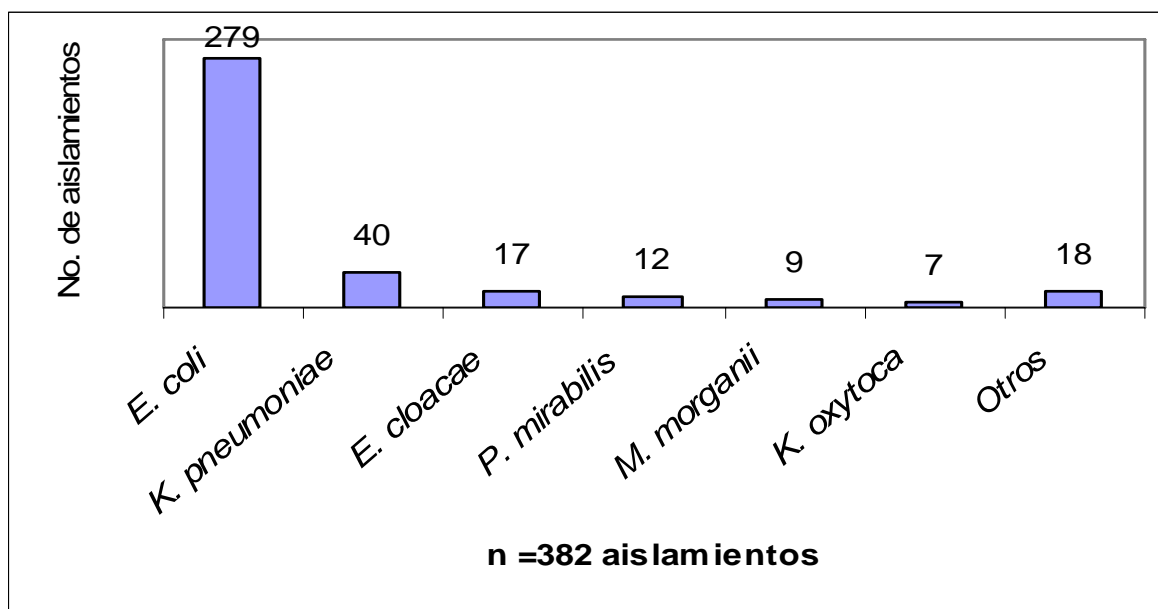
Tabla 2. Porcentaje de BLEA y BLEE aisladas por tipo de muestra.

Tipo de cultivo	No. de aislamientos	BLEA	% BLEA	BLEE	% BLEE
Orina	349	216	57	49	13
Faringe	10	8	2	1	0
Oído	5	2	1	1	0
Vaginal	14	7	2	3	1
Uretral	1	1	0	0	0
Secreciones varias	2	1	0	0	0
Úlcera	1	0	0	1	0
Total	382	235		55	

Fuente: datos experimentales.

En la Gráfica 1 se observa que las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *E. coli* (73 %) y *K. pneumoniae*, (10 %) de un total de 382 aislamientos.

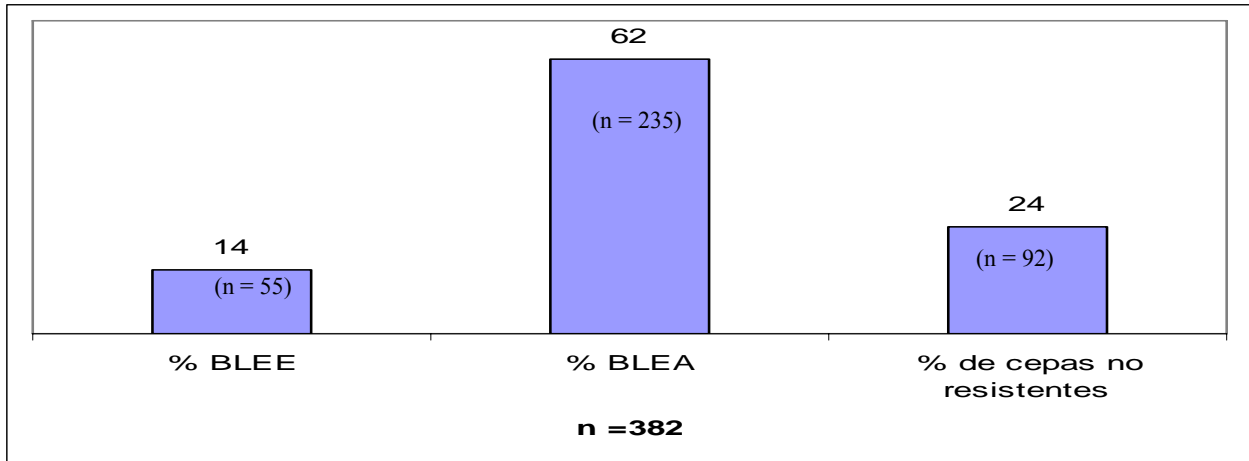
Gráfica 1. Aislamientos por enterobacterias.



Fuente: datos experimentales.

En la Gráfica 2 se presenta el porcentaje general de BLEA y BLEE encontrado en el total de aislamientos.

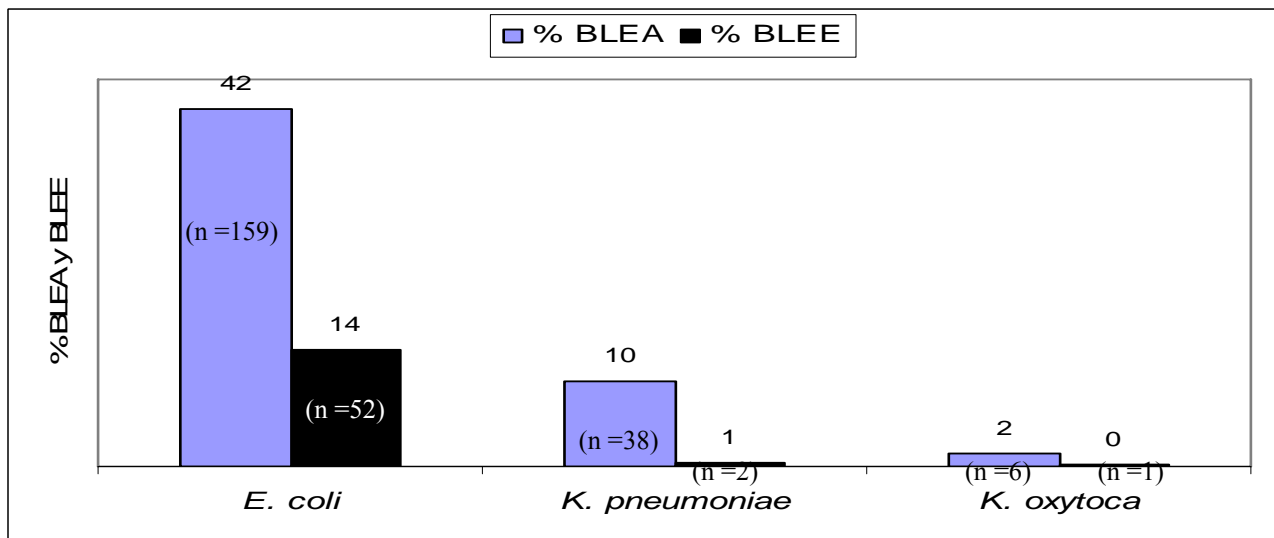
Gráfica 2. Porcentaje total de BLEA y BLEE en todos los aislamientos.



Fuente: datos experimentales.

En la Gráfica 3 se muestra el porcentaje de BLEA y BLEE observado en base a las especies de enterobacterias aisladas con más frecuencia. De los 279 aislamientos de *E. coli*, 159 de ellos fueron positivos para BLEA (42 % del total de aislamientos) y 52 lo fueron para BLEE (14 % del total de aislamientos).

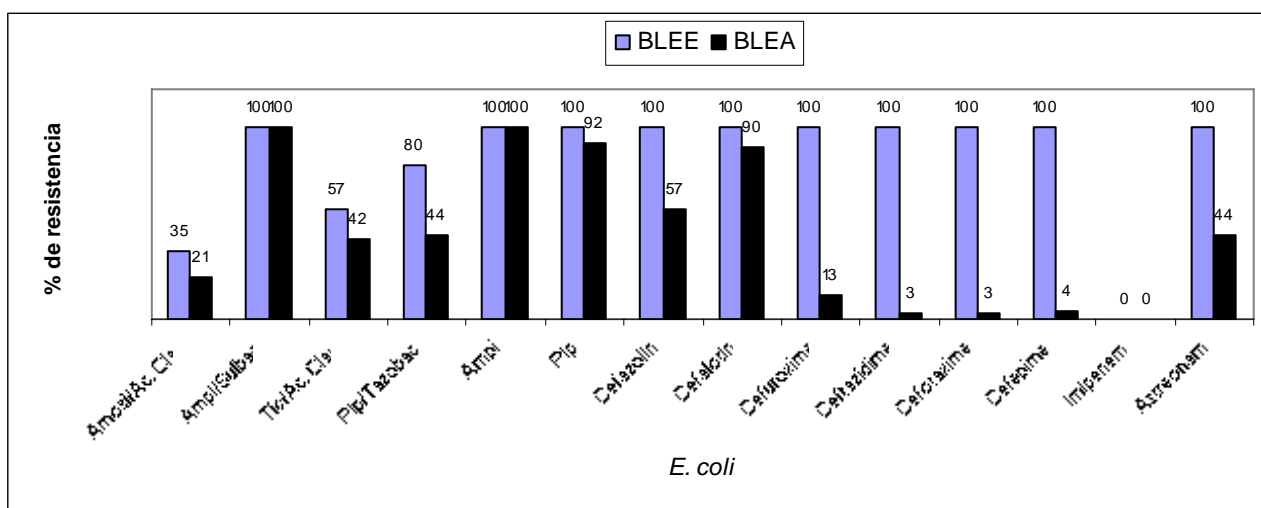
Gráfica 3. Porcentaje de BLEA y BLEE por enterobacteria.



Fuente: datos experimentales.

En la Gráfica 4 se presentan los porcentajes de resistencia de BLEA y BLEE, encontrado en *E. coli* para antibióticos β -lactámicos. Se observa que los aislamientos BLEA positivos fueron resistentes a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, mientras que los BLEE positivos lo fueron hasta cefalosporinas de cuarta generación y monobactames.

Gráfica 4. Porcentaje de resistencia para BLEA y BLEE en antibióticos B-lactámicos.

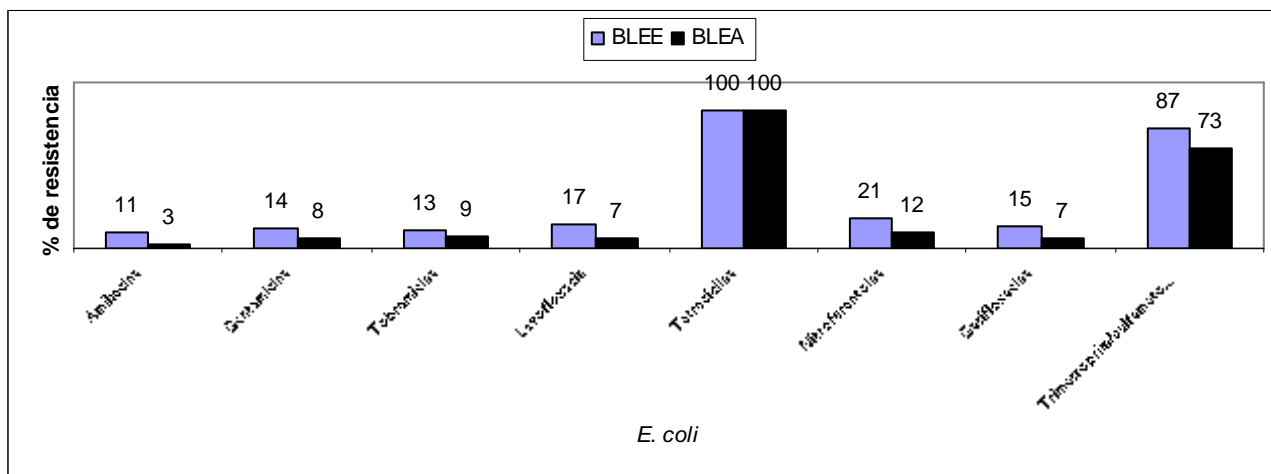


BLEE: 52 aislamientos, BLEA: 159 aislamientos.

Fuente: datos experimentales.

En la Gráfica 5 se presentan los porcentajes de resistencia de BLEA y BLEE, encontrado en *E. coli* para antibióticos no β -lactámicos. Se observa que Amikacina fue el antibiótico no β -lactámicos con mejor efectividad.

Gráfica 5. Porcentaje de resistencia de BLEA y BLEE en antibióticos no B-lactámicos.



BLEE: 52 aislamientos, BLEA: 159 aislamientos.

Fuente: datos experimentales.

X. DISCUSION DE RESULTADOS

En los últimos años, el problema de la resistencia a los antimicrobianos se ha analizado con mayor interés en muchos países. Es un problema grave, de alcance mundial que va en aumento. Los mecanismos de resistencia bacteriana son cada vez más complejos y variados, dando como resultado el surgimiento de nueva resistencia antibiótica. Concentrando la problemática mundial con respecto al apareamiento de cepas multirresistentes a antibióticos, el objetivo de este estudio es evaluar la presencia de BLEAs y BLEEs en cepas de enterobacterias aisladas en una clínica de consulta externa.

En la tabla 1, se presenta un esquema general del porcentaje de BLEA y BLEE por tipo de muestra según las enterobacterias más frecuentes y en la tabla 2, se presentan dichos porcentajes pero orientados al tipo de muestra. Se determino, que el cultivo de orina, además de ser el más frecuente, fue en donde se encontró más presencia de BLEA y BLEE. Este resultado concuerda con lo esperado, ya que en la periférica del IGSS de la zona 11, solo se atienden a pacientes de consulta externa. En dichos pacientes (ambulatorios), las infecciones de vías urinarias, son frecuentes y se atienden normalmente en cualquier época del año. Aunque no es parte de la investigación determinar de donde se adquirió la resistencia antimicrobiana, se propone que en algunos casos, existe una mala relación al momento de tratar infecciones en suero de la misma forma en la que trata infecciones en líquidos corporales o tejidos donde las concentraciones alcanzadas por el antibiótico no son las mismas. Se recomienda que en estudios posteriores se establezca la procedencia de resistencia antimicrobiana relacionada con pacientes ambulatorios, donde se haga uso de parámetros establecidos previamente como ficha médica o acceso al historial médico del paciente. Se consideró importante detallar esta información, para que de esta manera, se pueda prevenir brotes de enterobacterias resistentes por medio de acciones como la implementación de protocolos en instituciones medicas, que busquen erradicar la resistencia antimicrobiana.

En la gráfica 1, se observa el porcentaje de enterobacterias aisladas durante esta investigación. Como se puede observar en la gráfica, las enterobacterias halladas con mayor frecuencia fueron: *E. coli* con 279 aislamientos que corresponden al 73 % y *K. pneumoniae* con 40 aislamientos que corresponden al 10 %. Se propone que las enterobacterias que predominaron mayoritariamente y que además aportaron la mayoría de aislamientos con resistencia antimicrobiana BLEA y BLEE, son de fácil distribución e incluso son parte de la microbiota normal del ser humano. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, la producción de BLEAs, se produjo mediante un mecanismo natural presente en estas especies. *E. coli*, en cambio, adquiere su resistencia naturalmente, por medio del mecanismo llamado Amp-C de tipo basal (43).

En la gráfica 2, se observan los porcentajes generales de BLEA y BLEE en los 382 aislamientos. Se estableció que el porcentaje de BLEAs (62%) fue de más de cuatro veces el porcentaje de BLEEs (14%). Esto se debe a que el tipo de pacientes que se muestreo fue ambulatorio. Se asumió que en la población se encontraría poca resistencia, preferentemente del tipo BLEA ya que en condiciones intra hospitalarias, la resistencia por BLEEs, es más común encontrarla (14-35). De cualquier manera si se determinó un porcentaje significativo de BLEEs. Debido a que no se cuenta con estudios similares realizados anteriormente que revelen la existencia de BLEAs y BLEEs en la población ambulatoria, no es posible asociar si el porcentaje de resistencia encontrado en este estudio, se presenta elevado.

En la gráfica 3, se muestra el porcentaje de BLEA y BLEE hallados por especie de enterobacteria. *E. coli* fue el microorganismo que se aisló con mayor frecuencia y el que presentó los mayores porcentajes de resistencia debidos a BLEEs. Tal como se establece en la literatura, *E. coli* puede obtener una resistencia más compleja, por medio de plásmidos provenientes de otras especies, o por mutación. De esta manera es capaz de producir BLEEs; además de tener una mayor diseminación en el hombre que cualquiera de las otras enterobacterias. Las especies de *Klebsiella* fueron en segundo lugar, las más frecuentes en presentar resistencia por BLEA. Las demás enterobacterias no incidieron de forma significativa en los resultados (24-26, 29-30).

En la gráfica 4, se presentan los porcentajes de resistencia de BLEA y BLEE, encontrado en *E. coli* para antibióticos β -lactámicos. Se puede observar, que el grupo de penicilinas (Ampicilina, Piperaciclina y Ticarcilna) fue el más afectado, mostrando resistencias absolutas tanto para BLEA como para BLEE. Es de esperarse que debido a la amplia distribución que se le ha dado a este grupo de antibióticos con el transcurrir del tiempo, haya inferido en que su espectro antimicrobiano esté en descenso, por lo que de seguir con esta postura, podrían caer en desuso (11-15). Los inhibidores de β -lactamasas empleados en esta investigación fueron: Ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam. Se pudo determinar que el más efectivo de ellos fue el Ácido Clavulánico siendo este, el que menor porcentaje de resistencia presento tanto para BLEA como para BLEE. La combinación de Ampicilina y Sulbactam fue la menos efectiva, mientras que en las demás combinaciones mostradas se pudo observar una disminución significativa del porcentaje de resistencia de las cepas productoras de BLEA y BLEE. Este comportamiento nos lleva a concluir que la resistencia hacia el grupo de penicilinas fue sin lugar a dudas producida por β -lactamasas, ya que se observó una disminución del porcentaje de resistencia con la combinación de inhibidores de estas enzimas.

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEA que se expusieron a el grupo de cefalosporinas presentaron un comportamiento típico de BLEA, en donde Cefalotin (cefalosporina de 1ra generación), fue la más afectada del grupo completo de cefalosporinas, presentando una diferencia de porcentaje relativamente alta con relación a su homónimo Cefazolin (cefalosporina de 1ra generación). Cefuroxima (cefalosporinas de 2da generación), presentó un porcentaje de resistencia menor en más de 4 veces al porcentaje de resistencia observado en Cefazolin. Para las cefalosporinas de 3ra (Ceftazidima y Cefotaxima) y 4ta generación (Cefepime), el porcentaje de resistencia fue bastante bajo, por lo que se podría concluir que no se vieron afectadas significativamente. Aztreonam (monobactam) presento un porcentaje de efectividad de 56 por ciento por lo que se recomienda como opción terapéutica contra aquellas cepas que presentan resistencia baja, antes de recurrir a antibióticos de mayor espectro. Imipenem fue el antibiótico β -lactámico más efectivo, presentando un porcentaje de efectividad absoluto.

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, presentaron un comportamiento marcadamente más resistente que las productoras de BLEA. Con respecto al grupo de penicilinas, la resistencia fue total. Se observó además, que ninguna de las diferentes generaciones de cefalosporinas, fue capaz de inhibir a dichas cepas, dando como resultado de la misma forma que con las penicilinas, una resistencia absoluta, que muestra el comportamiento característico de BLEE en dichas cepas. La familia de monobactames (Aztreonam), corrió con la misma suerte que las familias mencionadas anteriormente, denotando resistencia total. De la familia de carbapenemes, el Imipenem fue el antibiótico más efectivo de todos los β -lactámicos y además de los no β -lactámicos, probando su efectividad tanto para cepas productoras de BLEA como de BLEE, por lo que se sigue tomando como la opción terapéutica más contundente.

En la gráfica 5, se presentan los porcentajes de resistencia de *E. coli* productoras de BLEEs y BLEAs, contra antibióticos no β -lactámicos. La Tetraciclina fue el antibiótico no β -lactámico menos efectivo tanto para BLEEs como para BLEAs, seguido de Trimetoprim Sulfametoxazol en donde también se observó un porcentaje de resistencia elevado. Puede deberse a que ambos antibióticos al igual que las penicilinas, cuentan con una amplia distribución dentro de la comunidad. En el caso de BLEAs, del grupo de antibióticos aminoglucósidos, Amikacina fue el más efectivo, mientras que Gentamicina y Tobramicina presentaron un porcentaje de resistencia tres veces mayor al de Amikacina. En general, del grupo de los aminoglucósidos se obtuvo una resistencia antimicrobiana baja, concluyendo que ésta familia tiene mayor efectividad que los antibióticos β -lactámicos a excepción de Imipenem. Levofloxacin (quinolona), y Gatifloxacin presentaron ambos un porcentaje bajo de resistencia. La Nitrofurantoina presentó una resistencia antibiótica aceptable similar a los antibióticos mencionados anteriormente. En el caso de las BLEEs, el comportamiento antimicrobiano fue similar entre las diferentes familias de antibióticos no β -lactámicos, con una variación de casi el doble en cuanto a la resistencia general que presentaron con relación a las BLEAs.

XI. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de BLEAs encontrado (62 %), fue más de cuatro veces mayor al porcentaje de BLEEs (14 %) obtenido en el total de aislamientos.
2. *E. coli*, fue la enterobacteria con mayor porcentaje de aislamientos positivos para BLEA (42 %) y BLEE (14%) de un total de 382 aislamientos.
3. El cultivo de orina fue el tipo de muestra, donde se aisló el mayor porcentaje de cepas de enterobacterias productoras de BLEAs y BLEEs.
4. De los inhibidores β -lactámico evaluados en este estudio, el Ácido Clavulánico fue el más efectivo de los inhibidores utilizados.
5. Ampicilina fue el antibiótico β -lactámico menos efectivo, siendo 100 % resistente para BLEAs y BLEEs.
6. Imipenem fue el antibiótico más efectivo, tanto de los β -lactámicos como los no β -lactámicos, con 100 % de susceptibilidad antimicrobiana
7. Tetraciclina con 100 % de resistencia, fue el antimicrobiano menos efectivo de los antibióticos no β -lactámicos.
8. Amikacina fue el antibiótico más efectivo tanto para BLEA como para BLEE de los antibióticos β -lactámicos como los no β -lactámicos, a excepción de Imipenem.

XII. RECOMENDACIONES

1. Proveer información que se pueda utilizar en la formulación de protocolos de vigilancia epidemiológica para resistencia antimicrobiana dentro de la institución, con el fin de concientizar al personal hospitalario para que colaboren a disminuir la resistencia antimicrobiana dentro de la comunidad.
2. Promover la utilización de controles de calidad internos mediante el uso constante de cepas ATCC con patrones de susceptibilidad conocidos.
3. Establecer un nexo estrecho con los demás laboratorios de la institución o con cualquier otra institución que funja como laboratorio de referencia, en donde se evalúen con otras metodologías, cepas que presenten comportamientos anormales frente a antibióticos claves como Imipenem, para su confirmación.

XIII. REFERENCIAS

1. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. 5ta Ed. Estados Unidos: Editorial Médica Panamericana, 1999. P. 1359.
2. Jawetz E., Manual de Microbiología Médica. 3ra. Ed. México: El Manual Moderno, 1990 P. 589.
3. Zwadyk P. Enterobacteriaceae: Características Generales. P. 673-683. (En Joklik WK, Wilett HP, Amos B, comps. Zinsser Microbiología. 13 ed. La Habana: Científico Técnica, Vol. 2, 1983. P. 1413.)
4. Jawetz E, et al. Microbiología Médica. 12 ed. México: El Manual Moderno SA de CV, 1987. P. 636.
5. Sonnenwirth AC. Bacilos Entéricos y Bacteroides. p. 529-551. (En Davis BD, et al, comps. Tratado de Microbiología. 3 ed. Bragulat JC, trad. Barcelona: Salvat Editores SA, 1984. XXII+ P. 1097.)
6. David M. Livermore. “ β -lactamasas in Laboratory and Clinical Resistance”. American Society for Microbiology. Department of Medical Microbiology, London Hospital Medical College, London, United Kingdom Oct. 1995, Pág. 557–584 Vol. 8, No. 4. Fecha consultada: 30/ 9 / 2004. Dirección: aac.asm.org/cgi/content/abstract/8/4/557
7. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 15va Edición. Editorial El Manual Moderno S.A. de CV. México DF. 1995. P. 250, 252.
8. McFaddin Juan F. “Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias de importancia clínica”. 1ra Edición. Editorial Médica Panamericana. México DF. 1984. P. 260-264.
9. Farmer j, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*. p. 360-383. (En Balows A, et al, comps. Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. USA: ASM, 1991. XI+ P. 1364.)
10. Murria P. et. Al. Microbiología Médica. Trad. Servicios Integrales de edición España: Mosby, 1995. P. 725.
11. K. Bush, G. Jacoby y A. Medeiros. “A Function Classification Écheme For β -lactamasas And Its Correlation with Molecular Structure”. American Society For Microbiology. Ultima revisión: Junio del 2004 Pág. 1211-1233 Vol. 39 No. 6. Fecha de consulta: 27/10/2004. Direction: aac.asm.org/cgi/reprint/39/6/1211
12. Ricardo Morales. Terapia de Bacterias Productoras De β -lactamasas de Espectro Extendido. Revisión de Infectología. Chile 20 de septiembre del 2004. Fecha de consulta: 30/9/2004. Dirección: www.hamburgo@vtr.het

- 13 ABC medicus. “Antibióticos mas utilizados en urología”. Última publicación: diciembre de 2001. Bogotá Colombia. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.abcmedicus.com/articulo/id/38/pagina/3/antibioticos_urologia.html
14. Dr. Liliam Cordies Jackson, Dr. Looney Andrés Machado Reyes Y Dr. María L. Hamilton Cordies. . “Principios generales de la terapéutica antimicrobiana”. Revista médica cubana. Habana Cuba. Última publicación: 8 de enero de 1998. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.bvs.sld.cu/revista/act/vol_18_1_98/act03198
15. Tte. Cor. Alfredo J. Céspedes Valcárcell y Mayor Pablo F. Portal González. “Actualidad y perspectivas de la farmacología de drogas antibacterianas”. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Cuba. Última publicación: 1998. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.bvs.sld.cu/reista/mil/vol27_2_98/mil03298.html
16. B. Davis, R. Dulbecco, H. Eisen, H. Ginsberg, W. Wood, M. McMacarty. “Tratado de Microbiología”. 2da Edición. Editorial Salvat Editores S.A. Barcelona España 1990. P. 190.
17. Cisneros, C. Mecanismos de farmacorresistencia en poblaciones y subpoblaciones bacterianas. México. 1997. P. 18-25
18. Levy, S 1998, Multidrug Resistance: A Sing of the time. New England J Med, 7 may; P. 338.
19. Pelzar/Reid/Chan. “Microbiología “. 4ta. Edición. Editorial MacGraw-Hill. México DF. 1995. P. 188,194 y 200.
20. Departamento de biología molecular salud pública de México. “Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana”. Última publicación: Julio-agosto de 1994. Fecha de consulta: 9/2/2005. Dirección: <http://www.insp.mx/salud/36/364-7s.html>
21. Enrique Iáñez. Curso de Microbiología General, “Resistencia bacteriana a los antibióticos”. Última publicación: 17/8/1998. Fecha de consulta: 9/2/2005. Dirección: fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm#basegen
22. Tte. Cor. Fernando Fernández Reverón. Hospital Militar Central "Dr. Luis Díaz Soto". “Resistencia Antimicrobiana”. La Habana Cuba. Última publicación: 30/10/2002. Fecha de consulta: 9/2/2005. Dirección: www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32_1_03/mil07103.htm.
23. David M. Livermore. “ β -lactamasas in Laboratory and Clinical Resistance”. American Society for Microbiology. Department of Medical Microbiology, London Hospital Medical College, London, United Kingdom Oct. 1995, P. 557–584 Vol. 8, No. 4. Fecha consultada: 30/ 9 / 2004. Dirección: aac.asm.org/cgi/content/abstract/8/4/557

- 24 Carmen Ardanuy Tisaire. "β-lactamasas plasmídicas de espectro ampliado". Servicio de Microbiología, Control de Calidad SEIMC. Hospital de Bellvitge España. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.seimc.org/control/revi_bacte/kpbpea.htm.
- 25 Dr. Ferran Navarro. "β-lactamasas de amplio espectro". Microbiología Clínica en la WWW. Barcelona España. Última publicación: 1/6/2003. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.microbiologiaclinica.com/beta-lactamasas2.htm.
- 26 C. Ardanuy. "Bases moleculares de la evolución de la β-lactamasas plasmídicas de tipo TEM". Sociedad Española de Quimioterapia. Barcelona España. Última publicación: diciembre de 1995. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.seq.es/seq/html/revista-seq/0197/ponens
27. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. NCCLS documento M100-S9. NCCLS, Wayne, PA 1999
28. T Naas, DM Livermore y P. Norman. "Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing β-lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other β-lactamase regulators". American Society For Microbiology. Última publicación: marzo de 1995. Fecha de consulta: 2/2/2005. Dirección: aac.asm.org/content/abstract/39/3/629
29. Cantón Rafael. Epidemiology of Extended-Spectrum β-lactamase-Producing Enterobacter Isolates in a Spanish Hospital during a 12-Year Period. April 2002 P. 1237-1243.
30. Canadian External Quality Assessment, Advisory Group for Antibiotic Resistance. "Guidelines on susceptibility testing of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae due to extended spectrum β-lactamasas (ESBLs)". Public Health Agency of Canada (PHAC). Último publicación: November 1998. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.phac-asp.gc.ca/publicat/ceqa-pceeq/esbl98-e.htm.
- 31 Aliaga Almedo, Roxana Rebeca. "Caracterización de las betalactamasas de espectro extendido y cefamicinasas en enterobacterias aisladas entre 1997 y 1999 en Barcelona". Barcelona España. Última publicación: 19/07/2001. Dirección: www.tdx.cesca.es/tdx-0925101-164302
32. Fuster, C. Raya, R. López. "β-lactamasas De Espectro Extendido En Aislamientos Clínicos De E. Coli En La Comarca De El Bierzo". Sociedad Castellano-Leonesa De Microbiología. Bierzo España. Última publicación: 2003. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.socalemi.org/comunicaciones/beta_lac_bierzo_2003.htm

33. Róger Calderón, Rosa Sacsquispe, Fernando G. Pasterán², Marcelo F. Galas, Javier Soto, Juan Riveros, Augusto Valencia, Nazario Silva, Víctor Suárez, Isabel Montoya. “Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido Tipo SHV-5 en una unidad de cuidados intensivos neonatales de Lima”. Lima Perú. Revista Peruana Médica Experimental de salud pública. Última publicación: 20/3/2003. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: sisbi.unmsm.edu.pe/bvrevista/medicina_experimental/N3_2003/pdf/a02.pdf
34. Paula Andrea Espinal, José Ramón Mantilla, Carlos H. Saavedra, Aura Lucía Leal, Celia Alpuche, Emilia María Valenzuela. “Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -Lactamasas de espectro extendido”. Biomédica. Bogotá Colombia. Última publicación: 2004. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.ins.gov.co/publicaciones/2004-biomedica_243_252.pdf
35. Yun-Kyung Kim, Hyunjoo Pai, Hoan-Jong Lee, Su-Eun Park, Eun-Hwa Choi, Jungmin Kim, Je-Hak Kim, and Eui-Chong Kim. “Bloodstream Infections by Extended-Spectrum- β -lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Children”. American Society for Microbiology, Seoul Korea. Última publicación: 9 de Febrero del 2002. Fecha de consulta: 30/9/2004. Dirección: aac.asm.org/cgi/content/abstract/46/5/1481
36. R. Bonnet, J. L. M. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, C. De Champs, J. L. Viillard, R. Labia, y J. Sirot. “A Novel Class of Extended-Spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil”. American Society For Microbiology. Última revisión: noviembre del 2000. Dirección: aac.asm.org/cgi/content/abstract/44/11/3061
37. Grupo de estudio de Infección hospitalaria de la Sociedad Española de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Grupo de trabajo de enfermedades infecciosas de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, crítica y unidades coronarias. “Documento de consenso sobre recomendaciones y recursos necesarios para un programa de control de la infección nosocomial en los hospitales españoles”. España. Última publicación. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.mpsp.org/mpsp/mpsp/html/noticias2.htm
38. Oliva Trucco A, Valeria Prado J, TM Claudia Durán T, y GRUPO PRONARES. “Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES. Informe primer semestre 2001”. Revista Chilena de Infectología. Chile. Última publicación: enero del 2002. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.scielo.cl/pdf/rci/v19s2/art15.pdf
39. “Informe anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos”. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Última publicación: 17–19 abril 2002. Fecha de consulta: 27/1/2005. Dirección: www.paho.org/spanish/AD/DP/CD/arm-santa-cruz.pdf

XIV ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 1. Patrones de reacción bioquímica en pruebas primarias para enterobacteriaceas comunes de importancia médica. (5, 10).

	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Morganella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Shigella</i>
Arginina	¹ ±	±	-	-	-	-	-	±	-	-
Citrato	² +	+	-	+	-	±	+	±	+	-
DNAsa	³ -	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gas	+	+	+	±	±	+	±	±	+	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	±	-	-	-	-	±	-	±	-	-
Indol	±	-	+	±	+	-	+	-	-	±
Lisina	-	±	+	+	-	+	-	+	+	-
Motilidad	+	+	±	-	+	±	+	+	+	-
Ornitina	±	-	±	-	+	+	-	+	+	±
Fenilalanina	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Sacarosa	±	-	±	+	-	±	±	-	+	-
Ureasa	-	+	-	±	+	+	±	-	-	-
⁷ VP	-	A	-	+	-	-	-	-	+	-
⁸ TSI plano	⁶ Alk (A)	AG	⁴ A(Alk)	A	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk (A)	Alk
Inclinado	A ⁵ G		AG	AG	AG	AG	AG	A;G	A	A
Fondo										

¹± = Variable; ²+ = la mayoría (en general ≥ 90%) positivas; ³- = unas cuantas cepas (en general ≥10%) positivas; ⁴A = ácido (amarillo); ⁵G = gas;

⁶Alk = alcalino, ⁷VP = Reacción de Voges-Proskauer, ⁸TSI = Triple agar hierro azúcar.

Anexo 2.

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos de acuerdo al mecanismo antimicrobiano (11-12).

Mecanismo de acción	Antibióticos Relacionados
Inhibición de la síntesis de la pared celular.	Penicilinas, cefalosporinas, monobactames, Carbapenemes y peptídicos.
Alteración de la permeabilidad celular.	Polienos, polimixinas e imidazoles.
Inhibición de la síntesis proteica.	Tetraciclinas, aminoglucósidos, anfenicoles, macrólidos.
Inhibición de la síntesis de ADN y ARN.	Quinolonas, ansamicinas, sulfonamidas y diaminopirimidinas.

Anexo 3.

Tabla 3. Prueba de confirmación para β -lactamasas de espectro extendido *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli* (27).

Medio de cultivo	Agar Mueller Hinton
Concentración de los discos	Ceftazidime, 30 μ g. Ceftazidime/ácido clavulánico 30 μ g. Cefotaxima μ g. Cefotaxima/ácido clavulánico μ g. Recomendaciones del método estándar de difusión de discos de agar (0.5 Macfarland)
Condiciones de inoculación	35 °C, durante 16-18 horas.
Incubación	Un incremento \geq 5 mm. En el diámetro de la zona de cualquiera de los agentes antimicrobianos probados, en combinación con ácido clavulánico versus la zona del antimicrobiano, cuando esta solo = BLEE. Ej.
Resultados	Ceftazidime: 16mm, Ceftazidime/ac. Clavulánico: 21 mm.