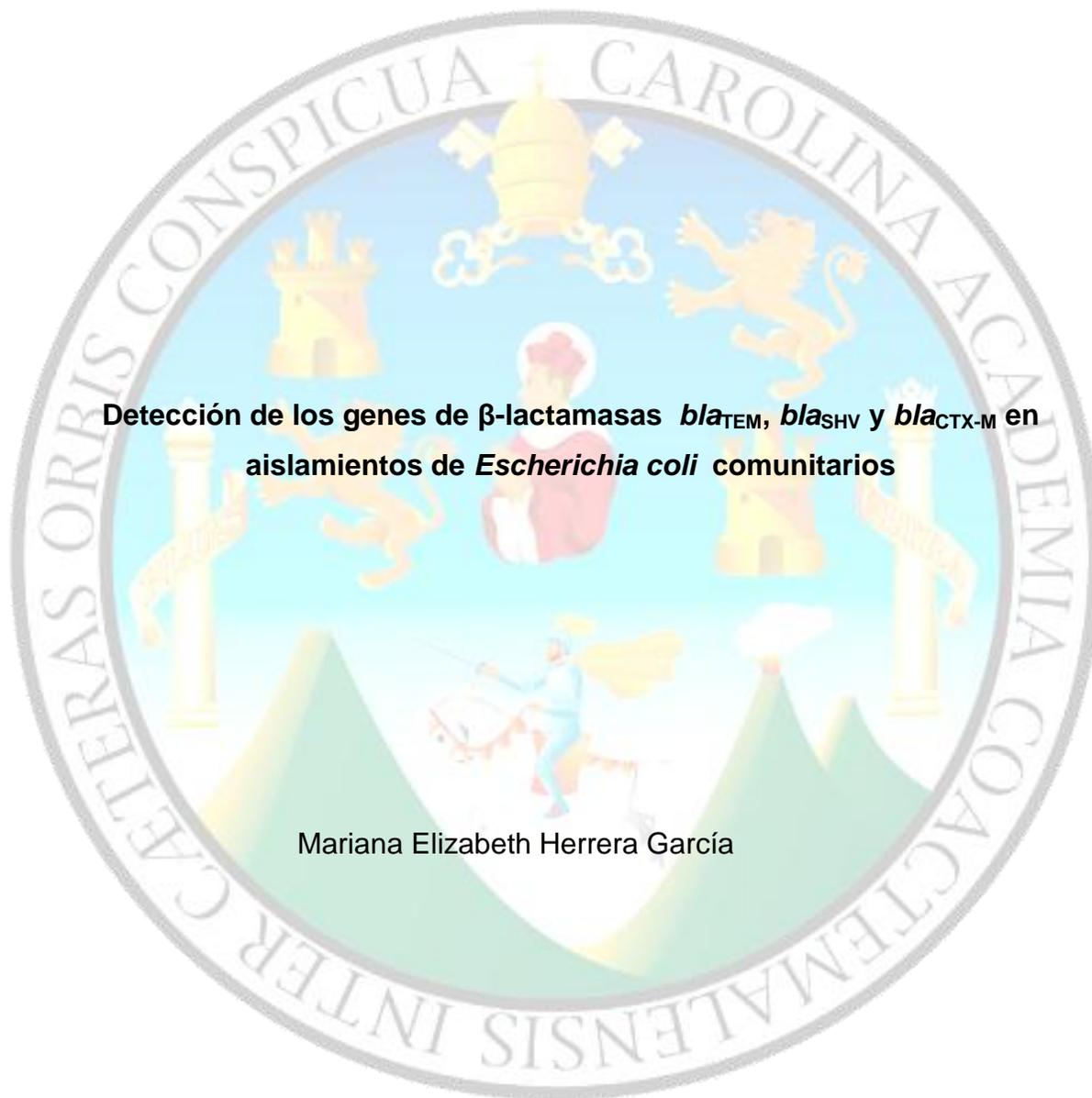


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Detección de los genes de  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en  
aislamientos de *Escherichia coli* comunitarios

Mariana Elizabeth Herrera García

Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, marzo de 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Detección de los genes de  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en aislamientos de *Escherichia coli* comunitarios**

Trabajo de tesis presentado por  
Mariana Elizabeth Herrera García

Para optar al grado de Maestra en Ciencias  
Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, marzo de 2019

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

MA. Pablo Ernesto Oliva Soto	DECANO
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	SECRETARIA
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	VOCAL I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	VOCAL III
BR. Byron Enrique Pérez Díaz	VOCAL IV
BR. Pamela Carolina Ortega Jiménez	VOCAL V

**CONSEJO ACADÉMICO**  
**ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Pablo Ernesto Oliva Soto, MA.

Tamara Ileana Velásquez Porta, MSc.

Jorge Mario Gómez Castillo, MA.

Clara Aurora García González, MA.

Silvia Marisol Archila Jiménez, MSc.

## **Dedicatorias**

*A Dios, que me ha permitido seguir este camino.*

*A mi mamá (la Chalis) por apoyarme siempre en todo.*

*A mis hermanas Alejandra y Rosario por cuidarme y preocuparse por mí.*

*A mis sobrinas Andrea, Sofía y Victoria; ser un buen ejemplo para ustedes me motiva cada día a ser mejor.*

*A la Isa, la China y Tamy por mostrarme entre otras cosas, otros colores y otras formas maravillosas.*

*A mis compañeros de MAENFI, en especial a Lily, Silvia, Gaby, Pax, Hugo y Kareen, simplemente por ser excelentes personas.*

*A los de siempre (Analu, Aliz, Isaac y Marco), gracias por lo de siempre.*

*A mi mamita y el Rubén que siempre están a mi lado.*

## **Agradecimientos**

*Al Laboratorio Clínico Popular por la formación recibida cuando fui estudiante y por permitirme realizar esta tesis.*

*A la Lcda. Irma Juárez y la Lcda. Patty Hernández del área de microbiología, que siempre mostraron una sonrisa todas las veces que solicite su ayuda.*

*Al INVEGEM por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, en especial a la Dra. Claudia Carranza y Lcda. María Mercedes Juárez.*

*A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular Vane, Vera y Gregory, gracias por las manos extras.*

*A la Dra. Carolina Arévalo quien siempre creyó y apoyó a MAENFI y a los estudiantes como amiga, asesora, profesora, coordinadora y directora.*

*Al Dr. Rubén Velásquez por su apoyo incondicional.*

## RESUMEN EJECUTIVO

A nivel mundial la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública, tanto en el ámbito hospitalario como en el comunitario. Los aislamientos de bacterias multirresistentes, sobre todo de bacilos Gram negativo, son cada vez más frecuentes debido a que la propagación de estos microorganismos se ve favorecida por la presencia conjunta de genes de resistencia a varios tipos de antibióticos y la colonización de reservorios animales y humanos no identificados.

La producción de  $\beta$ -lactamasas representa el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos en enterobacterias. Durante muchos años, las principales enzimas responsables de la resistencia fueron de las familias TEM y SHV, pero desde el año 2000 se ha producido la denominada “pandemia CTX-M” caracterizada por aislamientos de *Escherichia coli* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, abreviadas como BLEE, en aislamientos comunitarios a nivel mundial, sobre todo asociados a infecciones del tracto urinario.

El objetivo principal de este estudio fue detectar, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los genes de  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> en cepas comunitarias de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico Popular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Se analizaron 79 cepas de *Escherichia coli* comunitarios a partir de urocultivos de pacientes que acudieron al LABOCLIP en los meses de enero a abril de 2016. El 90 % de los aislamientos presentó al menos uno de los genes analizados y en más de la mitad se presentaron los tres tipos de enzimas (53.2 %). Los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> fueron los más frecuentes, con 85 y 84%. La frecuencia del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>

obtenida en este estudio fue 57 %, un dato similar a estudios internacionales en los que este gen representa el mayor porcentaje.

No fue posible determinar el tipo específico de enzima que se encontraba en todas las cepas analizadas debido al elevado costo que representaba la secuenciación de los genes implicados. Sin embargo, los resultados de secuenciación obtenidos en cinco cepas muestran que las enzimas presentes corresponden a TEM-1, SHV-11, CTX-M15 y CTX-M55. Éstos datos corresponden al primer reporte de caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE en el país y son importantes para entender la propagación de estas cepas en el ámbito comunitario.

Las cepas de *Escherichia coli* BLEE analizadas presentaron altos porcentajes de resistencia a ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol (78 %) y bajos niveles de resistencia para fosfomicina (2.5 %) y nitrofurantoina (7.6 %). El 11.39 % de las cepas presentó resistencia a un grupo de antibióticos no betalactámicos, y la mayoría mostró un patrón de resistencia a múltiples grupos de antibióticos.

Diversos factores genéticos pueden explicar la resistencia múltiple mostrada por los aislamientos analizados. La caracterización de plásmidos portadores de genes de  $\beta$ -lactamasas y la identificación de clones específicos permitirá determinar la presencia conjunta de genes de resistencia a otros antibióticos en cepas productoras de BLEE y tomar medidas que prevengan su diseminación.

Es importante establecer una vigilancia activa para la resistencia de aminoglucósidos, fosfomicina, nitrofurantoina y carbapenemes en cepas comunitarias, ya que estos antibióticos representan las primeras opciones terapéuticas para cepas productoras de BLEE.

## INDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN .....	3
III. MARCO TEÓRICO .....	4
A. Antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	4
B. Beta ( $\beta$ ) lactamasas y mecanismo de acción .....	8
C. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	9
D. Clasificación de las $\beta$ -lactamasas .....	10
E. Diversidad de las $\beta$ -lactamasas .....	16
F. Métodos microbiológicos de detección de BLEE .....	23
G. Métodos moleculares de detección de BLEE .....	26
H. Distribución y epidemiología en <i>Enterobacteriaceae</i> .....	29
I. Tratamiento, control y prevención .....	31
IV. OBJETIVOS .....	34
V. METODOLOGÍA .....	35
VI. RESULTADOS .....	41
VII. DISCUSIÓN .....	46
VIII. CONCLUSIONES .....	53
IX. RECOMENDACIONES .....	54
X. REFERENCIAS .....	55
XI. ANEXOS .....	64

## I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos es un problema de salud global y la producción de  $\beta$ -lactamasas es el principal mecanismo por el cual se produce la resistencia en bacilos Gram negativo, sobre todo porque los genes que codifican estas enzimas se encuentran en plásmidos que se transmiten a otras bacterias y codifican de forma simultánea genes de resistencia para diversos antibióticos como: aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas (Geser, Stephan, & Hächler, 2012; Mulvey et al., 2004; Paterson, Hujer, Hujer, Yeiser, Bonomo, Rice, & Bonomo, 2003).

La primera  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) reportada fue aislada en Alemania en 1983 y desde entonces se han caracterizado más de 200 tipos diferentes en todo el mundo. Las BLEE más diseminadas son las derivadas de las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM, SHV y CTX-M. Diversas enzimas son generadas por mutaciones puntuales en los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> que alteran la secuencia de aminoácidos del sitio activo de la enzima y aumentan su capacidad de hidrólisis para ciertos sustratos como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Mulvey et al., 2004; Paterson, Hujer, Hujer, Yeiser, Bonomo, Rice, & Bonomo, 2003).

Durante mucho tiempo, las infecciones por cepas productoras de BLEE fueron asociadas a diferentes factores de origen hospitalario que incrementaban la probabilidad de adquirir una infección, como estancias prolongadas en las unidades de cuidados críticos en los hospitales, procedimientos médicos invasivos de larga duración (catéter central, sonda urinaria, tubos orotraqueales y otros), hemodiálisis y malnutrición. Recientemente, diferentes estudios en aislamientos comunitarios de enterobacterias han demostrado que pacientes ambulatorios pueden actuar como reservorios de cepas productoras de BLEE, favoreciendo su diseminación, cuando han tenido infecciones urinarias recurrentes, ingresos previos a hospitales o poseen

una afección renal crónica, pulmonar, hepática, cardiovascular o diabetes (Paterson & Bonomo, 2005; R. Ben-Ami et al., 2006)

En Guatemala, se han realizado estudios para estimar la prevalencia de BLEE mediante la técnica de difusión en disco en varios centros de atención hospitalaria y aislamientos provenientes de la comunidad y se han reportado prevalencias de hasta 31.9 % a nivel hospitalario y 27 % en la comunidad (Alvarado & Mejía, 2014; Gordillo, Mejia, & Matheu, 2014). Sin embargo, no existen datos respecto al tipo específico de BLEE producido por estas enterobacterias, sobre todo en los aislamientos comunitarios.

El presente estudio tuvo como finalidad detectar los genes de  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en aislamientos comunitarios de *Escherichia coli* a partir de urocultivos de pacientes que acuden al Laboratorio Clínico Popular (LABOCLIP). Los resultados obtenidos son los primeros datos a nivel nacional sobre la epidemiología molecular de las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE que circulan en el país a nivel comunitario, lo cual es de importancia para el monitoreo y vigilancia de la resistencia antimicrobiana.

## II. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial los microorganismos productores de BLEE, sobre todo enterobacterias, representan una de las principales causas de infecciones hospitalarias y adquiridas en la comunidad. En el reporte del programa de vigilancia mundial SENTRY se determinó que el 45 % de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en Latinoamérica son productoras de BLEE, mientras que en Estados Unidos solamente 8 % de los aislamientos presenta este mecanismo de resistencia (Winokur, Canton, Casellas, & Legakis, 2001).

Diversos estudios que han caracterizado molecularmente las BLEE de aislamientos hospitalarios y comunitarios, determinaron una alta frecuencia de  $\beta$ -lactamasas derivadas de TEM y SHV. Sin embargo, se ha producido un incremento en la frecuencia de cepas productoras de BLEE de la clase CTX-M, que se ha relacionado al aumento en el uso de ceftriaxona a nivel mundial. Estos hallazgos son motivo de preocupación por la tendencia mundial de aparición de infecciones adquiridas en la comunidad causadas por cepas productoras de BLEE del tipo CTX-M, cuya propagación es asociada a políticas ineficientes de antibióticos a nivel hospitalario y ambulatorio (Blanco et al., 2013; Mendonça, Leitão, Manageiro, Ferreira, & Caniça, 2007; Paterson & Bonomo, 2005).

En Guatemala se realiza de manera rutinaria la detección de cepas productoras de BLEE en los laboratorios clínicos, y se ha evidenciado una elevada prevalencia a nivel comunitario. Sin embargo, hasta el momento no se había realizado algún estudio de caracterización molecular de BLEE en las infecciones adquiridas en la comunidad asociadas al uso de cefalosporinas de tercera o cuarta generación.

### III. MARCO TEÓRICO

#### A. Antibióticos $\beta$ -lactámicos

##### 1. *Generalidades y estructura química*

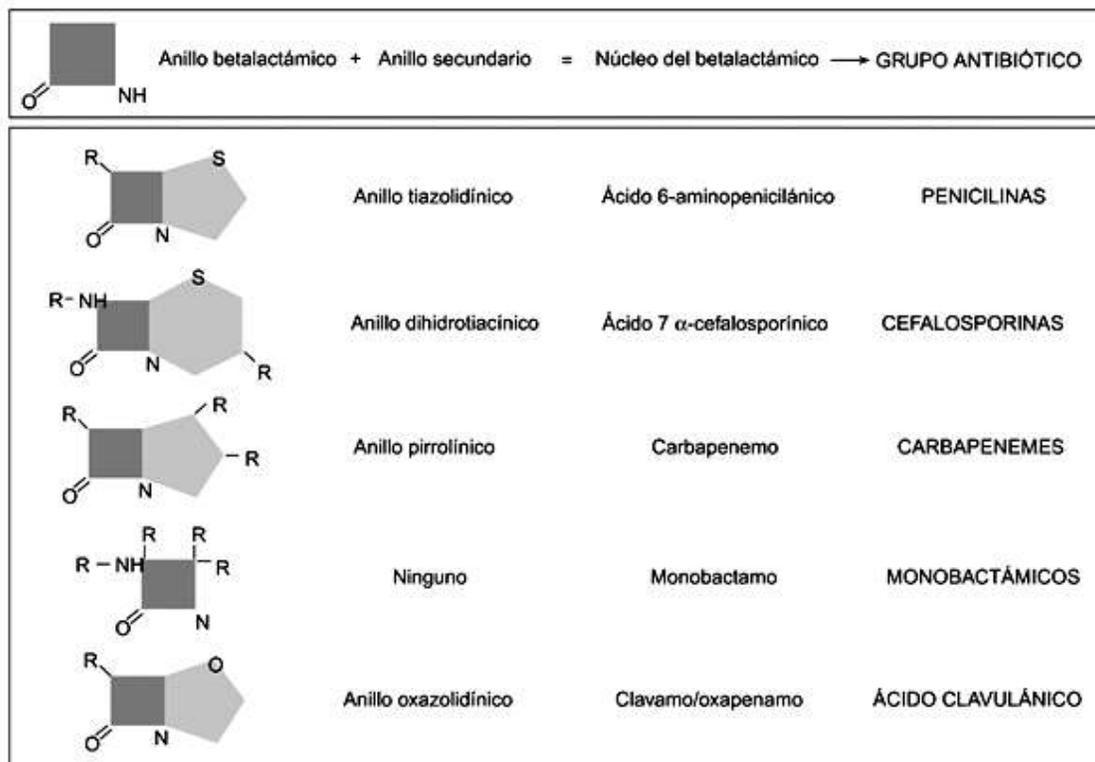
El primer reporte de un antibiótico  $\beta$ -lactámico fue realizado por Alexander Fleming en 1928, cuando observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se inhibía ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*. El hongo producía una sustancia capaz de impedir el crecimiento de diferentes tipos de bacterias, y fue llamado penicilina (Dougherty & Pucci, 2014). Actualmente, los  $\beta$ -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Paterson & Bonomo, 2005; Rodríguez-Villalobos et al., 2011).

La presencia del anillo  $\beta$ -lactámico (formado por la condensación de alanina y dimetilcisteína) es la característica química que define al grupo, y es la clave para su mecanismo de acción, escasa toxicidad directa y el principal mecanismo de resistencia (Suárez & Gudiol, 2009).

El anillo  $\beta$ -lactámico es un anillo heterocíclico que consiste en 3 átomos de carbono y uno de nitrógeno. Recibe ese nombre debido a que el átomo de nitrógeno está unido al carbono  $\beta$  en relación con el carbonilo. Sin embargo, para que el antibiótico sea activo, es necesario que el anillo esté asociado a otros grupos radicales (por lo general otros compuestos cíclicos) para formar un núcleo básico (Ver figura 1) (Suárez & Gudiol, 2009).

La unión de diferentes tipos de cadenas lineales a este núcleo de 2 anillos y cambios sutiles en la estructura química modifican el espectro de acción, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas dando lugar a una gran diversidad de moléculas agrupadas en 5 grupos

principales: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactames e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (Cavalieri et al., 2009; Suárez & Gudíol, 2009).



**Figura 1: Estructura de química de los principales grupos de  $\beta$ -lactámicos.** Todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos poseen un anillo  $\beta$ -lactámico asociado a un segundo compuesto cíclico que forma un núcleo principal. Este segundo compuesto cíclico puede ser un anillo tiazolidínico (penicilinas) un anillo dihidrotiacínico (cefalosporinas), un anillo pirrolínico (carbapenemes) y un anillo oxazolidínico (ácido clavulánico). Los monobactames reciben este nombre debido a que poseen un núcleo formado solamente por el anillo  $\beta$ -lactámico.

Tomado de: (Suárez & Gudíol, 2009)

## 2. **Mecanismo de acción:**

Los  $\beta$ -lactámicos son antimicrobianos bactericidas cuyo efecto se produce principalmente por 2 mecanismos: la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y la inducción de la autólisis bacteriana (Dougherty & Pucci, 2014).

El esqueleto de peptidoglucano de la pared celular bacteriana está formado por cadenas largas de repeticiones de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman un entramado (Cavalieri et al., 2009).

Los diferentes componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados hacia el espacio periplásmico donde se ensamblan. La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de pentapéptidos, etapa realizada por enzimas periplásmicas llamadas de forma genérica transpeptidasas (Cavalieri et al., 2009).

El anillo  $\beta$ -lactámico posee una estructura química similar a la región del pentapéptido que se une a las transpeptidasas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. Razón por la cual, estas enzimas son llamadas proteínas de unión a penicilina o PBP (penicillin binding protein). La bacteria queda expuesta al medio y muere, debido a cambios en la presión osmótica (Suárez & Gudiol, 2009).

Los  $\beta$ -lactámicos pueden activar además, la autolisina endógena bacteriana que destruye el peptidoglucano (Suárez & Gudiol, 2009).

### **3. *Espectro de acción***

El espectro de acción de los  $\beta$ -lactámicos incluye de forma general a bacterias Gram positivo, Gram negativo y espiroquetas. Son inactivos frente a micoplasmas, pues carecen de pared celular, y bacterias intracelulares como clamidias y rickettsias, ya que tienen escasa capacidad de

penetración dentro de las células (Mensa, J., Gatell, J. M., Letang, E., López-Suñé, E., Marco, 2013; Suárez & Gudiol, 2009).

El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarcaba inicialmente los cocos Gram positivo, bacilos Gram positivo (facultativos y anaerobios), espiroquetas y algunos bacilos Gram negativo anaerobios. Pero la producción de derivados semi sintéticos (penicilina V, aminopenicilinas) permitió una mayor capacidad de penetración en las bacterias Gram negativo (Dougherty & Pucci, 2014; Suárez & Gudiol, 2009).

Las cefalosporinas de primera generación tienen una eficacia elevada sobre los cocos Gram positivo. Por el contrario, las generaciones posteriores han perdido esta característica en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos Gram negativo. Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la meticilina y *Listeria monocytogenes* (Suárez & Gudiol, 2009).

El único monobactámico disponible para uso clínico es el Aztreonam, el cual es eficaz para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativo aerobias y facultativas; además posee una acción limitada frente a bacterias Gram positivo y bacterias anaerobias (Dougherty & Pucci, 2014).

La combinación de inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas/ $\beta$ -lactámicos permite que el antibiótico recupere su actividad original sobre los microorganismos resistentes por la síntesis de  $\beta$ -lactamasas. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas son moléculas que poseen gran afinidad y se unen irreversiblemente a ellas, evitando así la inactivación del antimicrobiano (Dougherty & Pucci, 2014; Suárez & Gudiol, 2009).

Los carbapenemes son los  $\beta$ -lactámicos de más amplio espectro en la actualidad; solamente son ineficaces frente a los estafilococos resistentes a la meticilina, a los enterococos resistentes a la vancomicina y *Stenotrophomonas maltophilia*. Sin embargo, la presión selectiva generada por su uso ha provocado la aparición de bacilos Gram negativo con enzimas capaces de inactivarlos (carbapenemasas) (Suárez & Gudiol, 2009).

Los principales mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos son: producción de  $\beta$ -lactamasas, modificación de las PBP (mutaciones, hiperexpresión y modificación de la afinidad), alteraciones en la permeabilidad (reducción de porinas en la membrana celular) y bombas de eflujo que expulsan el antibiótico al exterior de la célula bacteriana (P. A. Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005; Suárez & Gudiol, 2009).

## **B. Beta lactamasas y mecanismo de resistencia**

Las  $\beta$ -lactamasas (EC 3.5.2.6) también llamadas penicilin amido-beta-lactamhidrolasas o exopenicilasas han sido definidas por la Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology como “*grupo de enzimas de diferente especificidad de hidrólisis de los  $\beta$ -lactámicos*” (Noviembre, 2015). Están ampliamente distribuidas en bacterias Gram positivo y Gram negativo y confieren el mecanismo de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos más frecuentes.

La primera  $\beta$ -lactamasa se identificó en 1940 a partir de un asilamiento de *Escherichia coli*, inclusive antes de la liberación de penicilina para su uso en la práctica médica. Hasta la fecha la producción de estas enzimas sigue siendo el factor de importancia para la resistencia en patógenos Gram negativo (Gupta, 2007).

La producción de  $\beta$ -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacteriaceae*. Este grupo altamente diverso de enzimas hidrolizan los  $\beta$ -lactámicos en el espacio periplásmico e impiden la unión entre las PBPs y el antimicrobiano, neutralizando su efecto (P. A. Bradford, 2001; G. A. Jacoby & Muñoz-Prince, 2005).

Los 5 grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilina, cefalosporinas, monobactames, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y carbapenemes) poseen un anillo  $\beta$ -lactámico que puede ser hidrolizado por  $\beta$ -lactamasas y neutralizar su efecto. La exposición persistente de cepas bacterianas a los  $\beta$ -lactámicos ha provocado la sobreproducción y mutación de las  $\beta$ -lactamasas, lo cual ha aumentado su espectro de hidrólisis (Bonnet, 2004).

Algunos géneros de *Enterobacteriaceae* poseen una resistencia intrínseca a  $\beta$ -lactámicos, tal es el caso de *Enterobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* y *Providencia* sp., cuyo genoma contiene la cefalosporinasa AmpC, la cual es inducida frente a ciertos  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, mutaciones en el gen pueden causar una hiperproducción de la enzima y aumento del perfil de resistencia de la bacteria (Ruppé, Woerther, & Barbier, 2015).

### **C. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido**

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que hidrolizan penicilinas, aztreonam y cefalosporinas que contienen una cadena lateral oximino (primera, segunda y tercera generación). Sin embargo, no actúan sobre las cefamicinas ni carbapenemes, y son inhibidas por el ácido clavulánico y otros inhibidores como el sulbactam o tazobactam (Jeong et al., 2004; Kiratisin, Apisarnthanarak, Laesripa, & Saifon, 2008; Tankhiwale, Jalgaonkar, Ahamad, & Hassani, 2004).

Algunas BLEE son enzimas derivadas de las  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), como consecuencia de la aparición de mutaciones puntuales en los genes que las codifican. Estas mutaciones conllevan cambios estructurales en la enzima que permiten un mayor acoplamiento de la cadena lateral del  $\beta$ -lactámico con el sitio activo de la enzima, aumentando su espectro de acción hidrolítica (P. a Bradford & Bradford, 2001; Gupta, 2007)

Las BLEE son  $\beta$ -lactamasas transmisibles que son codificadas en genes que pueden ser intercambiados entre bacterias. Las variantes plasmídicas de las  $\beta$ -lactamasas se expresan de forma constitutiva (son sintetizadas de forma permanente por la bacteria), y su grado de producción es proporcional al número de copias del plásmido (Paterson & Bonomo, 2005).

Por el contrario, las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas pueden tener una expresión constitutiva o inducible, su producción depende de un estímulo o inductor, por ejemplo exposición a un antibiótico betalactámico. Además, los genes que codifican algunas  $\beta$ -lactamasas se encuentran ubicados en transposones o integrones, que generalmente contienen otros genes de resistencia para otras familias de antibióticos (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Paterson & Bonomo, 2005).

En general las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas son diferentes a las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas, pero en algunos casos existe solapamiento, por ejemplo, en el caso de SHV-1 y AmpC que se encuentran en forma cromosomal y plasmídica en diferentes especies (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005).

#### **D. Clasificación de las $\beta$ -lactamasas**

En la actualidad las  $\beta$ -lactamasas se pueden clasificar según dos esquemas: la clasificación de Ambler y la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Ambos esquemas son aceptados y utilizados en la comunidad científica.

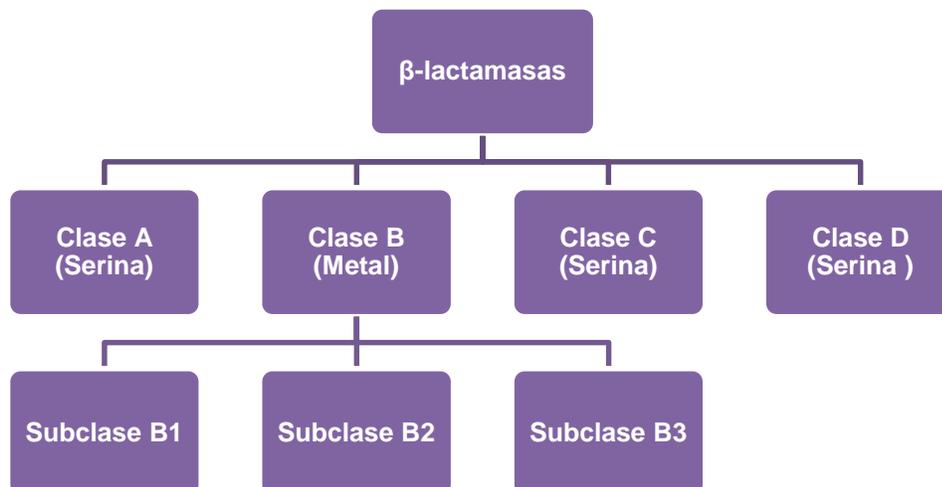
La clasificación molecular o clasificación de Ambler se basa en la secuencia de aminoácidos y divide las  $\beta$ -lactamasas en cuatro grupos mayores denominados A, B, C y D según la homología de las proteínas. Las enzimas de los grupos A, C, y D son serina  $\beta$ -lactamasas, que utilizan serina para la hidrólisis. Las enzimas de la clase B son metalo  $\beta$ -lactamasas, metaloenzimas que requieren iones de zinc divalentes para la hidrólisis (Paterson & Bonomo, 2005).

La clasificación funcional o esquema de Bush-Jacoby-Medeiros se basa en las características funcionales, teniendo en cuenta distintos criterios como: peso molecular, secuenciación de nucleótidos, punto isoelectrico, el espectro de hidrólisis, el espectro de inhibición, la codificación plasmídica o cromosómica, etc. (Bradford & Bradford, 2001).

### 1. **Clasificación de Ambler**

En 1980, Ambler clasificó las  $\beta$ -lactamasas en función de su estructura y secuencia de aminoácidos en cuatro clases de la letra A – D, así como los subgrupos B1, B2 y B3 (Figura 2).

**Figura 2: Clasificación molecular de las  $\beta$ -lactamasas.**



Modificado de: (Frère et al., 2005)

- a) *Clase A*: Están presentes en bacterias Gram positivo y Gram negativo. Pueden ser de origen cromosómico o plasmídico y su peso molecular es de aproximadamente 25 KDa. Dentro de este grupo se encuentran las BLEE derivadas de TEM, SHV y CTX-M (Frére *et al.*, 2005).
- b) *Clase B*: Estas enzimas se caracterizan por utilizar un ión zinc, para unir el residuo histidina o cisteína con el grupo carboxilo de la unión amida de la mayoría de  $\beta$ -lactámicos, e incluye penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Comprende el grupo más heterogéneo de  $\beta$ -lactamasas, con tres subgrupos diferentes (Frére *et al.*, 2005).

Los subgrupos B1 y B3 contienen a la mayoría de enzimas con amplio espectro de acción frente  $\beta$ -lactámicos, excepto monobactámicos. El subgrupo B2 son Carbapenemasas que tienen poca acción frente a las penicilinas y cefalosporinas. Además, las enzimas de los subgrupos B1 y B3 presentan su máxima actividad cuando tienen dos átomos de zinc unidos, contrario a las enzimas del subgrupo B2 que se inactivan (Frére *et al.*, 2005)

- c) *Clase C*: Son proteínas de gran tamaño, con peso molecular aproximado de 39 KDa. Confieren resistencia a las oximinocefaloporinas y son resistentes a los inhibidores como el ácido clavulánico. Poseen un centro activo con DD-transpeptidasas/carboxypeptidasas que compiten con las PBD encargadas de la síntesis de la pared celular y, de este modo, evitan su unión con el  $\beta$ -lactámico (Gupta, 2007).
- d) *Clase D*: A este grupo pertenecen las serin-oxacilinasas especialmente activas frente a oxacilina. El peso molecular de estas enzimas es alrededor de 30 KDa (Frére *et al.*, 2005)

## **2. Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros**

Las  $\beta$ -lactamasas se pueden clasificar sobre la base de su espectro de acción y según su respuesta a los inhibidores en varios grupos funcionales, según la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros. Esta clasificación es más útil en el diagnóstico microbiológico de laboratorio ya que considera los substratos y los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (Bush & Jacoby, 2010). En la última actualización realizada a este esquema, en 2009, las  $\beta$ -lactamasas se clasifican en 3 grupos de importancia, divididos en varios subgrupos (Ver Tabla 1).

### *a) Grupo 1: Cefalosporinasas*

Incluye la mayoría de las enzimas clasificadas en el grupo C de la clasificación molecular. Generalmente son de origen cromosómico en muchas enterobacterias. Su peso molecular suele ser superior a 30 KDa y su punto isoeléctrico es básico (Bush & Jacoby, 2010).

Este grupo presenta una mayor actividad de hidrólisis en las cefalosporinas que en las bencilpenicilinas y suele ser resistente a la inhibición por ácido clavulánico. Son activas ante las cefamicinas y poseen una alta afinidad por aztreonam, a diferencia de las cefalosporinasas de clase A (Bush & Jacoby, 2010).

El subgrupo 1e agrupa a variantes de las enzimas del grupo 1 con mayor actividad contra ceftazidima y otros oximino- $\beta$ -lactámicos como resultado de sustituciones, inserciones o supresiones en la cadena de aminoácidos (Bush & Jacoby, 2010).

Tabla 1. Comparación entre los esquemas de clasificación de  $\beta$ -lactamasas

CLASIFICACIÓN			Sustrato distintivo	Inhibido por		Característica definitoria	Enzimas representativas
Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler		CA/ TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Fuerte hidrólisis de cefalosporinas y bencilpenicilinas, hidrolizan cefamicina	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis aumentada para ceftazidima y frecuentemente otros oxymimolactámicos.	GC1, CMY-37
2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas	Si	No	Hidrólisis mayor de bencilpenicilinas que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de primera generación	Si	No	Hidrólisis similar en bencilpenicilinas y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactam	Si	No	Hidrólisis incrementada en oxy-iminolactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistente al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactam	No	No	Hidrólisis aumentada para oxymimino-lactámicos combinado con resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbencilina	Si	No	Hidrólisis aumentada para carbencilina.	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbencilina, cefepime	Si	No	Hidrólisis aumentada para carbencilina, cefepime y cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis aumentada para cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de amplio espectro	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oxymimolactámicos.	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenemes	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemes	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de amplio espectro	Si	No	Hidrólisis de cefalosporinas, inhibidores suicidas como el ácido clavulánico pero no aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenemes	Variable	No	Hidrólisis aumentada de carbapenemes, oxymimino-lactámicos y cefamicinasl.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 <sup>a</sup>	3	B1/B3	Carbapenemes	No	Si	Amplio espectro de hidrólisis, incluido carbapenemes pero no monobactames.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 / L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B2	Carbapenemes	No	Si	Hidrólisis preferencial por los carbapenemes.	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown	--	--	--	--	--

CA: ácido clavulánico; TZB: Tazobactam; NI: no incluido

Modificado de: (Bush &amp; Jacoby, 2010)

*b) Grupo 2: serina  $\beta$ -lactamasas*

Este grupo incluye a las enzimas de las clases A y D de la clasificación de Ambler y representa el grupo más extenso de  $\beta$ -lactamasas, incluyendo las BLEE y BLEA.

Las  $\beta$ -lactamasas del subgrupo 2a son un pequeño grupo de  $\beta$ -lactamasas con un espectro relativamente limitado de actividad hidrolítica predominante en cocos Gram positivo. Estas enzimas hidrolizan preferentemente bencilpenicilina y muchos derivados de la penicilina, con mala hidrólisis de las cefalosporinas, carbapenemes o monobactames (Bush & Jacoby, 2010).

El subgrupo 2b hidroliza fácilmente penicilinas y cefalosporinas de primera generación, pero son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam. El subgrupo 2be comprende las enzimas con actividad frente a penicilinas, cefalosporinas y otros oximino- $\beta$ -lactámicos (BLEE) de las familias SHV, TEM, CTX-M, etc. (Bush & Jacoby, 2010).

El subgrupo 2br contiene enzimas que pueden hidrolizar uno o más oximino- $\beta$ -lactámicos y han adquirido resistencia al ácido clavulánico e inhibidores relacionados, aunque conserva el mismo espectro de hidrólisis del subgrupo 2b (Bush & Jacoby, 2010).

El subgrupo 2c comprende penicilinasas con habilidad de hidrolizar la carbenicilina o ticarcilina más rápido que las bencilpenicilinas. Las enzimas del nuevo subgrupo 2de comparten la actividad del subgrupo 2c pero tienen un espectro extendido que incluye los oximino- $\beta$ -lactámicos que no son efectivos contra carbapenemes. El subgrupo

2df incluye  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA con actividad ante carbapenemes (Bush & Jacoby, 2010).

El subgrupo 2e agrupa las cefalosporinasas con capacidad de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y son inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam. Pueden diferenciarse de las enzimas AmpC por su pobre afinidad por aztreonam. Finalmente el subgrupo 2f posee carbapenemasas tipo serina de la clase A molecular. Los carbapenemes son los sustratos predilectos para éstas enzimas, que pueden ser inhibidas por tazobactam (Bush & Jacoby, 2010; Fréte et al., 2005).

*c) Grupo 3: metalo  $\beta$ -lactamasas*

Las metalo  $\beta$ -lactamasas son un grupo de  $\beta$ -lactamasas con función y estructura única. Se diferencian estructuralmente de otras  $\beta$ -lactamasas, ya que requieren al menos un ion de zinc en el sitio activo. Funcionalmente, se distinguen principalmente por su capacidad para hidrolizar carbapenemes, pero a diferencia de las serina  $\beta$ -lactamasas tienen poca afinidad para monobactames y no son inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam. Por el contrario, son inhibidas por sustancias quelantes como EDTA, ácido dipicolínico o 1,10-o-fenantroline (Bush & Jacoby, 2010).

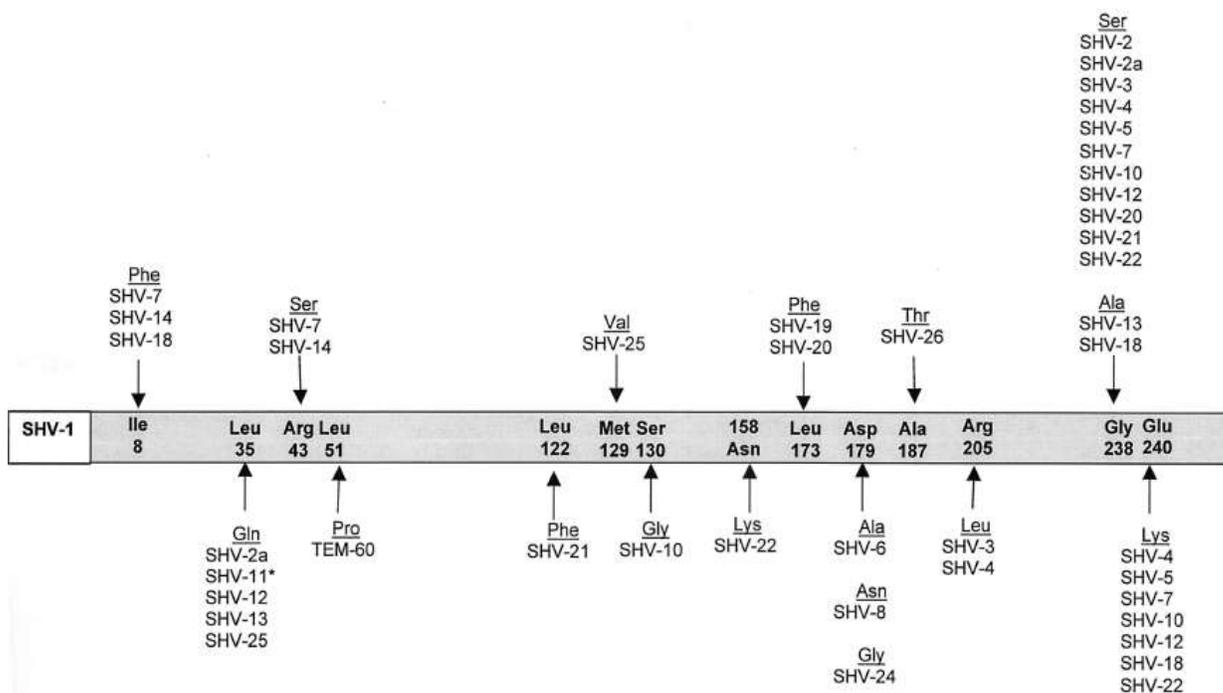
## **E. Diversidad de las $\beta$ -lactamasas**

### **1. Familia SHV (sulfhidrilo variable)**

La denominación SHV de este grupo se debe a que durante los primeros estudios de caracterización de la enzima SHV-1 se pensaba que la inhibición de la actividad estaba relacionada con el sustrato, y esta variaba

según el sustrato usado para el ensayo, por lo que se llamó sulfhidrilo variable.

En 1983 se aisló de una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania, una  $\beta$ -lactamasa que presentaba una actividad hidrolítica mayor frente a cefotaxima que frente a ceftazidima. La enzima aislada presentaba características estructurales similares a la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 descrita previamente. Sin embargo, posteriormente se demostró que difería por la sustitución de una glicina por serina en la posición 238 de la cadena proteica y que este cambio confería actividad frente a cefalosporinas de amplio espectro; por lo que fue denominada SHV-2 (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005).



**Figura 3: Variaciones en la secuencia de aminoácidos de las BLEE tipo SHV.** Todas las BLEE tipo SHV derivan de la enzima SHV-1. Mutaciones puntuales en el gen *bla<sub>SHV</sub>* generan cambios en la secuencia de aminoácidos y en el perfil hidrolítico de la enzima. Por ejemplo, la sustitución de Aspartato por Alanina en la posición 179 da origen a la enzima SHV-6.

Tomado de: (Bradford, 2001)

Las BLEE tipo SHV derivan de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 por sustituciones en aminoácidos críticos en el sitio activo de la enzima, lo cual provoca el aumento del espectro de acción (Ver Figura 3). Estos cambios de aminoácidos provocan el agrandamiento del centro activo de la enzima permitiendo el acoplamiento de la cadena lateral R larga de las cefalosporinas de tercera generación; y ello favorece la hidrólisis del anillo betalactámico (Geser et al., 2012).

La enzima SHV-1, de la cual se derivan el resto de enzimas, se encuentra presente de forma universal en *Klebsiella pneumoniae*. Además, en muchas de éstas cepas el gen que codifica SHV-1 se encuentra en el cromosoma bacteriano. Pero, en la mayoría de cepas de *Escherichia coli*, se encuentra de forma plasmídica, lo cual sugiere que el gen evolucionó de un gen cromosomal que posteriormente se incorporó en un plásmido y se dispersó a otras especies de enterobacterias. Hasta la fecha existen más de 100 variantes de  $\beta$ -lactamasas SHV en bacilos Gram negativo, la mayoría de las cuales presentan espectro extendido (Shaikh, Fatima, Shakil, & Rizvi, 2015).

## 2. Familia TEM

La primera enzima de este grupo fue descrita en 1965 en Atenas. El aislamiento de *Escherichia coli* del cual se obtuvo provenía de una paciente llamada Temoniera, por lo que fue nombrada como TEM-1 (Gupta, 2007).

La  $\beta$ -lactamasa TEM-1 es una proteína globular formada por dos dominios: uno de ellos contiene una hélice- $\alpha$  (formada por ocho hélices, H2-H9) y el otro dominio está formada por una lámina- $\beta$  que contiene cinco láminas antiparalelas ( $\beta$ 1 a  $\beta$ 5) y tres hélices (H1, H10, H11) alrededor de la hélice- $\alpha$ . El centro activo de la enzima se encuentra situado en el extremo N terminal hélice  $\alpha$  H2 (Knox, 1995). Huang y colaboradores estudiaron los

residuos de aminoácidos críticos para la estructura y función de la enzima y encontraron que solamente 43 de los 263 aminoácidos que contiene TEM-1 son insustituibles (Huang *et al.*, 1996; Bradford & Bradford, 2001).

TEM-1 es además, la enzima más común relacionada a la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos en bacilos Gram negativo, ya que se ha reportado hasta en 90 % de las *E. coli* ampicilina resistentes. También es responsable de la resistencia a penicilina y ampicilina mostrada en *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* (P. A. Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005).

Todas la BLEE del tipo TEM son derivadas de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y TEM-2, por modificación en la secuencia de aminoácidos, lo cual provoca mayor estabilidad de la enzima y aumento en el perfil hidrolítico hacia los sustratos (Ver Figura 4) (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005). Además, mutaciones puntuales en los aminoácidos Met-69, Arg-244, Arg-275, y Asn-276 de TEM confieren resistencia a inhibidores como el ácido clavulánico (P. A. Bradford, 2001).

La primera BLEE de esta familia descrita fue la enzima TEM-12 en 1982 y, desde entonces, se han descrito más de 100 tipos diferentes de  $\beta$ -lactamasas tipo TEM, la mayoría de las cuales son BLEE (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005).

Las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM se encuentran con mayor frecuencia en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, pero también se han aislado de otras especies de *Enterobacteriaceae* tales como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* y *Salmonella* spp (Bradford, 2001).



Las  $\beta$ -lactamasas del tipo CTX-M presentan mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima y ceftriaxona que frente a ceftazidima e hidrolizan eficazmente el cefepime. Los microorganismos productores de estas enzimas suelen tener unas CIM para cefotaxima  $> 64 \mu\text{g/mL}$  y  $2-8 \mu\text{g/mL}$  para ceftazidima. Sin embargo, en algunos casos las CIM para ceftazidima alcanzan valores de  $256 \mu\text{g/mL}$  (Bonnet, 2004; Paterson & Bonomo, 2005).

Las BLEE tipo CTX-M poseen 291 aminoácidos y los aminoácidos en posición 240 y 267 han sido claves en la evolución de la enzima, ya que son los sitios más comunes de variación por mutaciones que confieren actividad aumentada al cefotaxima (Bonnet, 2004; Gupta, 2007; Paterson & Bonomo, 2005).

Las enzimas de esta familia están estrechamente relacionadas a las  $\beta$ -lactamasas aisladas en el género *Kluyvera*. La enzima CTX-M8 comparte el 99% de la secuencia de aminoácidos con la BLEE cromosómica KLUG-1 aislada en *Kluyvera georgiana*, mientras que solamente comparten 40% de con las BLEE tipo TEM y SHV (Bonnet, 2004; Paterson & Bonomo, 2005).

Se reconocen más de 65 variantes de  $\beta$ -lactamasas CTX-M las cuales se encuentran divididas en 5 subgrupos relacionados filogenéticamente en función de la homología en la secuencia de aminoácidos: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, CTX-M25 (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Mendonça et al., 2007).

Estudios epidemiológicos recientes demuestran que las BLEE del tipo CTX-M son las  $\beta$ -lactamasas más frecuentemente encontradas en enterobacterias y han desplazado a las enzimas de tipo TEM y SHV (Du et al., 2008; Gupta, 2007; Paterson & Bonomo, 2005). En Estados Unidos, se estima que el 36.8% de las *E. coli* productoras de BLEE del tipo CTX-M son

responsables de la bacteremias e infecciones del tracto urinario (ITU) adquiridas en la comunidad (Doi et al., 2013; Paterson, Hujer, Hujer, Yeiser, Bonomo, Rice, Bonomo, et al., 2003).

#### **4. Familia OXA**

Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA se caracterizan por su alta actividad hidrolítica frente a cloxacilina y oxacilina. Son resistentes a ampicilina, cefalotina y débilmente inhibidas por el ácido clavulánico (Paterson & Bonomo, 2005). Además, otras BLEE del tipo OXA presentan mayor acción sobre ceftazidima, cefotaxima y cefepime que sobre ceftazidima (Bush & Jacoby, 2010).

Se encuentran de forma predominante en *Pseudomonas aeruginosa* pero se ha detectado en varias especies de bacterias Gram negativo. La variante más común de estas  $\beta$ -lactamasas, OXA-1, ha sido determinada hasta en 10 % de aislamientos *Escherichia coli*. Desafortunadamente, existen pocos datos epidemiológicos y geográficos sobre la distribución de las BLEE tipo OXA; los datos disponibles sugieren que su evolución ha sido paralela a la de las enzimas TEM y SHV (Shaikh et al., 2015).

#### **5. Familias PER, VEB-1, BES-1 y otras BLEE**

Recientemente se ha identificado gran variedad de  $\beta$ -lactamasas, codificadas en plásmidos e integrones, asociadas a enzimas de la clase A. Las nuevas enzimas no son variantes causadas por mutaciones puntuales de otras  $\beta$ -lactamasas conocidas y poseen gran diversidad geográfica (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Khanfar, Bindaayna, Senok, & Botta, 2009; Paterson & Bonomo, 2005).

Las BLEE tipo PER comparten entre 25-27 % de homología con las tipo TEM o SHV. La  $\beta$ -lactamasa PER-1 hidroliza penicilinas, cefalosporinas y

es susceptible al ácido clavulánico. Esta enzima fue aislada por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* y posteriormente se ha encontrado en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e inclusive en *Vibrio cholerae* O1 El Tor (P. A. Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005).

VEB-1 comparte una homología de 38 % con PER-1 y PER-2, y confiere resistencia a elevada ceftazidima, cefotaxima y aztreonam; pero es inhibida por ácido clavulánico. Frecuentemente, el gen *bla*<sub>VEB-1</sub> se encuentra codificado en plásmidos que también confieren resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos (Paterson & Bonomo, 2005).

Las BLEE de los tipos GES, BES, TLA, SFO e IBC son otros ejemplos de enzimas de espectro extendido no TEM y no SHV aisladas alrededor del mundo (G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Paterson & Bonomo, 2005). Las BLEE tipo VEB se han aislado en enterobacterias del sureste asiático y en Francia. Las enzimas del tipo GES/IBC se han reportado en patógenos hospitalarios de Sudáfrica y Francia; mientras que PER-1 se ha identificado en aislamientos hospitalarios de bacilos Gram negativo no fermentadores de Turquía y Sur América (Pitout, Nordmann, Laupland, & Poirel, 2005).

#### **F. Métodos microbiológicos de detección de BLEE**

La mayoría de los métodos diseñados para detectar microorganismos productores de BLEE están basados en la propiedad de estas enzimas de ser inhibidas por el ácido clavulánico y otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para los métodos confirmatorios y de screening empleados para detectar la presencia de BLEE están contenidas en el documento M100 S-25.

### 1. **Método de difusión en disco**

El CLSI propone este método como screening para la producción de BLEE en *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Proteus*. Se utilizan los siguientes antibióticos y se sospecha BLEE cuando el diámetro del halo de inhibición tiene los valores indicados: cefpodoxima ( $\leq 17$ mm), ceftazidima ( $\leq 22$ mm), aztreonam y cefotaxima con ( $\leq 27$ mm), o ceftriaxona ( $\leq 25$ mm). Utilizando más de uno de estos agentes se aumenta la sensibilidad (CLSI, 2014; Luzzaro et al., 2006).

Puede utilizarse, como método de confirmación, discos de cefalosporinas con ácido clavulánico y sin él. Una diferencia de mayor o igual a 5 mm entre el halo de inhibición del disco de cefalosporina y su respectivo disco cefalosporina/ácido clavulánico confirma la existencia de BLEE (CLSI, 2014).

### 2. **Concentración inhibitoria mínima (CIM)**

Según recomendaciones del CLSI, cuando se utiliza el método de dilución para la detección de BLEE en *Escherichia coli*, se sospecha de BLEE cuando la CIM es  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$  para todos los antibióticos testeados excepto cefpodoxima cuya CIM debe ser  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  (CLSI, 2014).

La prueba fenotípica confirmatoria de BLEE utiliza ceftazidima (0.25 a 128  $\mu\text{g/mL}$ ), ceftazidima/ácido clavulánico (0.25/4 a 128/4  $\mu\text{g/mL}$ ), cefotaxima (0.25 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ) y cefotaxima/ ácido clavulánico (0.25/4 a 64/4  $\mu\text{g/mL}$ ). Es importante hacer notar, que en la prueba confirmatoria debe utilizarse tanto ceftazidima como cefotaxima. La prueba confirmatoria es positiva cuando se observa una disminución de  $\geq 3$  diluciones seriadas en la CIM para cada cefalosporina en presencia de ácido clavulánico comparada con la CIM de la cefalosporina sola (CLSI, 2014).

### 3. *E-test*

Esta técnica comercial consiste en el uso de tiras plásticas impregnadas en un extremo con cefotaxima o cefepime, con un gradiente de concentración con CIM de 0.25 a 16 µg/mL, o ceftazidima con un gradiente de concentración con CIM de 0.5 a 32 µg/mL. En el otro extremo de la tira se impregna con un gradiente de una de tres cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima o cefepime) más una concentración constante (4 µg/mL) de ácido clavulánico. La interpretación de la prueba depende del cociente entre las CIMs de la cefalosporina sola y la cefalosporina/ácido clavulánico. El fabricante recomienda la disminución de  $\geq 8$  diluciones seriadas en presencia de ácido clavulánico como evidencia de BLEE. La sensibilidad reportada del método es de 87-100% con especificidad de 95-100%. (García-gómez, Guío, Hernández, Vilar, & Pijoán, 2015; Gupta, 2007).

### 4. *Otros métodos comerciales*

El método Vitek ESBL test (BioMerieux Vitek, Hazelton, Missouri) utiliza cefotaxima y ceftazidima individuales en concentración de 0.5 µg/mL, y las mismas cefalosporinas en combinación con ácido clavulánico en concentración de 4 µg/mL. El análisis de los pozos se realiza de forma automatizada después de 4-15 horas de incubación. La sensibilidad y especificidad del método son superiores al 90 % (Paterson & Bonomo, 2005).

Becton Dickinson Biosciences (Sparks, Md) ha introducido un método comercial con un corto periodo de incubación para la determinar la sensibilidad antimicrobiana, conocido como BD Phoenix. El BD Phoenix BLEE usa el crecimiento en respuesta a la presencia de cefpodoxime, ceftazidima, ceftriaxone y cefotaxima, con y sin ácido clavulánico para detectar la presencia de BLEE y los resultados se obtienen en 6 horas (Paterson & Bonomo, 2005).

## G. Métodos Moleculares de detección de BLEE

Los métodos microbiológicos tienen como finalidad detectar la presencia de BLEE en los aislamientos bacterianos. Sin embargo, estos métodos no pueden identificar el tipo específico de BLEE presente, lo cual, es bastante complicado (P. A. Bradford, 2001; G. A. Jacoby & Muñoz-Prince, 2005; Paterson & Bonomo, 2005).

Inicialmente, la determinación del punto isoeléctrico (pI) fue utilizada para identificar el tipo de BLEE presente. Sin embargo, muchas  $\beta$ -lactamasas poseen puntos isoeléctricos idénticos, por lo que su uso es limitado (P. A. Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005).

**Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos moleculares empleados para caracterizar BLEE**

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>Sondas de ADN</b>	Específica para cada familia de genes ( <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , etc.)	Método engorroso, no permite distinguir entre las variantes BLEE y no BLEE de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> y <i>bla</i> <sub>SHV</sub>
<b>PCR</b>	Fácil de realizar, específica para cada familia de genes ( <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , etc.)	No permite distinguir entre las variantes específicas de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> y <i>bla</i> <sub>SHV</sub>
<b>Oligotyping</b>	Detecta variantes específicas de cada gen.	Requiere el uso de oligonucleótidos específicos, es engorroso y no detecta nuevas variantes.
<b>PCR-RFLP</b>	Fácil de realizar, permite detectar mutaciones puntuales (de 1 nucleótido)	Mutaciones puntuales conllevan una alteración en el sitio de restricción y por ende afectan la detección.
<b>PCR-SSCP</b>	Detecta variantes específicas de <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .	Requiere condiciones de electroforesis especiales.
<b>LCR</b>	Detecta variantes específicas de <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .	Requiere un gran número de primers.
<b>Secuenciación</b>	Es el gold estándar y permite determinar todas las variantes	La interpretación de los resultados puede ser difícil con métodos manuales. Elevado costo.

*PCR: polymerase chain reaction, LCR:lygase chain reaction, RFLP: restriction fragments length polymorphism, SSCP: single stranded conformational polymorphism*

Modificado de: (P. A. Bradford, 2001)

Los métodos moleculares permiten la identificación de los genes estructurales de las diferentes familias de  $\beta$ -lactamasas como *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>. Sin embargo, la identificación de las variantes específicas sigue siendo un reto y la secuenciación sigue siendo el método de elección. La Tabla 2 muestra los principales métodos moleculares utilizados en la identificación de BLEE, sus ventajas y desventajas.

El primer método molecular de identificación de  $\beta$ -lactamasas fue el oligotyping, el cual se usó para diferenciar TEM-1 de TEM-2. En ese método las sondas fueron diseñadas para detectar mutaciones puntuales bajo condiciones estrictas de hibridización. Posteriormente se desarrollaron sondas adicionales para detectar 6 mutaciones puntuales en el gen *bla*<sub>TEM</sub>, pero por ser un método laborioso pronto fue reemplazado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (P. A. Bradford, 2001).

La PCR es el método molecular más sencillo para identificar la presencia de una determinada familia de  $\beta$ -lactamasas mediante el uso de primers específicos para detectar el gen que codifica la enzima. Los primers generalmente son diseñados para reconocer y unirse a las regiones del gen que presenta mutaciones puntuales con mayor frecuencia. Sin embargo, es necesario complementar el análisis con otros métodos para discriminar entre las diferentes variantes de enzimas como TEM y SHV. El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, RFLP por sus siglas en inglés, se ha utilizado con esta finalidad (P. A. Bradford, 2001).

En la PCR-RFLP, los productos obtenidos en la PCR son sometidos a digestión enzimática por endonucleasas que reconocen secuencias específicas presentes en el gen a analizar; los fragmentos obtenidos son separados e identificados posteriormente por electroforesis. Los tamaños de los fragmentos obtenidos con la digestión enzimática indican las mutaciones puntuales

presentes en los genes estructurales de las  $\beta$ -lactamasas. La desventaja principal es que las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas, por lo que solamente se requiere una enzima para cada mutación (P. A. Bradford, 2001).

Otro método molecular utilizado para caracterizar variantes de BLEE en combinación con la PCR es el análisis por medio de polimorfismos de conformación de cadena simple, SSCP por sus siglas en inglés, que permite detectar mutaciones puntuales en localizaciones específicas del gen. Con PCR-SSCP, los fragmentos de doble cadena de ADN son desnaturalizados y separados en un gel de poliacrilamida al 20% y las variantes de cada  $\beta$ -lactamasa pueden ser identificadas mediante el patrón electroforético mostrado (P. A. Bradford, 2001).

La reacción en cadena de la ligasa (LCR) se ha utilizado para determinar algunas variantes de *bla*<sub>SHV</sub> ya que permite la discriminación de las secuencias de ADN que difieren por un par de bases mediante el uso de una ligasa termoestable y cuatro primers biotinilados complementarios a la secuencia blanco y que se hibridizan de forma adyacente uno de otro. Posteriormente, el producto de LCR es detectado por medio de una reacción enzimática con NADPH-fosfatasa alcalina (P. A. Bradford, 2001).

La secuenciación continua siendo el método de referencia para la determinación específica del gen de  $\beta$ -lactamasa (*bla*) presente en los aislamientos. Pero su interpretación puede ser difícil, sobre todo, cuando se utilizan métodos manuales de interpretación para la determinación de las enzimas.

## H. Distribución y epidemiología de las BLEE SHV, TEM y CTX-M en *Enterobacteriaceae*

La diseminación de las BLEE es extremadamente fácil debido a que están codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual, posibilita no sólo la diseminación de este mecanismo de resistencia entre distintas cepas de la misma especie, sino también entre diferentes especies bacterianas (Koneman, 2008).

Aunque en principio, las BLEE fueron aisladas de pacientes hospitalizados, actualmente han ocurrido aislamientos en cepas de infecciones adquiridas en la comunidad (Doi et al., 2013). A partir del año 2000 se ha observado un aumento de aislamientos de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M que afectan a pacientes de la comunidad y, principalmente, están implicadas en Infecciones del Tracto Urinario (ITU). Generalmente, estas cepas también son resistentes a quinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim sulfametoxazol (Coque et al., 2008; Mendonça et al., 2007).

Los primeros casos de enterobacterias productoras de BLEE fueron detectados en Europa en 1983 y las primeras variantes caracterizadas fueron SHV-2 y TEM-2 en pacientes hospitalizados. Además, en 1986 se detectó en Francia el primer brote nosocomial de *K. pneumoniae* con la variante TEM-3, produciéndose un aumento dramático de los casos de BLEE en los años sucesivos, en todo el mundo. Posteriormente, en la década de 1990 del 25 al 30 % de los aislamientos de *K. pneumoniae* eran portadores de BLEE; tasa que logró reducirse a 7.9 % para el año 2000, después de adoptar diversas medidas de control (Paterson & Bonomo, 2005).

Los primeros informes sobre organismos productores de BLEE en Estados Unidos datan de 1988. En 1989, se informan casos de infecciones producidas por variantes SHV y CTX-M en Canadá y Estados Unidos. La prevalencia de organismos productores de BLEE quizás ha sido subestimada en el pasado,

debido a los puntos de corte establecidos para las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  y cefotaxima CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ) a pesar que muchos microorganismos productores de BLEE tienen CIMs entre 2 y 16  $\mu\text{g/mL}$ .

En estudios realizados en el periodo 1998-2002 con 6,101 aislamientos de *K. pneumoniae* se observó que 6.1 % de los aislamientos son resistentes a cefalosporinas de tercera generación, mientras que en pacientes comunitarios la tasa es 1.8 % para *K. pneumoniae* y 0.4 % en *E. coli* (Paterson & Bonomo, 2005)

El primer reporte de un aislamiento de BLEE en América Latina ocurre en el año de 1989. En la actualidad, esta región tiene la tasa más elevada del mundo, existiendo variaciones dentro de los países que la forman, y siendo los de mayor prevalencia Brasil y Chile, donde se han detectado enzimas de tipo CTX-M, PER, TEM y SHV. Además se ha observado el aumento de las infecciones producidas en la comunidad, y se reporta la prevalencia más alta en el mundo de aislamientos para *K. pneumoniae* portadora de BLEE, 45.4 - 51.9 %, y para *E. coli* BLEE positiva con 8.5 - 18.1 % (Villegas, Kattan, Quinteros, & Casellas, 2008).

En Guatemala, se han reportado prevalencias de 14 – 27 % de cepas portadoras de BLEE, de pacientes que asisten a clínicas periféricas del Seguro Social y emergencia del Hospital Roosevelt; siendo *Escherichia coli* el patógeno más frecuentemente aislado a partir de infecciones del tracto urinario (Alvarado & Mejía, 2014; Najera, 2005). Adicionalmente, estudios realizados con aislamientos de los servicios hospitalarios han reportado prevalencias de 26 % y 31.9 % para el Hospital General San Juan de Dios y el Hospital Roosevelt, siendo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* los más comunes (Gordillo et

al., 2014; Pensamiento, 2006). Sin embargo, se desconoce el tipo de BLEE responsable de la resistencia presente en esos aislamientos.

## I. Tratamiento, control y prevención

### 1. *Tratamiento*

Las enterobacterias productoras de BLEE son resistentes por regla general a todas las cefalosporinas y penicilinas de espectro extendido, incluyendo aztreonam. Las cefalosporinas de tercera y cuarta generación no deben ser utilizadas aún en presencia de una aparente susceptibilidad (Pitout, 2009; Tumbarello et al., 2006).

Las cefamicinas como el cefoxitin, cefotetan y moxalactam pueden ser utilizadas para el tratamiento de *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEE. Sin embargo, la terapia con cefamicinas conlleva la aparición de resistencia por el mecanismo AmpC mediado por plásmidos. La terapia con trimetoprim sulfametoxazol y aminoglucósidos puede estar comprometida si los genes que median la resistencia para ambos es co-transferida en el mismo plásmido de la BLEE (Pitout, 2009; Sanguinetti et al., 2003).

Las cepas productoras de BLEE generalmente son susceptibles a la combinación de un  $\beta$ -lactámico/inhibidor  $\beta$ -lactamasa, pero estos medicamentos pueden ser inefectivos frente a grandes cantidades de enzima y mostrar una resistencia *in vivo*. Actualmente, los carbapenemes son el tratamiento de elección para los microorganismos productores de BLEE (Pitout, 2009; Sanguinetti et al., 2003; Tumbarello et al., 2006).

Desafortunadamente la terapia con carbapenemes genera una presión selectiva y conlleva el surgimiento de cepas productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas resistentes a carbapenemes, en cuyo caso la única opción

terapéutica es la polimixina en combinación con algún aminoglucósido; por ello, su uso debe ser controlado (Paterson & Bonomo, 2005; Pitout, 2009).

## **2. *Prevención y control***

La resistencia a antibióticos es un grave problema a nivel hospitalario y comunitario. La producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es un importante mecanismo de resistencia, por lo que el uso de las barreras adecuadas y buenas prácticas son esenciales para prevenir la propagación de la resistencia y los brotes de bacterias productoras de BLEE (Pitout, 2009; Tumbarello et al., 2006).

Existe una serie de vehículos que facilitan la diseminación de la resistencia entre las diferentes especies, como son el tubo digestivo, la orofaringe, las heridas colonizadas y otros. A ello se suma el uso de fómites hospitalarios como termómetros, geles empleados en ecografía, sondas, jabón líquido, joyería y la higiene de las manos de los profesionales (Sanguinetti et al., 2003; Tumbarello et al., 2006).

Dentro de los factores predisponentes para la aparición de brotes destaca el uso excesivo de antimicrobianos, principalmente de cefalosporinas de tercera generación, aunque también se han relacionado al uso de fluoroquinolonas, aztreonam, aminoglucósidos, trimetoprim sulfametoxazol y metronidazol. Los grupos de pacientes más frecuentemente afectados en los brotes son: neonatos, quemados, pacientes con cáncer, trasplantados y los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (P. A. Bradford, 2001; G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Paterson & Bonomo, 2005).

Algunas medidas que han resultado eficaces a la hora de reducir la aparición y diseminación de cepas portadoras de BLEE son:

1. Restricción del uso de cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas; especialmente en el uso empírico.
2. Aislamiento cutáneo ante la detección de una colonización (no infección) por cepas productoras de BLEE: habitación individual, uso de guantes y bata, cambio de guantes y lavado de manos con solución antiséptica entre pacientes.
3. Educación sanitaria en materia de prevención del personal.
4. Lavado exhaustivo de manos, incluso con productos desinfectantes.
5. Mejorar la detección de BLEE por parte del laboratorio (Hernández, 2010).

## IV. OBJETIVOS

### A. General

Detectar los genes de  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en aislamientos comunitarios de *Escherichia coli* productoras de BLEE a partir de urocultivos de pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico Popular.

### B. Específicos

1. Estimar la frecuencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes que asistieron al Laboratorio Clínico Popular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia durante el primer cuatrimestre del año 2016.
2. Describir el perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Escherichia coli* productores de BLEE, adquiridas en la comunidad, portadores de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>.

## V. METODOLOGÍA

### A. Diseño de la investigación

#### 1. Tipo de estudio

Este estudio es de tipo prospectivo, transversal

#### 2. Hipótesis

Este estudio no presenta hipótesis estadística.

### B. Unidades de análisis

En el estudio se incluyeron todos aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos a partir de los urocultivos de pacientes ambulatorios, en los que se determinó la presencia de  $\beta$ - lactamasas de espectro extendido (BLEE) por medio del método de difusión en disco en el Laboratorio Clínico Popular, durante los meses de enero a abril del año 2016.

### C. Recursos

#### 1. Institucionales

- a. Área de Microbiología, Laboratorio Clínico Popular –LABOCLIP-
- b. Instituto para la Investigación Científica y Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas Humanas –INVEGEM – Rozas Botrán ONG.

#### 2. Físicos

- a. *Materiales y suministros de laboratorio*
  - Guantes de nitrilo libres de polvo.
  - Puntas bloqueadas de pipeta de 10, 100 y 1000  $\mu$ L
  - Pipetas automáticas de volumen variable 0.5-10  $\mu$ L, 10 - 100  $\mu$ l, 100 - 1000  $\mu$ l.
  - Tubos de 0.2 mL PCR clean, libres de DNAsas, RNAsas y pirógenos.

- Tubos de 0.6 mL PCR clean, libres de DNAsas, RNAsas y pirógenos
- Marcador indeleble negro.
- Papel parafilm

b. *Reactivos*

- Caldo LB
- Etanol al 70%
- Isopropanol
- Kit de extracción de ADN para Gram Negativos Promega®
- Kit Go Taq DNA polimersa Promega® (dNTPS, MgCl<sub>2</sub> y Buffer 5X)
- Agarosa grado analítico
- GelRed® 10,000X
- Primers foward y reverse específicos para amplificación de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTMX</sub>.
- H<sub>2</sub>O libre de nucleasas

c. *Equipo*

- Termociclador.
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Minicentrífuga.
- Incubadora
- Termomixer
- Vórtex
- Transiluminador
- Congelador y refrigerador

## D. Métodos

### 1. Métodos pre-analíticos

#### a) Selección de las cepas

En este estudio se incluyeron todos los aislamientos de *Escherichia coli*, obtenidos a partir de urocultivos de pacientes ambulatorios, que presentaron el mecanismo de resistencia BLEE detectado fenotípicamente por medio del método de difusión en disco en el área de Microbiología del Laboratorio Clínico Popular.

Para el análisis molecular se conservaron las cajas de agar Mueller Hinton en las que se evidenció la presencia de BLEE.

#### b) Recolección de las información

Los datos de análisis del estudio fueron recolectados por medio de la revisión de los expedientes de los pacientes, en la base de datos del programa WHONET del área de Microbiología del Laboratorio Clínico Popular.

#### c) Transporte y almacenamiento de muestras

Las cajas con el cultivo de *Escherichia coli* en Mueller Hinton se almacenaron a 4 °C selladas con papel parafilm hasta su transporte al laboratorio, el cual se realizó en un tiempo máximo de 4 semanas.

#### d) Consideraciones éticas:

Debido a que el presente estudio se realizó utilizando cepas bacterianas, no fue necesario el uso de consentimiento informado para los pacientes.

## 2. Métodos analíticos

Para la detección de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> de β-lactamasas en aislamientos de *Escherichia coli* se realizaron los siguientes procedimientos:

### a) Enriquecimiento del cultivo:

Todas las cepas de *Escherichia coli* fueron inoculadas en 5mL de caldo LB (Luria Berthani) para su enriquecimiento por 48 horas a 37 °C. Posteriormente se tomaron aproximadamente 400 μL para realizar la extracción de DNA. El cultivo restante fue almacenado a -20 °C con leche descremada como cepario de respaldo.

### b) Extracción de DNA

La extracción de DNA de las cepas se realizó por medio del kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison USA). Las cepas de las cuales no se obtuvo DNA de calidad y cantidad suficiente después de dos extracciones, fueron descartadas para el estudio molecular de los genes.

### c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todos los reactivos utilizados fueron atemperados previamente. Para la amplificación de cada uno de los genes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>) se utilizaron los siguientes primers:

Gen	Secuencia	Producto amplificado	Referencia
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	5' ATGAGTATTCAACATTTCCGTG '3 5' TTACCAATGCTTAATCAGTGAG'3	903 pb	(Tumbarello et al., 2006)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	5' ATGCGTTATATTCGCCTGTG '3 5' TTAGCGTTGCCAGTGCTC '3	713 pb	(Tumbarello et al., 2006)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	5' CGCTTTGCGATGTGCAG '3 5' ACCGCGATATCGTTGGT '3	914 pb	(Paterson et al., 2003)

En cada reacción de PCR se incluyó un control negativo (no template control), para asegurar la no contaminación de los reactivos.

Las concentraciones utilizadas para el master mix de las reacciones de PCR fueron las siguientes:

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
<i>H<sub>2</sub>O nucleasa free</i>	--	--	6.5
<i>Master mix</i>	2X <sup>†</sup>	1x	12.5
<i>Primer Forward</i>	5 µM	0.4 µM	2.0
<i>Primer Reverse</i>	5 µM	0.4 µM	2.0
<b>Total Master Mix</b>			<b>23.00</b>
<b>ADN molde</b>			<b>2.00</b>

<sup>†</sup> La concentración inicial fue tomada en base a la presentación de los reactivos de la marca Promega GoTaq Pol.

El programa de amplificación empleado para realizar las PCR de los genes fue el siguiente:

Pasos	Tiempo	Temperatura °C	Ciclos
<b>Primera Desnaturalización</b>	5 min	95	--
<b>Desnaturalización</b>	30 seg	95	
<b>Anillamiento</b>	45 seg	Variable*	30 ciclos
<b>Extensión</b>	1 min	72	
<b>Extensión final</b>	7 min	72	--
<b>Hold</b>	∞	4	--

\* SHV= 50 °C, TEM= 55°C y CTX-M=60 °C

d) *Electroforesis en gel de agarosa 2 %:*

Los productos obtenidos tras la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) con Gel Red 2,000X.

La visualización de los productos amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta. El peso molecular del producto amplificado se determinó utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb.

e) *Secuenciación de Sanger*

Para confirmar que los productos amplificados correspondían a los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*, se seleccionó uno de los productos de PCR de cada gen y fue secuenciado por el método de Sanger, de forma bidireccional por MacroGen, USA (Maryland, USA).

Posteriormente se realizó una prueba en BLAST con la secuencia obtenida, lo cual confirmó la especificidad de la amplificación llevada a cabo. Las secuencias obtenidas fueron analizadas posteriormente con las secuencias de referencia en el programa Geneious R8.8.1.8. Las secuencias fueron traducidas a proteínas y analizadas en el software CLC sequence viewer 8.0 Qiagen®.

## E. Diseño estadístico

### 1. *Tabulación y almacenamiento de datos*

Los datos fueron recolectados a partir de la base de datos del programa WHONET utilizada en el área de Microbiología del LABOCLIP. Las variables obtenidas fueron tabuladas por medio de una base de datos creada previamente.

### 2. *Análisis de resultados*

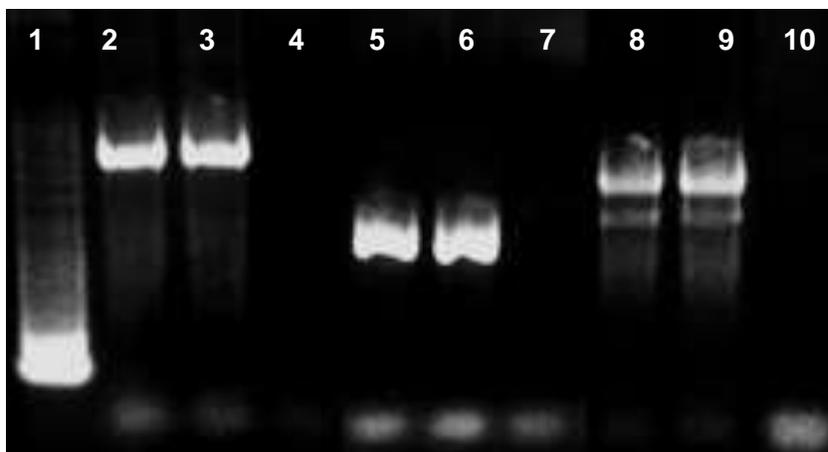
Estadística descriptiva de los aislamientos y los perfiles de resistencia se realizaron mediante el uso del programa Microsoft Excel. Para realizar todas las comparaciones entre grupos se utilizó la herramienta informática OpenEpi versión 3.01, y un valor de  $p \leq 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

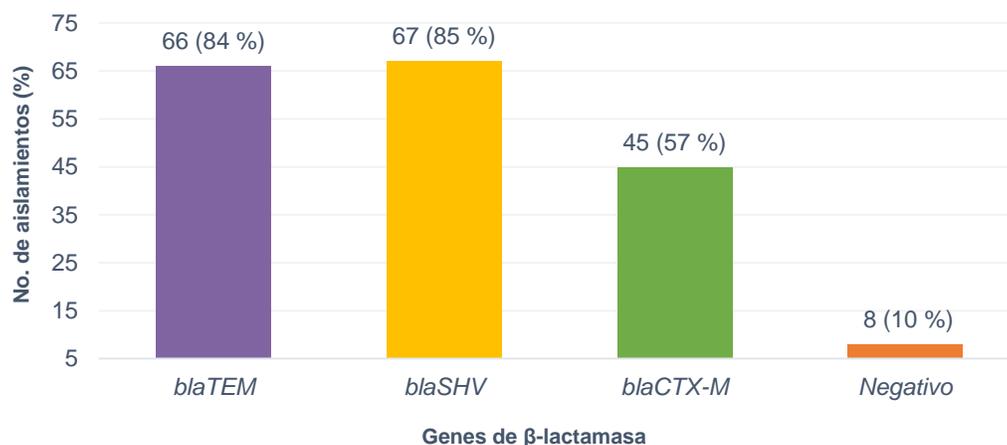
Durante los meses de enero a abril del año 2016, se recolectaron 94 aislamientos comunitarios de *Escherichia coli* productores de BLEE a partir de urocultivos en el área de Microbiología del Laboratorio Clínico Popular. Quince fueron descartados ya que, no se obtuvo crecimiento bacteriano adecuado en el medio de enriquecimiento y la calidad o cantidad del DNA extraído no fue adecuada luego de dos repeticiones.

El 84.0 % de los aislamientos analizados procedían de urocultivos de mujeres. La mediana de la edad fue de 57 años (RIC= 26 – 67 años) para todos los pacientes y 31.6 % presentaba historia de infecciones del tracto urinario (ITU) recurrentes, según el registro del laboratorio (Ver anexos, Tabla 6).

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para analizar 79 cepas productoras de BLEE y determinar la presencia de los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>* (Figura 5). En 90 % de los aislamientos se detectó la presencia de, al menos, uno de los genes analizados tal y como se muestra en la gráfica 1.



**Figura 5. Productos de PCR en gel de agarosa 2 %.** Filas 2 y 3 *bla<sub>TEM</sub>*, filas 5 y 6 *bla<sub>SHV</sub>*, filas 8 y 9 *bla<sub>CTX-M</sub>*, filas 4,7 y 10 blanco de reactivo de PCR. Fila 1 Marcador de peso molecular 100 pb.

**Grafica 1.** Frecuencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>

El 82.3 % (65/79) de las cepas presentó más de uno de los tipos de  $\beta$ -lactamasas, y en más de la mitad se presentaron los tres tipos de enzimas (53.2 %). Las enzimas de tipo TEM y SHV fueron detectadas de forma única en 3.8 % de los aislamientos, por el contrario, las enzimas de tipo CTX-M fueron detectadas siempre de forma conjunta con las enzimas TEM y/o SHV tal y como se muestra en la Tabla 3. En 10.1 % de los aislamientos no se detectó la presencia de las enzimas codificadas por los genes analizados (Ver anexos 1-4).

**Tabla 3.** Frecuencia de los genes de  $\beta$ -lactamasas detectados

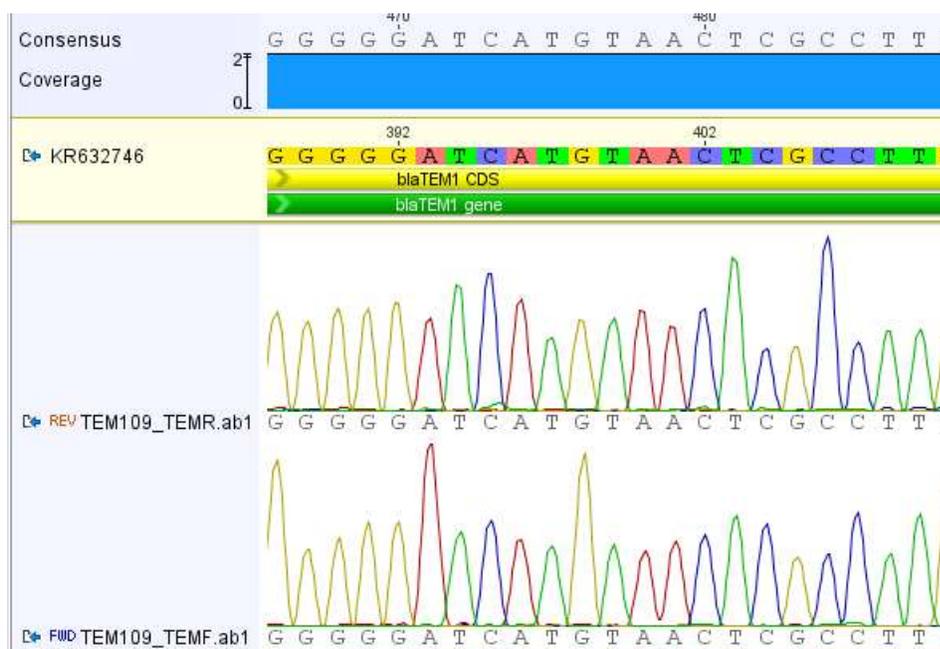
Genes de $\beta$ -lactamasas	Aislamientos (N=79)	% de aislamientos
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> y <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	42	53.2
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	2	2.5
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	1	1.3
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	20	25.3
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	3	3.8
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	3	3.8
Negativo (otra BLEE)	8	10.1

Los productos de PCR de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> obtenidos en cinco cepas productoras de BLEE seleccionadas fueron secuenciados por el

método de Sanger para determinar la enzima específica que causa el mecanismo de resistencia (Ver Figuras 6-8). En el análisis de las secuencias obtenidas se obtuvo una concordancia total con las secuencias reportadas de  $\beta$ - lactamasas (Anexo 5). Los tipos específicos de  $\beta$ - lactamasas obtenidos se observan en la Tabla 4.

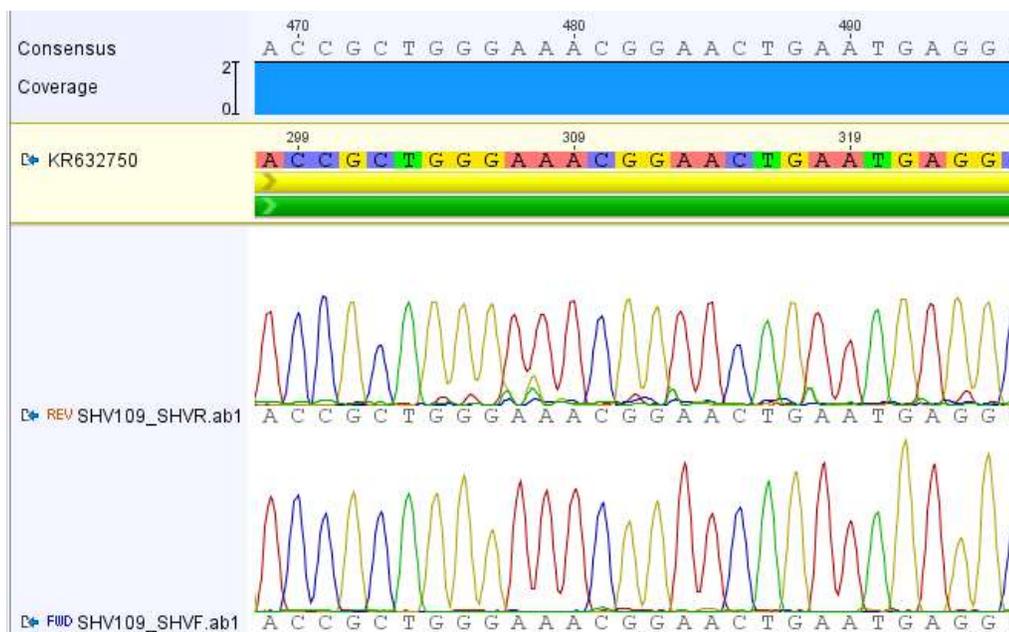
**Tabla 4.** Tipo de  $\beta$ - lactamasa determinado por secuenciación de Sanger bidireccional

Cepa analizada	Tipo de $\beta$ -lactamasa
ECO-57	CTX-M15, SHV-11
ECO-96	CTX-M55
ECO-97	TEM-1
ECO-109	CTX-M15, SHV-11 yTEM-1
ECO-112	SHV-11 yTEM-1



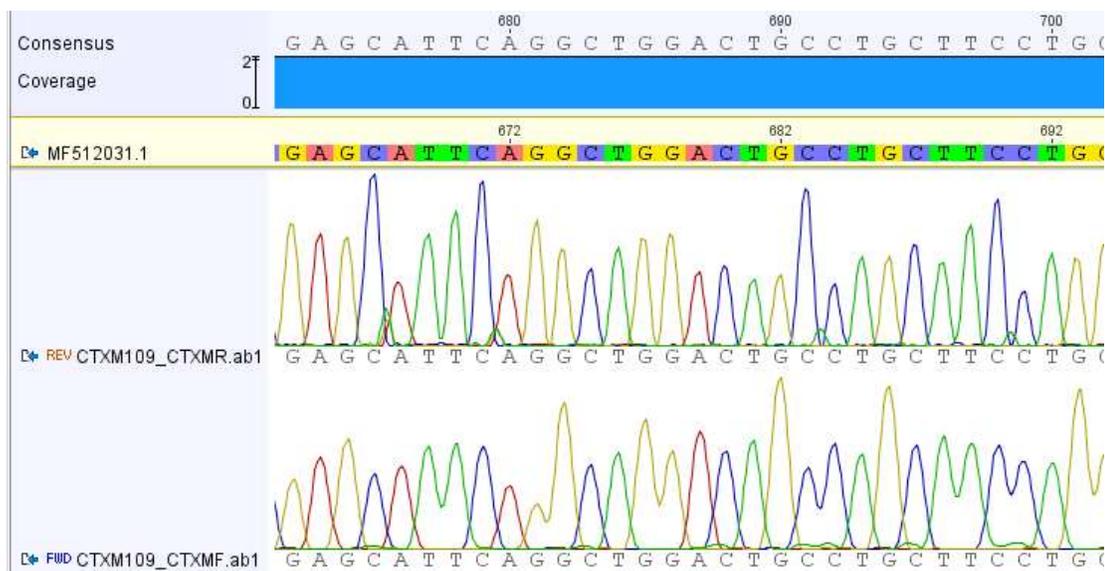
**Figura 6. Electroferograma del producto de PCR para *bla*<sub>TEM</sub>.** Puede observarse el alineamiento entre la secuencia obtenida para la muestra TEM-109 por medio de secuenciación de Sanger bidireccional y la secuencia consenso (KR632746) para la enzima TEM-1.  
(A=adenina/rojo, C=citosina/azul, T=timina/verde y G=guanina/amarillo)

Software: Geneious R8 8.1.8



**Figura 7. Electroferograma del producto de PCR para *bla*<sub>SHV</sub>.** Puede observarse el alineamiento entre la secuencia obtenida para la muestra SHV-109 por medio de secuenciación de Sanger bidireccional y la secuencia consenso (KR632750) para la enzima SHV-11.  
(A=adenina/rojo, C=citosina/azul, T=timina/verde y G=guanina/amarillo)

Software: Geneious R8 8.1.8



**Figura 8. Electroferograma del producto de PCR para *bla*<sub>CTX-M</sub>.** Puede observarse el alineamiento entre la secuencia obtenida para la muestra CTX-M109 por medio de secuenciación de Sanger bidireccional y la secuencia consenso (MF512031.1) para la enzima CTX-M15.  
(A=adenina/rojo, C=citosina/azul, T=timina/verde y G=guanina/amarillo)

Software: Geneious R8 8.1.8

La Tabla 5 muestra el perfil de resistencia de las cepas evaluadas frente a los antibióticos no betalactámicos, incluidos en el antibiograma de forma rutinaria en el Laboratorio Clínico Popular. Los porcentajes más altos de resistencia corresponden a ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol (ambos 62/79). Por el contrario, la resistencia fue baja para fosfomicina (2/79) y nitrofurantoina (6/79).

**Tabla 5.** Perfil de resistencia a antimicrobianos no betalactámicos

Antibiótico	Resistente <sup>α</sup>	Susceptible
Fosfomicina <sup>β</sup>	2.5%	86.1%
Nitrofurantoina	7.6%	92.4%
Ciprofloxacina	78.5%	21.5%
Amoxicilina/Ácido clavulánico	43.0%	57.0%
Trimetoprim sulfametoxazol	78.5%	21.5%

<sup>α</sup> Incluye resultados resistente e intermedio del antibiograma

<sup>β</sup> Nueve de los aislamientos no fueron evaluados para fosfomicina

El 11.39% (9/79) de las cepas estudiadas presentó resistencia a un antibiótico no betalactámico, y en la mayoría la resistencia fue múltiple. El 59.49 % (47/79) fue resistente a ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol de forma combinada, siendo este perfil de resistencia el más común. Además, 29.11 % de las cepas con resistencia a ambos antibióticos presentó también resistencia a la combinación de amoxicilina/ácido clavulánico.

No se encontró diferencia significativa entre la resistencia a ciprofloxacina, trimetoprim sulfametoxazol y amoxicilina/ácido clavulánico cuando se compararon a los pacientes con historia de ITU recurrentes y los que no tenían este antecedente ( $p=0.84$ ,  $p=0.17$  y  $p=0.55$  respectivamente).

## VII. DISCUSIÓN

El LABOCLIP es un laboratorio escuela que atiende diariamente en promedio a 300 pacientes ambulatorios, la mayoría de ellos, tiene un nivel socioeconómico bajo (Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad [EDC], 2018). En el año 2016, el área de Microbiología Clínica del LABOCLIP reportó 36 % de *Escherichia coli* BLEE positivo aisladas de urocultivos, valor superior al 27 % de cepas productoras de BLEE reportado en el 2014 por Alvarado y Mejía en aislamientos comunitarios del seguro social. Además, *E. coli* fue el patógeno más frecuente asociado a infecciones del tracto urinario (93 %).

A nivel mundial se ha reportado un incremento alarmante en las cepas productoras de BLEE provenientes de aislamientos comunitarios; sobre todo en patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*, con *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* como las especies más frecuentes (Fan et al., 2014; Pitout et al., 2005; Shaikh et al., 2015; Tumbarello et al., 2006). La detección y caracterización de estos aislamientos es de vital importancia para la selección de la terapia, el control y prevención de los mismos. Por tal motivo, este estudio tuvo como objetivo detectar los genes de  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en aislamientos comunitarios de *Escherichia coli* productores de BLEE aislados de urocultivos.

Se detectó la presencia de, al menos, uno de los genes analizados en 89.8 % de los aislamientos (71/79). Los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> fueron los más frecuentes con un 84 y 85 % respectivamente. Esto difiere de la mayoría de reportes internacionales en los que las enzimas predominantes durante las últimas dos décadas en cepas productoras de BLEE son enzimas de tipo CTX-M (Mendonça et al., 2007; Moubareck et al., 2005; Doi et al., 2013; Rodríguez-Baño et al., 2004). Sin embargo, uno de los principales problemas de la caracterización de las BLEE es que frecuentemente se asocian a  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA), sobre todo de los tipos TEM y SHV de las cuales se originan, lo cual hace necesario, la

identificación del tipo específico de enzima mediante la secuenciación de los genes para poder discriminar entre unas y otras (P. A. Bradford, 2001; G. A. Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Paterson & Bonomo, 2005).

Por el contrario, la detección del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en aislamientos productores de BLEE es evidencia suficiente para explicar el fenotipo resistente, sin que sea necesario determinar el tipo de enzima específico. Es decir que, en el 57 % de los aislamientos analizados, la enzima CTX-M es responsable del patrón de resistencia mostrado, independientemente de la presencia de las enzimas del tipo TEM y SHV que también fueron detectadas. Este porcentaje concuerda con estudios realizados en cepas *Escherichia coli* comunitarias a nivel mundial, en donde se reporta entre 40 y 70 % de cepas productoras de BLEE del tipo CTX-M (Brigante et al., 2005; Rodriguez-Villalobos et al., 2011; Shaikh et al., 2015).

En los aislamientos que presentaron uno o ambos genes de las familias de tipo TEM y SHV (32.9 %), podemos inferir que al menos una de estas enzimas son de tipo BLEE y no BLEA, aunque es indispensable la confirmación del tipo específico de la enzima por medio de secuenciación o evaluar la presencia de otros tipos de enzimas. Esto también es indispensable para el 10.1 % de los aislamientos en los que no se detectó la presencia de los genes analizados, y por ello debe evaluarse la presencia de enzimas como GES, BES, TLA, SFO e IBC que presentan un espectro extendido y han sido descritas en enterobacterias (P. A. Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005; Shaikh et al., 2015).

Se seleccionaron cinco cepas para la secuenciación de los productos de PCR amplificados y la determinación del tipo específico de enzima presente. La cepa codificada como ECO-109 fue seleccionada debido a que presentó los tres genes de  $\beta$ -lactamasas y los resultados del antibiograma mostraron resistencia a todos los antibióticos no betalactámicos evaluados rutinariamente en el LABOCLIP, a excepción de la fosfomicina que no fue evaluada (ver anexo 1). Además, esta cepa

presentó resistencia a cuatro antibióticos evaluados adicionalmente: cloranfenicol, gentamicina, minociclina y tetraciclina, y fue sensible únicamente a meropenem, imipenem y amikacina. Las cepas ECO-97 y ECO-112 fueron seleccionadas aleatoriamente en el grupo de cepas que no presentaron el gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, y las cepas ECO-57 y ECO-96 fueron seleccionadas aleatoriamente al presentar dos o tres genes. Los resultados de secuenciación obtenidos mostraron que las enzimas presentes corresponden a TEM-1, SHV-11, CTX-M15 y CTX-M55.

La enzima TEM-1 es una  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado que fue identificada por primera vez en el año 1965 y es responsable de, aproximadamente, el 90 % de la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos en *Escherichia coli* (P. A. Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005). Todas la BLEE del tipo TEM son derivadas de esta enzima por mutaciones puntuales que provocan mayor estabilidad de la enzima y aumento en su perfil hidrolítico (incluso ácido clavulánico) (G. A. Jacoby & Muñoz-Prince, 2005). Esta enzima fue detectada en las cepas ECO-97, ECO-109 y ECO-112, por lo que en estos tres aislamientos se tiene la certeza de que el fenotipo BLEE mostrado no se debe a enzimas del tipo TEM.

La enzima SHV-11 detectada en las tres cepas secuenciadas (ECO-57, ECO-109 y ECO-112) fue descrita en 1997 y se diferencia de la enzima SHV-1 (la primera enzima de este grupo descrita) solamente por el cambio de una leucina por una glutamina en la posición 35 (ver anexo 5, figura 13). Este cambio es distante del sitio activo de la enzima, por lo que el espectro de hidrólisis de SHV-11 es igual a SHV-1 (Nüesch-Inderbinen, Kayser, & Hächler, 1997). Por tanto, la presencia de esta enzima, al igual que la presencia de TEM-1, nos indica que el fenotipo BLEE determinado en las cepas es causado por otra enzima.

La enzima CTX-M15 detectada en dos aislamientos de este estudio fue aislada por primera vez en India y es la enzima del tipo CTX-M más diseminada a nivel mundial. Forma parte de la denominada “pandemia CTX-M” asociada a infecciones

del tracto urinario (ITU) y bacteremias adquiridas en la comunidad y representa uno de los mejores ejemplos de la rápida propagación por transferencia horizontal de genes de resistencia en las bacterias (Coque et al., 2008; Hijazi, Fawzi, Ali, & Abd El Galil, 2016; Moubareck et al., 2005). El gen *bla*<sub>CTX-M15</sub> se ha encontrado en elementos móviles altamente eficaces como los plásmidos IncFI, IncFII, IncHI2, IncI, IncN, IncP-1-a, IncL/M e IncA/C; y las secuencias *ISEcp1* e *ISCR1* (Brigante et al., 2005; Peirano & Pitout, 2010). Recientes estudios de vigilancia informan altos porcentajes de aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M15 en Europa, Asia y América del Sur (Hijazi et al., 2016; Lau et al., 2008; Shi et al., 2015).

Diferentes estudios de epidemiología molecular con la técnica de MLST (multilocus sequencing typing) sugirieron que la rápida propagación de *Escherichia coli* productora de CTX-M15 a nivel mundial se debe al clon ST131. Este clon altamente virulento contiene además múltiples genes de resistencia como *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aaa(6')-Ib-cr*, *tetA* y *aaa(3)-II*, contenidos en integrones de clase 1 o asociados al plásmido IncFII (Machado et al., 2006; Peirano, Costello, & Pitout, 2010; Shi et al., 2015). Esto podría explicar la alta frecuencia de cepas co-productoras de enzimas del tipo TEM-1 y CTX-M-15 (54 %) obtenidas en este estudio. Sin embargo, no pudo determinarse la clonalidad de las cepas estudiadas.

Las enzimas *aaa(3)-II* y *aaa(6')-Ib-cr* se han asociado a *Escherichia coli* productoras de CTX-M15 (Peirano & Pitout, 2010; Xiao & Hu, 2012). Estas enzimas modifican los aminoglucósidos y los inactivan. En este estudio no fue posible determinar la resistencia a este grupo de antibióticos, debido a que no son evaluados de forma rutinaria en el antibiograma para Gram negativos en el LABOCLIP. La cepa ECO-109 fue resistente a los antibióticos de rutina evaluados, por lo que se enfrentó a dos aminoglucósidos, y mostró resistencia frente a gentamicina y susceptibilidad a amikacina. En esta cepa particular, puede analizarse la presencia de estos dos genes de resistencia para confirmar el fenotipo mostrado.

La enzima *aaa(6')-Ib-cr* tiene también la capacidad de acetilar, y con ello inactivar, fluoroquinolonas que presentan el nitrógeno amino libre en el anillo de piperazina (norfloxacin y ciprofloxacina) (Park, Robicsek, Jacoby, Sahm, & Hooper, 2006; Peirano & Pitout, 2010). La presencia combinada de esta enzima con *bla<sub>CTX-M15</sub>* explicaría la elevada resistencia a fluoroquinolonas (ciprofloxacina) que mostraron las cepas analizadas (78.5 %), sin olvidar que la resistencia a fluoroquinolonas puede deberse también a mutaciones en otros genes como *gyrA*, *parC* (cromosómicos), *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (plasmídicos). (Hernández, 2010; G. a Jacoby et al., 2006; Peirano et al., 2010; Peirano & Pitout, 2010). La elevada tasa de resistencia a fluoroquinolonas en cepas productoras de BLEE encontrada, concuerda con prevalencias reportadas en otros estudios como el de Rodríguez y colaboradores que encontraron 77 % de resistencia a fluoroquinolonas en cepas productoras de BLEE (Coque et al., 2008; García-gómez et al., 2015; Rodríguez-Baño et al., 2004; Rodríguez-Villalobos et al., 2011).

La enzima CTX-M55 pertenece al subgrupo CTX-M1 al igual que la enzima CTX-M15, de la cual se diferencia simplemente por tener una valina en vez de alanina en la posición 77, por lo que se cree que se ha derivado de esta enzima. Fue descrita por primera vez en Tailandia y estudios estructurales han mostrado que al igual que CTX-M15 se asocia a la presencia de *ISEcp1* (Kiratisin et al., 2007). En China, esta es la segunda enzima del tipo CTX-M más frecuente y ha sido aislada en humanos y animales (Kim et al., 2017). La cepa ECO-96 que mostró la presencia de esta enzima fue resistente a fosfomicina, un dato muy llamativo, sobre todo porque algunos estudios han descrito la producción conjunta de la enzima CTX-M55 y el gen *fosA3* en aislamientos de *Escherichia coli* en Brasil y Francia (Cunha, Lincopan, Cerdeira, & Esposito, 2017; Fernandes, Sellera, Moura, Souza, & Lincopan, 2018; Lupo, Saras, Madec, & Haenni, 2018).

La nitrofurantoína y la fosfomicina fueron los antibióticos que presentaron menor tasa de resistencia (7.6 y 2.5 % respectivamente). Esta tasa es elevada en

comparación con la tasa de 0.3% de cepas resistentes a fosfomicina y 1.5 % a nitrofurantoína reportada previamente en aislamientos comunitarios (Dash, Al-zarouni, Al-kous, & Shehhi, 2008; Zhanel et al., 2006).

El elevado número de organismos multirresistentes en pacientes de la comunidad es una amenaza emergente para la salud pública en el país. Ya que la resistencia mostrada a fluoroquinolonas, trimetoprim sulfametoxazole y amoxicilina/ácido clavulánico en cepas productoras de BLEE limita la terapia al uso de carbapenemes, nitrofurantoína y fosfomicina como la primera opción para el tratamiento de infecciones del tracto urinario que se originan en la comunidad. Ello es alarmante, ya que en ámbitos hospitalarios se han reportado altas frecuencias de cepas resistentes a carbapenemes (Velásquez Porta, 2016).

La diseminación de cepas productoras de BLEE, asociadas a plásmidos portadores de genes de resistencia a múltiples antibióticos en la comunidad se debe a los reservorios como individuos hospitalizados colonizados o infectados con estas cepas y los productos sanitarios que se utilizan para la atención de esos pacientes. Así mismo, afecta a animales criados para el consumo humano y personas que viajan a áreas de alto riesgo (Moubareck et al., 2005; Peirano & Pitout, 2010) y es de suma importancia caracterizar a los portadores de BLEE que puedan diseminar estas bacterias en la comunidad.

Dentro de las principales limitaciones de este estudio, se encuentra la falta de presupuesto para secuenciar todos los productos de PCR obtenidos y con ello, determinar el tipo de enzima específico presente en cada uno de los aislamientos.

No se pudo determinar la clonalidad de los aislamientos y los plásmidos portadores de genes de resistencia. Sin embargo, los resultados obtenidos son valiosos para el país debido a que representan los primeros datos de caracterización molecular de cepas productoras de BLEE en infecciones del tracto urinario

comunitarias causadas por *Escherichia coli*. Además demuestran la importancia que tiene la caracterización para determinar la elección de terapias de primera línea en estas infecciones y las medidas de control que deben considerarse para evitar la propagación de ésta cepas.

## VIII. CONCLUSIONES

1. El 89.8 % de los aislamientos de *Escherichia coli* productores de BLEE presentó al menos uno de los genes analizados, con un alto porcentaje de co-producción de  $\beta$ -lactamasas, sobre todo del tipo TEM y SHV.
2. El gen *bla*<sub>CTX-M</sub> se encontró en el 57 % de los aislamientos analizados, y se estableció que es el responsable del fenotipo BLEE independientemente de la presencia de las enzimas del tipo TEM y SHV que también fueron detectadas.
3. La identificación de las enzimas TEM-1, SHV-11, CTX-M15 y CTX-M55, realizada por secuenciación, corresponde a la primera caracterización molecular de BLEE reportada en el país, lo cual tiene un impacto en cuanto a la epidemiología de los aislamientos comunitarios.
4. En 10.1 % de los aislamientos no se detectó la presencia de los genes analizados, por lo que debe evaluarse la presencia de otros tipos de enzimas como GES, BES, TLA, SFO e IBC.
5. Los aislamientos de *Escherichia coli* productores de BLEE analizados mostraron porcentajes altos de resistencia a ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol (ambos 78 %), y una baja tasa de resistencia para fosfomicina (2.53 %) y nitrofurantoina (7.59 %).
6. El 11.39% de las cepas estudiadas presentó resistencia a un solo antibiótico no betalactámico, y la resistencia combinada de ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol fue el perfil más común.

## IX. RECOMENDACIONES

1. Identificar los tipos específicos de enzimas de las clases TEM y SHV para determinar si el fenotipo BLEE es debido a enzimas de estos dos grupos o su presencia se debe a la co-producción de enzimas del tipo BLEA.
2. Caracterizar los plásmidos portadores de genes de  $\beta$ -lactamasas para determinar la presencia conjunta de genes de resistencia a otros antibióticos como *aaa(3)-II*, *aaa(6')-Ib-cr*, *gyrA*, *parC*, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*.
3. Realizar un análisis clonal de las cepas productoras de BLEE del tipo CTX-M15 y CTX-M55 asociadas a clones específicos de *Escherichia coli* mediante la técnica MLST para determinar el origen de las mismas en el país.
4. Incluir al menos un antibiótico aminoglucósido de forma rutinaria en el antibiograma para Gram negativos en el LABOCLIP, para determinar la tasa de resistencia a este grupo de antibióticos en cepas productoras de BLEE.
5. Implementar vigilancia especial para la resistencia a nitrofurantoina, fosfomicina y carbapenemes en aislamientos comunitarios, ya que la elevada frecuencia de cepas productoras de BLEE multirresistentes limita la terapia al uso de estos antibióticos para los que ya se ha reportado resistencia.

## X. REFERENCIAS

- Alvarado, J., & Mejía, C. (2014). Resistencia Bacteriana en Infecciones del Tracto Urinario de Origen Comunitario. *Revista de Medicina Interna de Guatemala*, 20, 24-30.
- Bauernfeind, A., Schweighart, S., & Grimm, H. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *INFECTION*, 18 (No.5), 294–298.
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G. & Rodríguez-Baño, J. (2013). Four main virotypes among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(No.10), 3358–3367.
- Bonnet, R. (2004). MINIREVIEW: Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 48 (No.1), 1–14.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 14(No. 4), 933–951.
- Bradford, P. a, & Bradford, P. a. (2001). E Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 14(No.4), 933–951.
- Brigante, G., Luzzaro, F., Perilli, M., Lombardi, G., Coli, A., Rossolini, G. M. & Toniolo, A. (2005). Evolution of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(No.2), 157–162.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). MINIREVIEW: Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 54(No.3), 969–976.

- Cavaliere, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Soutter, R. & Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. USA: University of Washington.
- Clinical & Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2015). *M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Vol. 35 No. 3. USA.
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., & Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14(No.2), 195–200.
- Cunha, M. P. V., Lincopan, N., Cerdeira, L., & Esposito, F. (2017). Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli from Poultry in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy Downloaded*, 61(No.4), 1–3.
- Dash, N., Al-zarouni, M., Al-kous, N., & Shehhi, F. A. (2008). Distribution and Resistance Trends of Community Associated Urinary Tract Pathogens in Sharjah , UAE. *Microbiology Insights*, 3, 41–45.
- Doi, Y., Park, Y. S., Rivera, J. I., Adams-haduch, J. M., Hingwe, A., Sordillo, E. M., ... Paterson, D. L. (2013). Community-Associated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Escherichia coli Infection in the United States. *CID*, 56(No.3), 641–648.
- Dougherty, T. J., & Pucci, M. J. (2014). Beta-Lactams Antibiotics. Chapter 3. *Antibiotic Discovery and Development*. 117.
- Du, J., Zhang, Q., Tang, Q., Li, H., Tao, X., Morimoto, K. & Liang, G. (2008). Characterization of human rabies virus vaccine strain in China. *Virus Research*, 135(No.2), 260–266.
- Fan, N. C., Chen, H. H., Chen, C. L., Ou, L. S., Lin, T. Y., Tsai, M. H., & Chiu, C. H. (2014). Rise of community-onset urinary tract infection caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47(No.5), 399–405.

- Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Moura, Q., Souza, T. A., & Lincopan, N. (2018). Draft genome sequence of a CTX-M-8, CTX-M-55 and FosA3 co-producing *Escherichia coli* ST117/B2 isolated from an asymptomatic carrier. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *12*, 183–184.
- Frère, J. M., Galleni, M., Bush, C., & Dideberg, O. (2005). Is it necessary to change the classification of  $\beta$ -lactamases? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(No.6), 1051–1053.
- García-gómez, M., Guío, L., Hernández, J. L., Vilar, B., & Pijoán, J. I. (2015). Original Bacteriemias por enterobacterias productoras de beta-lactamasas (BLEE , AmpC y carbapenemasas): asociación con los cuidados sanitarios y los pacientes oncológicos. *Rev Esp Quimioter*, *28*(No.5), 256–262.
- Geser, N., Stephan, R., & Hächler, H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research*, *8*(No.1), 21.
- Gordillo, M. R., Mejia, C. R., & Matheu, J. (2014). Presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, BLEE, y enterobacterias portadoras de carbapenemasas KPC, en enterobacterias en el Hospital Roosevelt, 2011 Y 2012. *Revista de Medicina Interna de Guatemala*, *17*(No.9), 8–22.
- Gupta, V. (2007). An update on newer  $\beta$ -lactamases. *Indian J Med Res*, *126*(No.11), 417–427.
- Hernández, E. (2010). *Escherichia coli* productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Hijazi, S. M., Fawzi, M. A., Ali, F. M., & Abd El Galil, K. H. (2016). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae in healthy children and associated risk factors. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *15*(No.1), 1–9.
- Jacoby, G. A., & Munoz-Prince, L. S. (2005). Mechanisms of Disease: The new  $\beta$ -Lactamases. *N. Engl. J. Med.*, *352*(No.4), 380–391.

- Jacoby, G. a, Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, J., Oh, H., Robicsek, A. & Walker, V. J. (2006). qnrB , Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance These include : qnrB , Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(No.4), 1178–1182.
- Jeong, S. H., Bae, I. K., Lee, J. H., Sohn, S. G., Kang, G. H., Jeon, G. J. & Lee, S. H. (2004). Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide Survey. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 42(No.7), 2902–2906.
- Khanfar, H. S., Bindayna, K. M., Senok, A. C., & Botta, G. a. (2009). Original Article Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* : trends in the hospital and community settings. *Journal Of Infection In Developing Countries*, 3(No.4), 2–6.
- Kim, J. S., Kim, S., Park, J., Shin, E., Yun, Y. S., Lee, D. Yong & Kim, J. (2017). Plasmid-mediated transfer of CTX-M-55 extended-spectrum beta-lactamase among different strains of *Salmonella* and *Shigella* spp. in the Republic of Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(No.1), 86–88.
- Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C., & Saifon, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(No.8), 2818–2824.
- Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Saifon, P., Laesripa, C., Kitphati, R., & Mundy, L. M. (2007). The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(No.3), 349–355.

- Lau, S. H., Kaufmann, M. E., Livermore, D. M., Woodford, N., Willshaw, G. A., Cheasty, T. & Upton, M. (2008). UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15  $\beta$ -lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(No.6), 1241–1244.
- Lupo, A., Saras, E., Madec, J. Y., & Haenni, M. (2018). Emergence of blaCTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(No.4), 867–872.
- Luzzaro, F., Mezzatesta, M., Mugnaioli, C., Perilli, M., Stefani, S., Amicosante, G., ... Toniolo, A. (2006). Trends in production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among enterobacteria of medical interest: Report of the second Italian nationwide survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(No.5), 1659–1664.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M15, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the aac(6')-Ib-cr gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(No.9), 3220–3221.
- Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., & Caniça, M. (2007). Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(No.6), 1946–1955.
- Mensa, J., Gatell, J. M., Letang, E., López-Suñé, E. & Marco, F. (2013). *Guía Terapéutica Antimicrobiana*. Barcelona: Editorial Antares.
- Moubareck, C., Daoud, Z., Hakimé, N. I., Hamzé, M., Mangeney, N., Matta, H. & Doucet-Populaire, F. (2005). Countrywide spread of community and hospital acquired extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M15 producing Enterobacteriaceae in Lebanon. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(No.7), 3309–3313.

- Mulvey, M. R., Bryce, E., Boyd, D., Ofner-agostini, M., Christianson, S., Simor, A. E., ... Program, I. S. (2004). Ambler Class A Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing. *Society*, 48(No.4), 1204–1214.
- Najera, M. (2005). *Determinación de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA) y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en Enterobacterias provenientes de la unidad periférica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de la zona 11.* (Tesis de Licenciatura en Química Biológica). Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala.
- Nüesch-Inderbinnen, M. T., Kayser, F. H., & Hächler, H. (1997). Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(No.5), 943–949.
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(No.11), 3953–3955.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Society*, 18(No.4), 657–686.
- Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., & Bonomo, R. (2003). Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(No.11), 3554–3560.
- Peirano, G., Costello, M., & Pitout, J. D. D. (2010). Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: High prevalence of ST131 producing CTX-M15 in community hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(No.1), 19–23.
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M  $\beta$ -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(No.4), 316–321.

- Pensamiento, L. (2006). *Determinación de los mecanismos de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de Escherichia coli y Klebsiella sp realizados en el Laboratorio Nacional De Salud durante el periodo 2002 – mayo 2004*. (Tesis de Licenciatura en Química Biológica). Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala.
- Pitout, J. D. D. (2009). Recent changes in the epidemiology and management of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae. *F1000 Medicine Reports*, 4(No.11), 16–19.
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., & Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5, 52–59.
- Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad [EDC]. (2018). Laboratorio Clínico Popular (LABOCLIP) – Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad. Recuperado el 27 de agosto de 2018 de [http://c3.usac.edu.gt/edc.usac.edu.gt/public\\_html/?page\\_id=250](http://c3.usac.edu.gt/edc.usac.edu.gt/public_html/?page_id=250)
- Rodríguez-Baño, J., Navarro, M. D., Martínez-martínez, L., Muniain, M. a, Perea, J., Pérez-cano, R. & Perea, E. J. (2004). Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Nonhospitalized Patients Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli, 42(No.3), 1089–1094.
- Rodriguez-Villalobos, H., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Deplano, a., Montesinos, I. & Glupczynski, Y. (2011). Trends in production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: Results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(No.1), 37–47.
- Ruppé, É., Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram - negative bacilli. *Annals of Intensive Care*, 5(No.21), 1–15.

- Sanguinetti, M., Posteraro, B., Spanu, T., Ciccaglione, D., Romano, L., Fiori, B., ... Fadda, G. (2003). Characterization of clinical isolates of Enterobacteriaceae from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection method. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(No.4), 1463–1468.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., & Rizvi, S. M. D. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(No.1), 90–101.
- Shi, H., Sun, F., Chen, J., Ou, Q., Feng, W., Yong, X., & Xia, P. (2015). Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial -Escherichia coli infection in China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(No.1), 1–5.
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(No.2), 116–129.
- Tankhiwale, S. S., Jalgaonkar, S. V., Ahamad, S., & Hassani, U. (2004). Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. *Indian Journal of Medical Research*, 120(No.6), 553–556.
- Tumbarello, M., Spanu, T., Sanguinetti, M., Citton, R., Montuori, E., Leone, F., ... Cauda, R. (2006). Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-Betalactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors , Molecular Epidemiology, and Clinical Outcome. *American Society for Microbiology*, 50(No.2), 498–504.
- Velásquez Porta, T. (2016). *Detección de los genes de carbapenemasas blaKPC y blaNDM en aislamientos de Klebsiella pneumoniae del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala*. (Tesis de Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas). Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala.
- Villegas, M. V, Kattan, J. N., Quinteros, M. G., & Casellas, J. M. (2008). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(No.1), 154–158.

- Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J. M., & Legakis, N. (2001). Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32, 94–103.
- Xiao, Y., & Hu, Y. (2012). The Major Aminoglycoside-Modifying Enzyme AAC(3)-II Found in *Escherichia coli* Determines a Significant Disparity in Its Resistance to Gentamicin and Amikacin in China. *Microbial Drug Resistance*, 18(No.1), 42–46.
- Zhanel, G. G., Hisanaga, T. L., Laing, N. M., DeCorby, M. R., Nichol, K. A., Weshnoweski, B. & Hoban, D. J. (2006). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(No.6), 468–475.

## XI. ANEXOS

### Anexo 1:

**Tabla 6.** Datos generales de los aislamientos analizados en este estudio.

No	CODIGO	<i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaCTX-M</i>	FOS	NIT	CIP	AM/AC	SXT	SEXO	EDAD (años)	ITU REC
1	ECO-02	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	R	M	4	SI
2	ECO-03	Positivo	Positivo	Positivo	S	R	S	S	R	F	76	SI
3	ECO-06	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	M	35	NO
4	ECO-07	Positivo	Positivo	Negativo	R	S	S	R	R	F	7	NO
5	ECO-08	Positivo	Positivo	Positivo	S	R	R	R	R	M	95	NO
6	ECO-09	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	43	NO
7	ECO-11	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	43	NO
8	ECO-13	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	S	M	70	NO
9	ECO-14	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	S	S	R	M	26 DIAS	NO
10	ECO-15	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	S	S	R	F	50	NO
11	ECO-16	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	60	NO
12	ECO-17	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	61	NO
13	ECO-18	Positivo	Positivo	Positivo	S	I	R	S	S	F	79	SI
14	ECO-19	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	S	S	R	F	4 MESES	NO
15	ECO-20	Positivo	Negativo	Negativo	S	S	S	R	S	F	2	NO
16	ECO-21	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	R	R	F	19	SI
17	ECO-23	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	S	R	R	F	71	NO
18	ECO-24	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	S	S	R	F	51	NO
19	ECO-25	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	S	F	55	NO
20	ECO-27	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	R	F	66	NO
21	ECO-28	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	27	NO
22	ECO-29	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	R	R	F	71	SI
23	ECO-31	Positivo	Positivo	Positivo	S	R	S	S	R	F	14	NO
24	ECO-32	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	67	NO
25	ECO-34	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	R	R	F	30	SI
26	ECO-35	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	R	R	F	16	NO
27	ECO-36	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	4 MESES	NO
28	ECO-38	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	I	F	59	NO
29	ECO-39	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	S	S	I	F	61	SI
30	ECO-40	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	S	F	61	NO
31	ECO-44	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	S	S	I	M	82	SI

FOS: Fosfomicina, NIT: Nitrofurantoina, CIP: Ciprofloxacina, AM/AC: Amoxicilina/Ácido clavulánico, SXT: Trimetoprim sulfametoxazol, ITU REC: infección del trato urinario recurrente, R: resistente, I: intermedia, S: susceptible, M: masculino, F: femenino, NE: no evaluado.

Continuación Tabla 6

No	CODIGO	<i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaCTX-M</i>	FOS	NIT	CIP	AM/AC	SXT	SEXO	EDAD (años)	ITU REC
32	ECO-45	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	R	F	57	NO
33	ECO-47	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	61	NO
34	ECO-49	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	S	R	I	F	81	SI
35	ECO-50	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	26	SI
36	ECO-51	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	R	R	M	1	NO
37	ECO-53	Negativo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	60	NO
38	ECO-57	Negativo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	M	4	SI
39	ECO-59	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	58	NO
40	ECO-61	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	S	I	R	F	81	SI
41	ECO-62	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	R	F	76	NO
42	ECO-63	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	S	M	70	NO
43	ECO-70	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	R	F	59	NO
44	ECO-71	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	R	S	S	F	1	NO
45	ECO-72	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	R	S	S	M	67	NO
46	ECO-74	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	S	F	63	NO
47	ECO-75	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	R	S	R	F	61	NO
48	ECO-76	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	S	R	R	F	5	NO
49	ECO-78	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	58	NO
50	ECO-79	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	R	S	R	F	65	NO
51	ECO-80	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	R	R	F	8	SI
52	ECO-81	Positivo	Positivo	Positivo	NE	S	R	I	S	F	73	NO
53	ECO-83	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	R	S	F	44	NO
54	ECO-84	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	R	R	R	F	77	SI
55	ECO-86	Negativo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	S	F	65	SI
56	ECO-87	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	I	I	R	F	2	NO
57	ECO-88	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	81	NO
58	ECO-89	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	R	I	S	F	57	NO
59	ECO-90	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	M	44	SI
60	ECO-91	Positivo	Negativo	Negativo	S	S	R	S	S	F	64	SI
61	ECO-92	Negativo	Negativo	Negativo	S	S	R	I	R	F	55	SI
62	ECO-93	Positivo	Negativo	Positivo	S	S	R	S	R	F	32	NO
63	ECO-94	Negativo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	R	F	8	SI
64	ECO-95	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	S	F	66	NO
65	ECO-96	Positivo	Positivo	Positivo	R	S	R	S	R	F	55	SI
66	ECO-97	Positivo	Negativo	Negativo	NE	R	S	R	R	F	86	NO

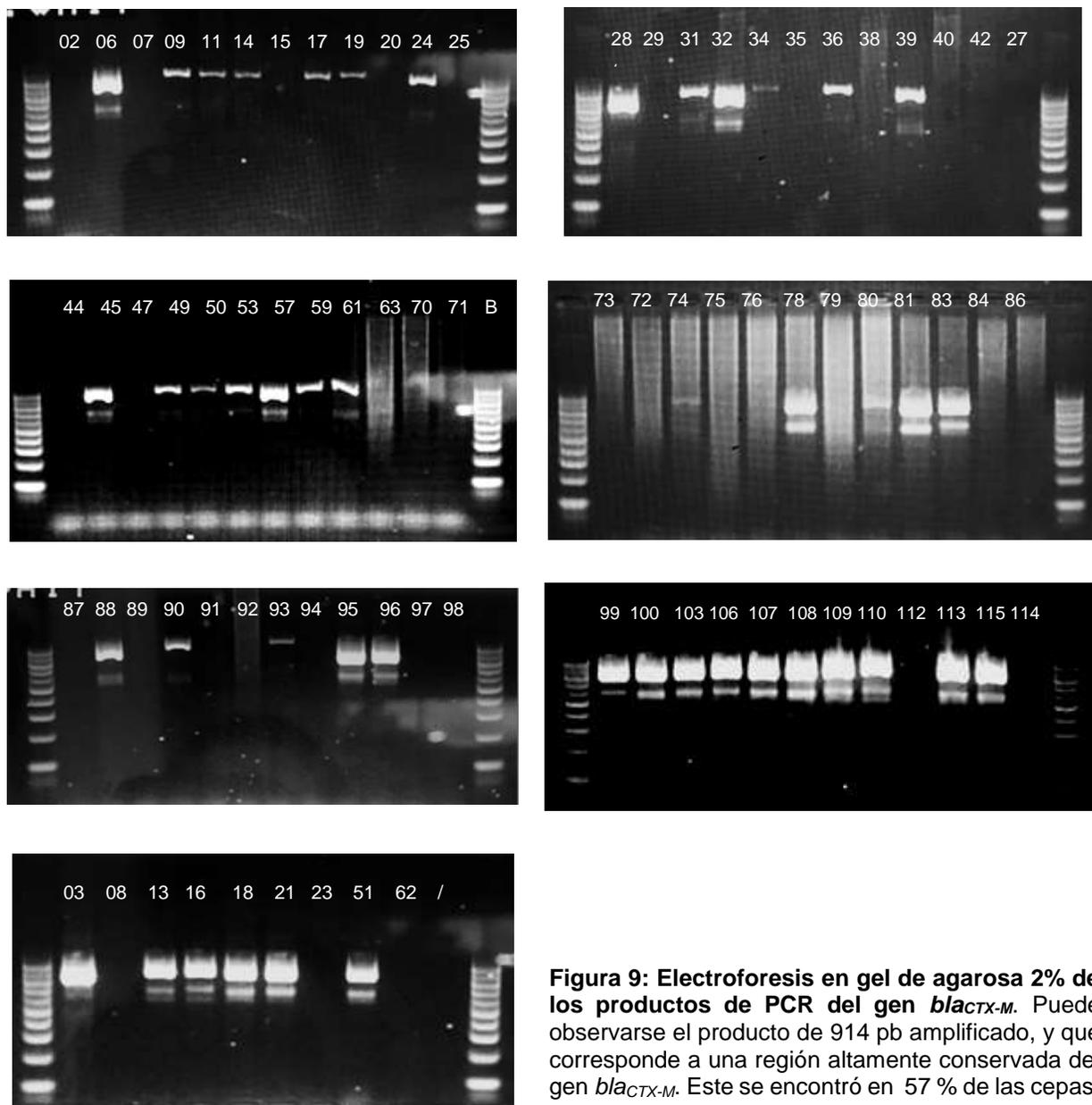
FOS: Fosfomicina, NIT: Nitrofurantoina, CIP: Ciprofloxacina, AM/AC: Amoxicilina/Ácido clavulánico, SXT: Trimetoprim sulfametoxazol, ITU REC: infección del trato urinario recurrente, R: resistente, I: intermedia, S: susceptible, M: masculino, F: femenino, NE: no evaluado.

Continuación Tabla 6

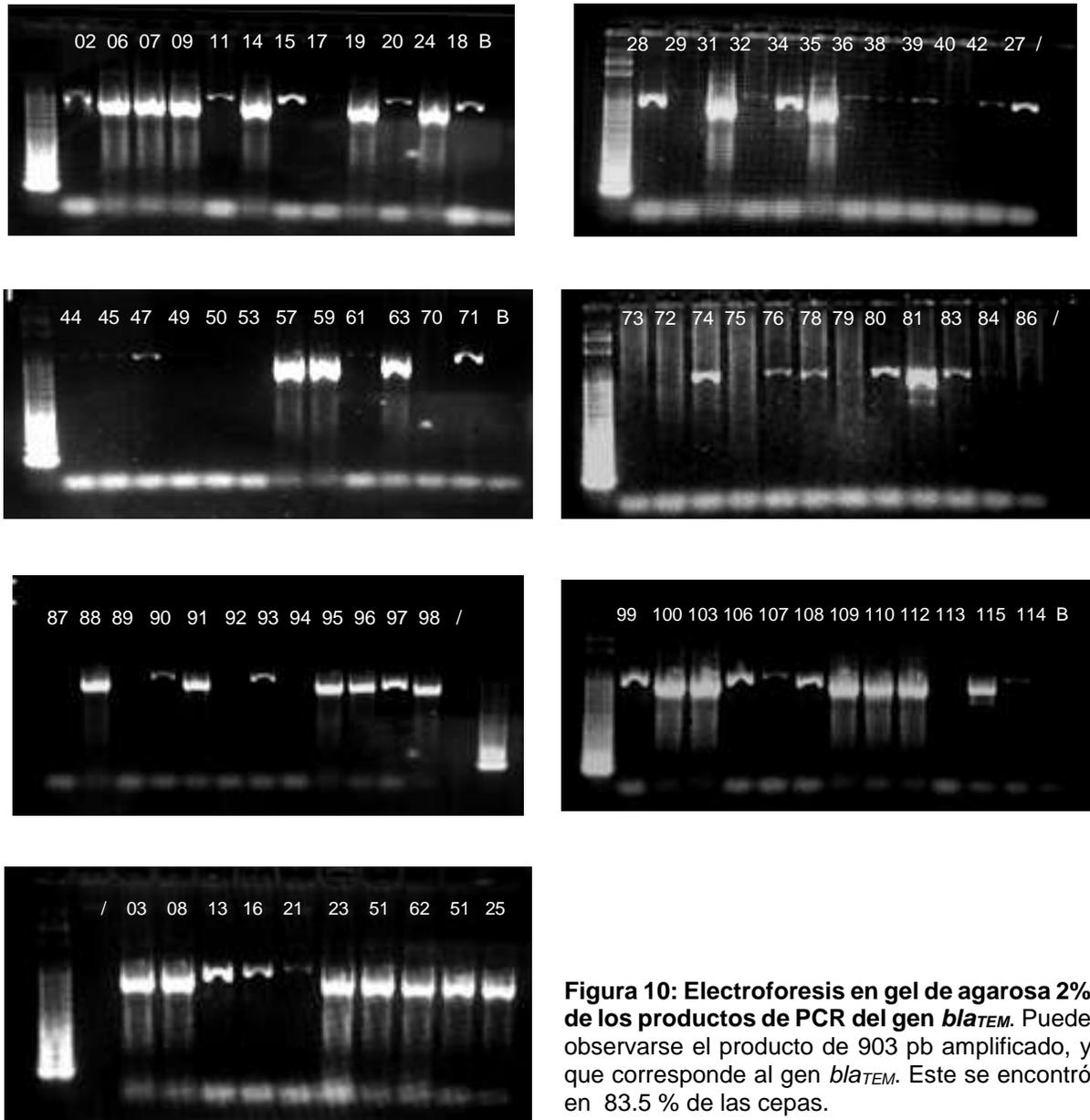
No	CODIGO	<i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaCTX-M</i>	FOS	NIT	CIP	AM/AC	SXT	SEXO	EDAD (años)	ITU REC
67	ECO-98	Positivo	Positivo	Negativo	NE	S	R	R	R	F	3	SI
68	ECO-99	Positivo	Positivo	Positivo	NE	S	S	S	R	F	71	NO
69	ECO-100	Positivo	Positivo	Positivo	NE	S	R	S	R	M	68	SI
70	ECO-103	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	55	NO
71	ECO-106	Positivo	Positivo	Positivo	NE	S	R	S	R	F	17	NO
72	ECO-107	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	I	R	F	7 MESES	NO
73	ECO-108	Positivo	Positivo	Positivo	S	S	R	S	R	F	53	SI
74	ECO-109	Positivo	Positivo	Positivo	NE	R	R	R	R	F	56	SI
75	ECO-110	Positivo	Positivo	Positivo	NE	S	S	S	S	F	29	NO
76	ECO-112	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	R	F	69	NO
77	ECO-113	Negativo	Positivo	Negativo	S	S	R	I	R	F	28	NO
78	ECO-114	Positivo	Positivo	Negativo	S	S	R	S	S	F	62	NO
79	ECO-115	Positivo	Positivo	Positivo	NE	S	R	S	R	M	64	SI

FOS: Fosfomicina, NIT: Nitrofurantoina, CIP: Ciprofloxacina, AM/AC: Amoxicilina/Ácido clavulánico, SXT: Trimetoprim sulfametoxazol, ITU REC: infección del trato urinario recurrente, R: resistente, I: intermedia, S: susceptible, M: masculino, F: femenino, NE: no evaluado.

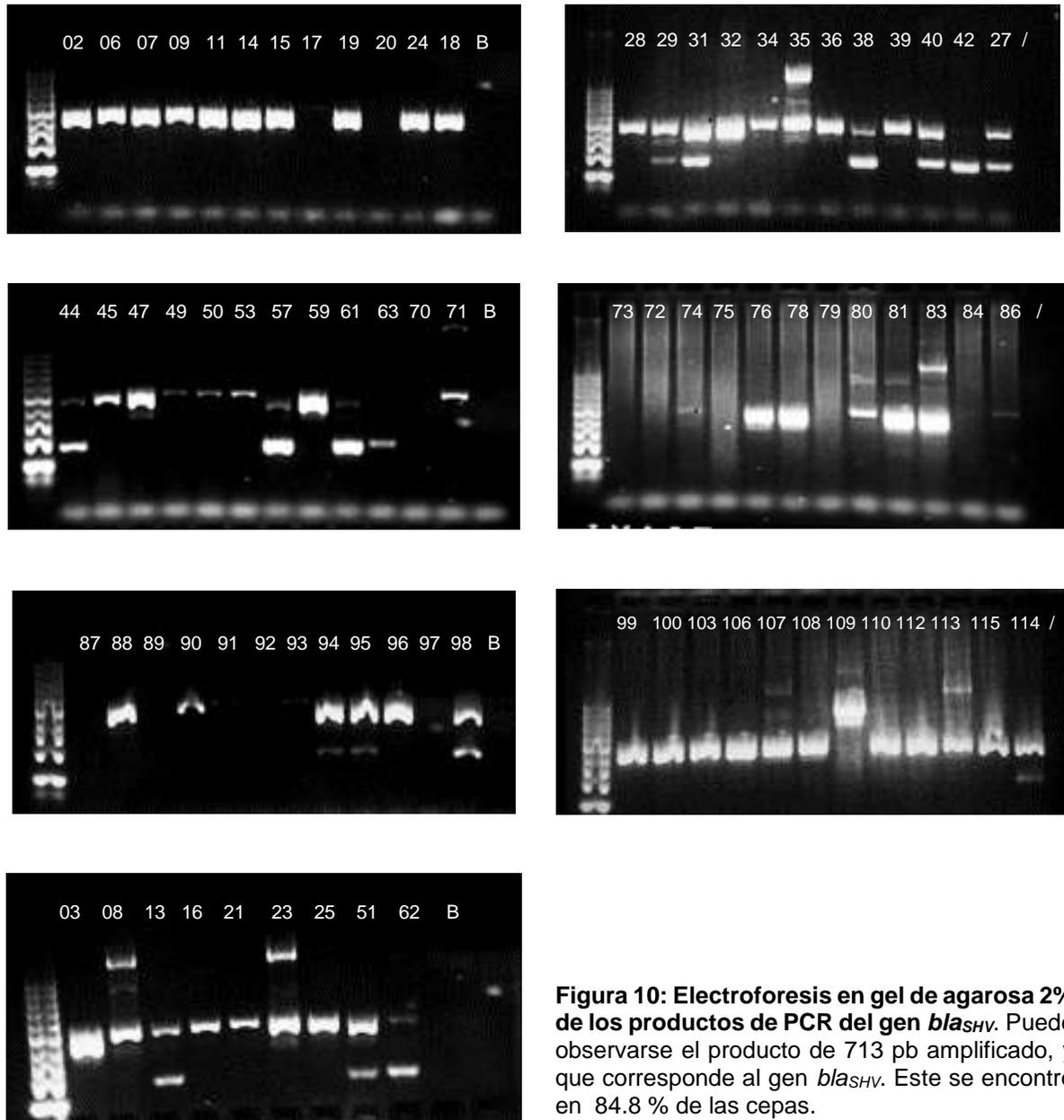
## Anexo 2:



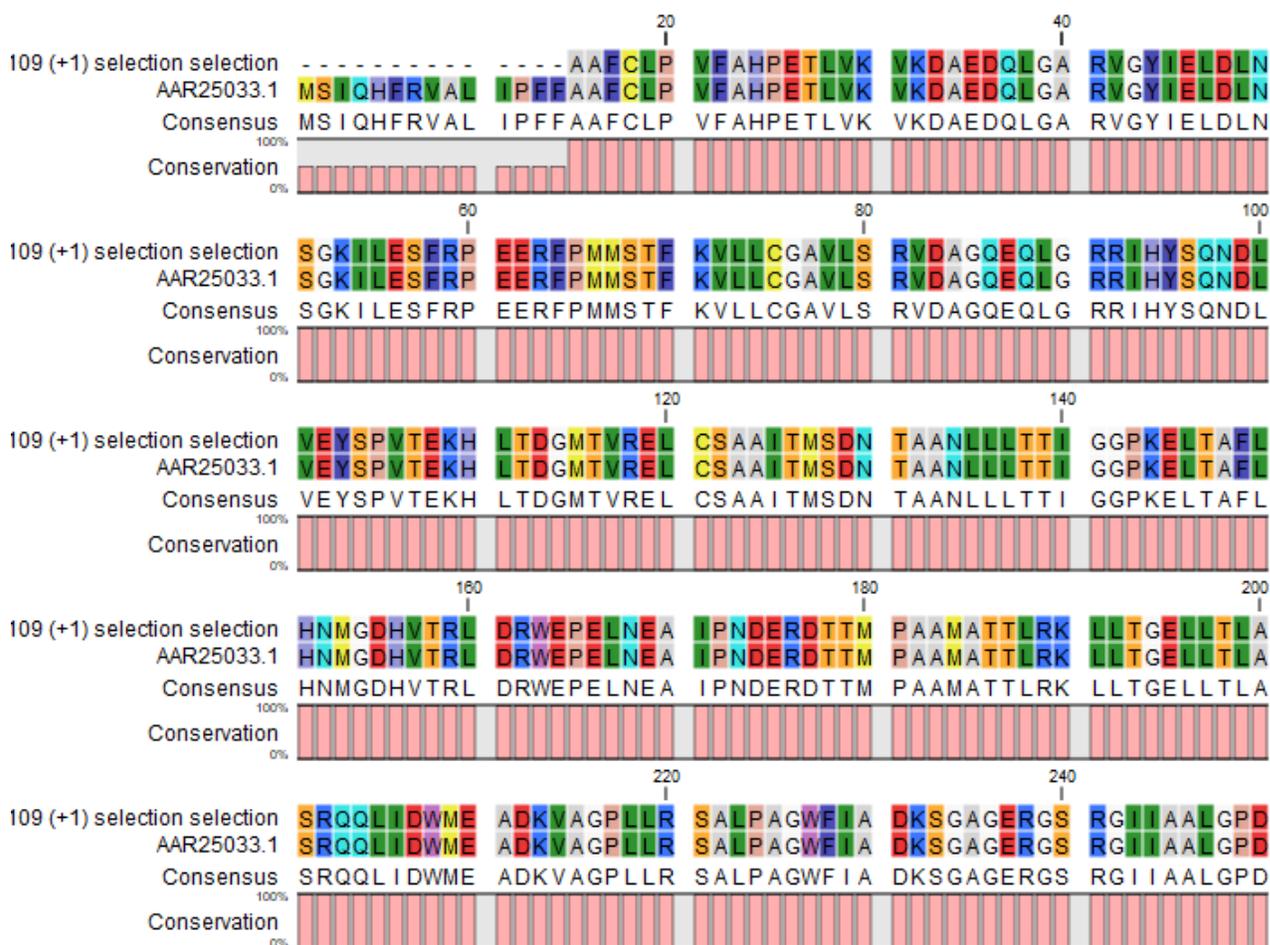
## Anexo 3:



## Anexo 4:

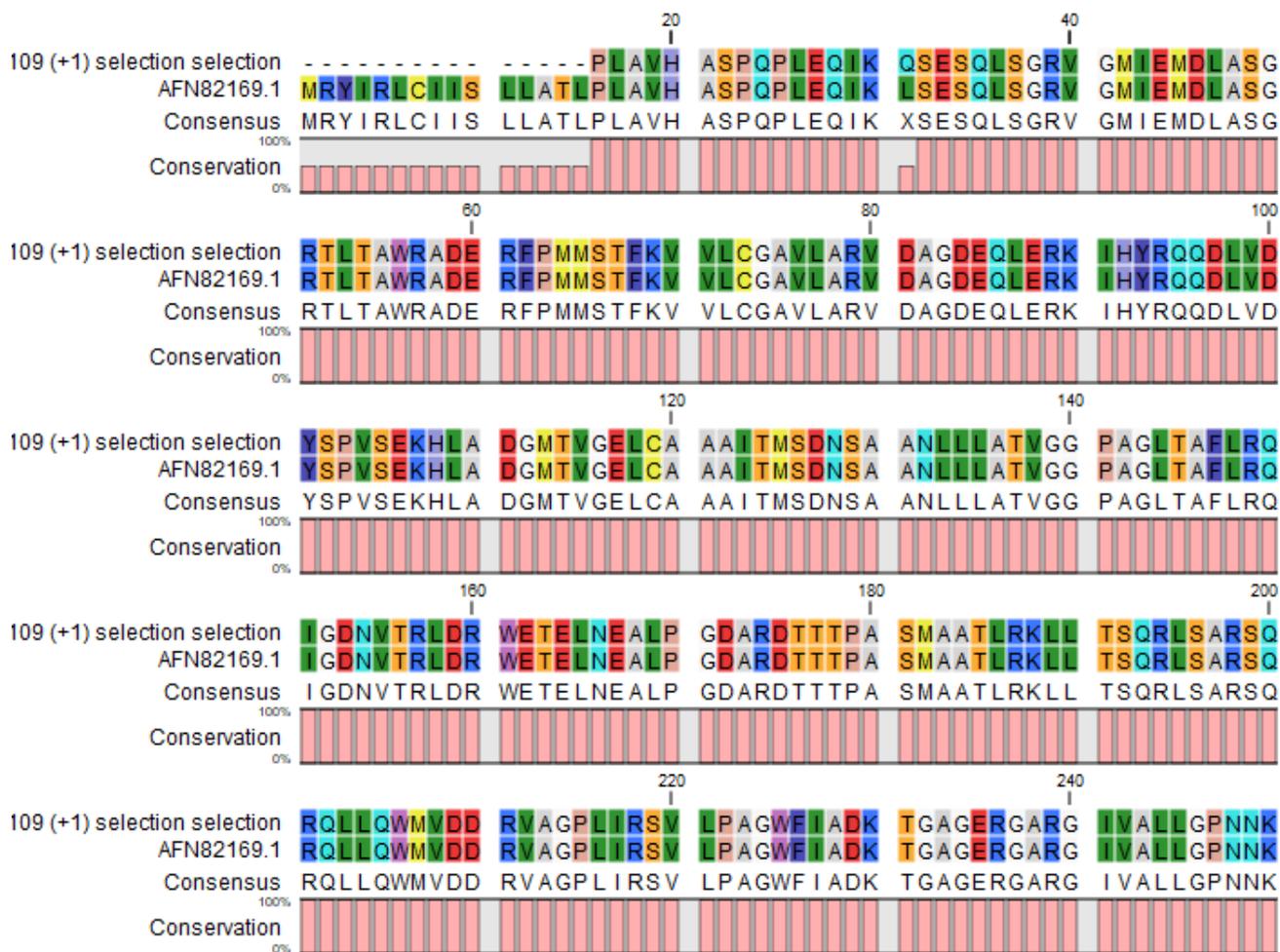


## Anexo 5: Alineamiento de proteínas con sus respectivas secuencias consenso

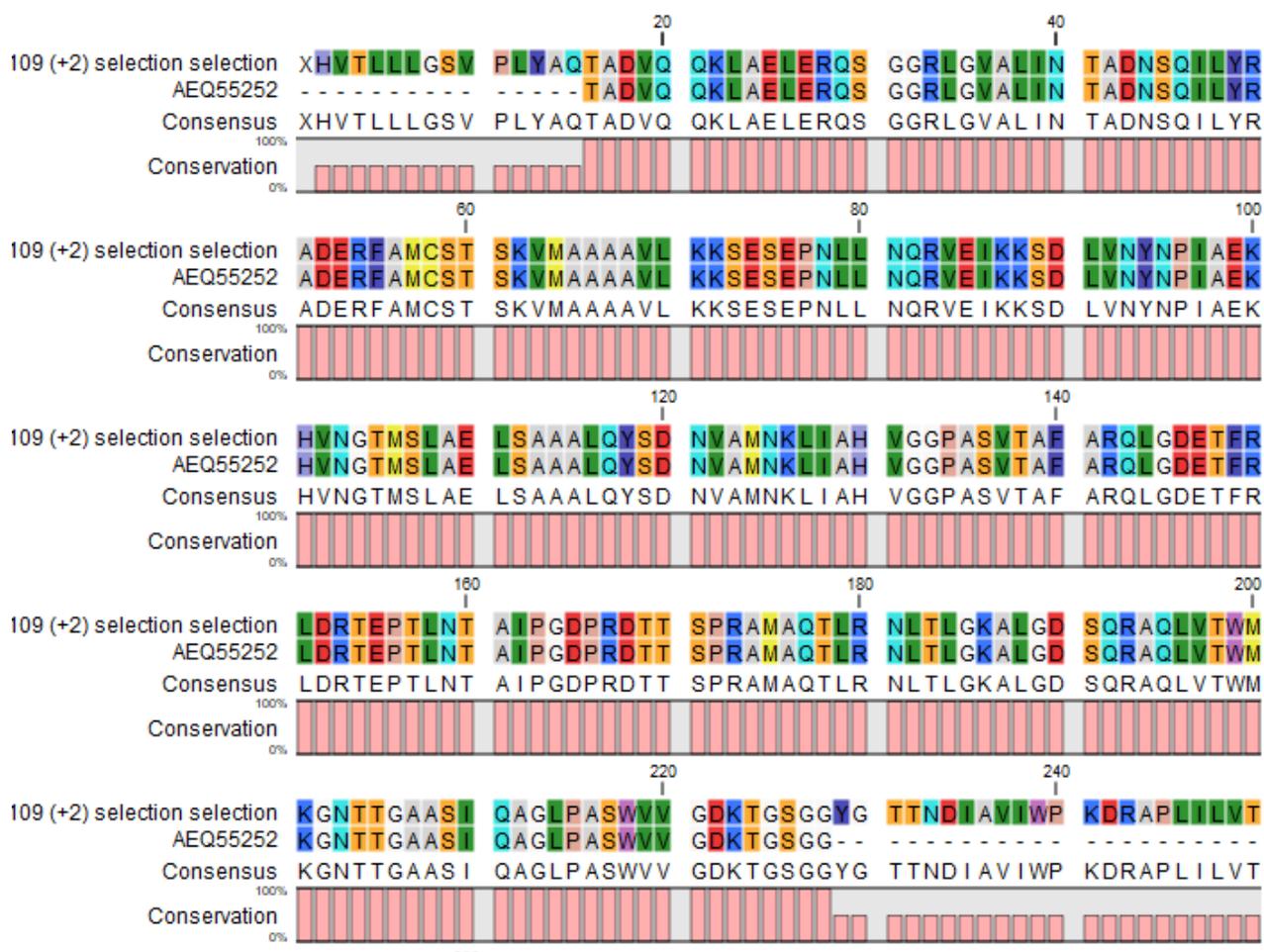


**Figura 12: Alineamiento de proteína TEM-1 (consenso AAR25033.1) con la enzima tipo TEM detectada en la muestra ECO-109.** En la figura puede observarse una concordancia total entre la secuencia obtenida para la enzima TEM amplificada de la cepa ECO-109 y la secuencia de referencia de la enzima TEM-1 de la base de datos Nucleotide de NCBI.

Software: CLC sequence viewer 8.0 Qiagen®



**Figura 13: Alineamiento de SHV-11 (consenso AFN82169.1) con la enzima tipo SHV detectada en la muestra ECO-109.** En la figura puede observarse el cambio de una Leucina presente en la secuencia de referencia de la enzima SHV-1 de la base de datos Nucleotide de NCBI, por una Glutamina en la secuencia obtenida para la cepa ECO-109. Este cambio en la posición 35 produce la enzima SHV-11.



**Figura 14: Alineamiento de CTX-M15 (consenso AEQ55252) con la enzima tipo CTX-M detectada en la muestra ECO-109.** En la figura puede observarse una concordancia total entre la secuencia obtenida para la enzima CTX-M15 amplificada de la cepa ECO-109 y la secuencia de referencia de la enzima CTX-M15 de la base de datos Nucleotide de NCBI.

Software: CLC sequence viewer 8.0 Qiagen®

## Anexo 6: Secuencias FASTA obtenidas para los diferentes genes analizados

### *bla<sub>CTX-M15</sub>*

>180815-10\_M03\_CTXM109\_CTXMF.ab1 901

NNNNNNNNNNNGANNACGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCCG  
 AAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGA  
 CTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATG  
 AGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTGATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAG  
 AAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACC  
 TTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGA  
 GCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGC  
 TCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAA  
 CGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCG  
 CGTGATAACACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGT  
 AAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATAC  
 CACCGGTGCAGCGAGCATTACGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATA  
 AAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAA  
 GATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAA  
 AGCCGTGCGGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAANNCNNTCANGCAGNGNGGNTGTNT  
 NAAAAAANNNGNNNNNGNNNCNNTNGCNCNTNTNNNNNNNTNTNNTNTN

### *bla<sub>CTX-M55</sub>*

>180326-19\_A11\_CTXM\_CTXMF.ab1 914

NNNTNNNNNNNGCACNGTCCGCTGTTGTTGGAAGTGNCCGCNGNATGCGCAAACG  
 GCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCGNNTTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGG  
 NGNGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGANGANGAGCG  
 CTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTGATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAA  
 GTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGT  
 TAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCT  
 TAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCA  
 CGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGT  
 TCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGT  
 GATAACACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAA  
 GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCAC  
 CGGTGCAGCGAGCATTACGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGGATAAA  
 ACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCAACGATATCGCGGGTGTGCTGGCCAAAAG  
 ATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAA  
 GCCGTGCGGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAANNNNCNNNNNNNGNNNTNNNNNTNN  
 NNNNNNNGGAATTTNCCNAAAGGGTTCGAGCTCGGTNTAATTNACNAGCCCANANC  
 NGTGGCTNNN

**bla<sub>TEM-1</sub>**

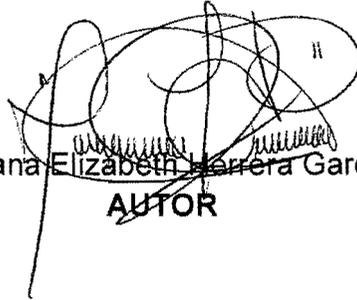
&gt;180815-10\_E01\_TEM109\_TEMF.ab1 903

NNNNNNNNNTNNNTNNNGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCT  
GGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACT  
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATG  
ATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGC  
AAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACC  
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGC  
CATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACC  
GAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGT  
TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC  
TGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT  
TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG  
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT  
GGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTA  
GTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT  
GAGATAGGTGCCTCACTGNNNNNNNNNTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCCTTNNGNCCC  
AAAGANNNGTNCNGNNTCNNAACAACNTANCTATTATNTTNTT

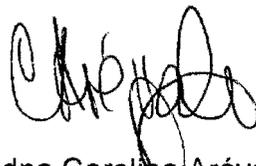
**bla<sub>SHV-11</sub>**

&gt;180815-10\_A03\_SHV109\_SHVF.ab1 823

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCA  
AATTAACAAAGCGAAAGCCAGCTGTCCGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCT  
GGCCAGCGGCCCGCACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGA  
GCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGAC  
GAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCC  
GGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCCGCGAACTCTGCGCCGCCG  
CCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGC  
CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTTGAC  
CGCTGGGAAACGGAACCTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGATGCCCGCGACACCACTAC  
CCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGC  
GCCCGTTGCAACGGCAGCTGCTGCAAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGAC  
CGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCT  
GGCGAACGGGGTGCAGCGCGGGATTGTGCCCTGCTTGGCCCGAATAACAAAGCAGA  
GCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACCCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATC  
AGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGGCTNATCGNNTNNNN



Mariana Elizabeth Herrera García  
**AUTOR**



PhD. Edna Carolina Arévalo Valdéz  
**ASESOR**



~~MSc. Támara Ileana Velásquez Porta~~  
**DIRECTORA**



MA. Pablo Ernesto Oliva Soto  
**DECANO**