

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD**

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**EPIDEMIOLOGÍA Y PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS INFECCIONES POR
E. COLI Y *K. PNEUMONIAE* EN PACIENTES PEDIÁTRICOS**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO
DE SUBESPECIALIDAD EN
INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA**

**PRESENTA
DR. FREDI GIOVANNI SOTO GUZMÁN**

**TUTOR DE TESIS
DR. AGUSTIN RAFAÉL DE COLSA RANERO
DRA. ALEJANDRA AQUINO ANDRADE**

TUTOR METODOLÓGICO

M EN C CHIHARU MURATA

MÉXICO D.F. 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EPIDEMIOLOGÍA Y PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS INFECCIONES POR
E. COLI Y *K. PNEUMONIAE* EN PACIENTES PEDIÁTRICOS



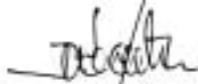
DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DR. NAPOLEÓN GONZÁLEZ SALDAÑA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA



DR. AGUSTÍN RAFAEL DE GOLSA RANERO
TUTOR DE TESIS



DRA ALEJANDRA AQUINO ANDRADE
CO TUTOR DE TESIS



M EN C CHIHARU MURATA
TUTOR METODOLÓGICO

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN | 5 |
| 2. ANTECEDENTES | 6 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 16 |
| 5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 16 |
| 6. HIPÓTESIS | 16 |
| 7. OBJETIVOS | 16 |
| OBJETIVO GENERAL | 16 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 8. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN | 17 |
| 9. MATERIAL Y MÉTODOS | 17 |
| CRITERIOS DE INCLUSIÓN | 17 |
| CRITERIOS DE EXCLUSIÓN | 17 |
| CRITERIOS DE ELIMINACIÓN | 17 |

| | |
|--------------------------------|----|
| UBICACIÓN DEL ESTUDIO | 17 |
| LOGISTICA GENERAL | 17 |
| 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 22 |
| 11. CONSIDERACIONES ÉTICAS | 22 |
| 12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES | 22 |
| 13. RESULTADOS | 22 |
| 14. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 38 |
| 15. DISCUSIÓN | 41 |
| 16. BIBLIOGRAFÍA | 46 |
| 17. ANEXO 1.0 | |
| - HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS | 49 |
| 18. ANEXO 2.0 | |
| - CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Correspondencia de las Clasificaciones de beta-lactamasas | 10 |
| Tabla 2. Valores para la Interpretación de Diámetros de Halos de Inhibición y Correspondencia de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) | 18 |
| Tabla 3. Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana | 19 |
| Tabla 4. Variables del estudio | 21 |
| Tabla 5. Distribución de pacientes con infección por <i>E. coli</i> de acuerdo a sexo | 23 |
| Tabla 6. Distribución de pacientes de acuerdo a grupos de edad con infección por <i>E. coli</i> | 23 |
| Tabla 7. Distribución de pacientes de acuerdo al origen de adquisición de infecciones por <i>E. coli</i> | 24 |
| Tabla 8. Sitios de aislamientos de <i>E. coli</i> | 24 |
| Tabla 9. Servicios en los que fueron documentadas infecciones por <i>E. coli</i> | 26 |
| Tabla 10. Tipo de infecciones ocasionadas por <i>E. coli</i> | 27 |
| Tabla 11. Tipos de enzimas encontradas en <i>E. coli</i> y origen de adquisición | 28 |
| Tabla 12. Tipo de enzima, aislamiento y origen de adquisición de <i>E. coli</i> | 29 |
| Tabla 13. Relación entre enzimas en <i>E. coli</i> y servicios | 30 |
| Tabla 14. . Distribución de pacientes con infección por <i>K. pneumoniae</i> de acuerdo a su sexo | 31 |
| Tabla 15. Distribución de pacientes de acuerdo a grupos de edad con infección por <i>K. pneumoniae</i> | 31 |
| Tabla 16. Distribución de pacientes de acuerdo al origen de adquisición de infecciones por <i>K. pneumoniae</i> | 32 |
| Tabla 17. Sitios de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> | 32 |
| Tabla 18. Servicios en los que fueron documentadas las infecciones por <i>K. pneumoniae</i> | 34 |
| Tabla 19. Tipo de infecciones ocasionadas por <i>K. pneumoniae</i> | 35 |

| | |
|--|----|
| Tabla 20. Tipos de enzimas encontradas en <i>K. pneumoniae</i> y origen de adquisición | 36 |
| Tabla 21. Tipo de enzima, aislamiento y origen de adquisición de <i>K. pneumoniae</i> | 37 |
| Tabla 22. Relación entre el servicio y tipo de enzimas en <i>K. pneumoniae</i> | 38 |
| Gráfica 1. Distribución de áreas hospitalarias en las que se documentaron las infecciones por <i>E. coli</i> | 25 |
| Gráfica 2. Distribución de áreas hospitalarias en las que se documentaron las infecciones por <i>K. pneumoniae</i> | 33 |

EPIDEMIOLOGÍA Y PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS INFECCIONES POR *E. COLI* Y *K. PNEUMONIAE* EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

Presenta: **Fredi Giovanni Soto Guzmán R5IP**

Tutores clínicos: **Dr. Agustín Rafaél De Colsa Ranero, Dra. Alejandra Aquino Andrade**

Tutor metodológico: **M en C Chiharu Murata**

1. RESUMEN

Introducción: La resistencia antimicrobiana es un problema creciente que se observa a nivel mundial. Para el grupo de beta-lactámicos, existe una extensa diversidad de mecanismos de resistencias contra estos agentes: modificación de proteínas de unión a penicilina (PBPs), disminución en la concentración del antibiótico, alteraciones en la permeabilidad al antibiótico, por expulsión del mismo a través de bombas de eflujo y la producción de enzimas catalíticas denominadas beta-lactamasas. Debido a avances basados en biología molecular, específicamente la secuenciación de nucleótidos, se ha permitido una mejor caracterización de las beta-lactamasas.

Justificación: En el Instituto Nacional de Pediatría (INP), el patrón fenotípico de resistencia por beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en el año 2005 fue de 35% y 43%, mientras que para el año 2011 fue de 63% y 58% para *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente. Esto representa un 28% de incremento en la resistencia para *E. coli* y 15% de incremento para *K. pneumoniae*. Para conocer con precisión el perfil epidemiológico, es necesario conocer la determinación fenotípica, confirmar genotípicamente los grupos de enzimas involucradas en los aislamientos clínicos de las diversas enterobacterias y analizar su clonalidad para entender mejor la dinámica de propagación.

Objetivo: Conocer la epidemiología y los patrones de resistencia en los aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* en los pacientes pediátricos.

Metodología: Estudio observacional, transversal y descriptivo. Se incluyeron 190 aislamientos no repetitivos de *E. coli* y 84 de *K. pneumoniae* en diferentes muestras biológicas, con patrón de resistencia fenotípica BLEE. Se registró información epidemiológica y clínica de los pacientes a los que correspondían las muestras. Se determinó genotípicamente el tipo de enzima BLEE de cada aislamiento.

Resultados: Se incluyeron 190 aislamientos no repetitivos de *E. coli* y 84 de *K. pneumoniae* con patrón de resistencia fenotípica BLEE. En *E. coli*, los aislamientos de origen hospitalario aportaron el 78% de los mismos, seguido de los comunitarios con el 19% y por último los extrahospitalarios (3%). La orina fue el principal sitio de aislamiento. Los servicios con más reportes fueron pre-hospitalización e Infectología. La enzima BLEE más frecuente fue CTX-M-1, como enzima única, con 131 aislamientos de las 190 muestras. Se documentó la presencia de CTX-M-9 en 6 aislamientos de *E. coli*, enzima que hasta el momento no se había reportado en México. Para *K. pneumoniae*, los aislamientos hospitalarios fueron mayoría (89%), seguido de los extra-hospitalarios (6%) y

finalmente los comunitarios (5%). La sangre fue el primer sitio de aislamiento. Infectología fue servicio con más casos. La combinación de enzimas TEM+SHV+ CTX-M-1 se encontró en 55 de las 84 muestras.

Discusión: Se recolectaron 190 aislamientos para *E. coli* y 84 para *K. pneumoniae*. Para ambos gémenes la adquisición es principalmente hospitalaria. En el caso de *E. coli* predominó la portación de CTX-M-1 ya sea en forma aislada o combinada con otras enzimas, siendo 77% de estos aislamientos de origen nosocomial, lo que indica que este patrón es endógeno y está plenamente diseminado en el INP. El 20% tuvieron origen comunitario, particularmente en aislamientos urinarios. En *K. pneumoniae*, predominaron los patrones enzimáticos combinados (98% del total presentaban 3 o 2 enzimas). Sólo un 2% presentaban una enzima. La mayoría de aislamientos fueron de origen nosocomial, lo que sugiere transmisión horizontal de genes de resistencia. La combinación TEM+SHV+CTX-M-1 fue la principalmente encontrada. A diferencia de *E. coli*, no se encontró la enzima de CTX-M-9. En ninguno de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* se detectaron enzimas del grupo CTX-M-8/25.

2. ANTECEDENTES

Introducción

En la actualidad, la resistencia antimicrobiana es un problema creciente que se observa a nivel mundial. Son múltiples los mecanismos que presentan los microorganismos para conferir resistencia a los diferentes grupos de antibióticos. Hablando específicamente del grupo de beta-lactámicos, que es el grupo más amplio de antibióticos, existe una extensa diversidad de mecanismos de resistencias contra estos agentes, como son la modificación de proteínas de unión a penicilina (PBPs), disminución en la concentración del beta-lactámico en el interior de la célula bacteriana, ya sea por alteraciones en la permeabilidad al antibiótico o bien por expulsión del mismo a través de las denominadas bombas de eflujo; finalmente, el mecanismo más utilizado por las enterobacterias, es la producción de enzimas catalíticas denominadas beta-lactamasas. Estas enzimas confieren la hidrólisis del beta-lactámico, convirtiéndolo en una sustancia química inactiva sin capacidad antimicrobiana, por lo que su efecto es rápidamente anulado. El origen de las beta-lactamasas producidas por enterobacterias se remonta a su primera descripción en 1940 en un aislamiento de *E. coli*. A partir de entonces el número de beta-lactamasas ha sido creciente en forma paulatina. Debido a los avances tecnológicos basados en biología molecular, específicamente la secuenciación de nucleótidos, se ha permitido una mejor caracterización de las beta-lactamasas.

Antibióticos Beta-lactámicos

Los beta-lactámicos son antibióticos definidos por la estructura del anillo beta-lactámico al cual pertenecen diversos grupos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de beta-lactamasas. El mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis del peptidoglicano que compone a las paredes bacterianas, que les provee estabilidad rígida a la célula por su estructura de enlaces cruzados. El peptidoglicano está compuesto de cadenas lineales de dos azúcares alternadas: *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico, entrecruzados por cadenas peptídicas. La

formación del precursor del peptidoglicano se completa con la adición del dipéptido D-Ala-D-Ala. UDP-acetilmuramil-pentapéptido y el UDP- acetilglucosamina se unen para formar un polímero. Los enlaces cruzados se completan por la reacción de transpeptidación que ocurre fuera de la membrana celular. Los antibióticos beta-lactámicos inhiben este último paso, acilando la transpeptidasa mediante la ruptura del enlace –CO-N- de anillo beta-lactámico. ¹

Enzimas beta-lactamasas

Son por definición enzimas que pueden hidrolizar irreversiblemente en enlace amida del anillo beta-lactámico, transformándolos en compuestos inactivos incapaces de ejercer su acción antibiótica. ^{1, 2, 3}

Clasificación de Beta-lactamasas

Actualmente existen al menos un total de 1069 beta-lactamasas (comunicación personal Karen Bush, ICAAC 2011). Se estima que del año 2010 al 2011 hubo un incremento del 20-30% de las nuevas beta-lactamasas descritas. Desde 1970 aparecieron esquemas para clasificar las beta-lactamasas; en la actualidad se utilizan esencialmente la clasificación de Ambler y la de Bush-Jacoby-Medeiros. El esquema de Ambler divide a las beta-lactamasas en cuatro clases (A - D). Las bases de esta clasificación son la homología de las proteínas y características fenotípicas. Las beta-lactamasas A, C y D son serin-beta-lactamasas, incluyen enzimas que hidrolizan sus substratos mediante un residuo de serina y las beta-lactamasas clase B son metalo-beta-lactamasas que poseen en su sitio activo átomos de zinc ².

El esquema de clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa a las Beta-lactamasas de acuerdo a sus similitudes funcionales (substrato y perfil de inhibición). Existen cuatro grupos principales con múltiples subgrupos ³.

Grupo 1: cefalosporinas pertenecen a la clase C de la clasificación molecular de Ambler; son codificadas en los cromosomas de muchas enterobacterias y algunos otros microorganismos. Son más activas a cefalosporinas que a benicilpenicilina y usualmente resisten la inhibición por ácido clavulánico; son activas contra cefamicinas como cefoxitina, tienen afinidad por aztreonam, contrario a las cefalosporinas de clase A. ³

Algunas poseen propiedades inusuales como pérdida de actividad por cefoxitin, inhibición por clavulanato o tazobactam o inactivación de cefotaxima pero no ceftazidima. Algunas enzimas de este grupo pueden estar codificadas por plásmidos. ^{1, 3}

Grupo 1e: cefalosporinas que se caracterizan por tener una mayor actividad contra ceftazidima debido a eliminaciones e inserciones, se han denominado Beta-lactamasas AmpC de espectro extendido (ESAC). Las enzimas más representativas de este grupo son: *E. coli* AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 GC1 y CMY-37. ^{1,3}

Grupo 2: está formada por serin-beta-lactamasas incluye las clases moleculares A y D, representa el grupo más grande de las Beta-lactamasas, debido al incremento en la identificación de BLEE (Grupo 2be). ^{1,3}

Grupo 2a: incluye penicilinasas, son un grupo pequeño con un espectro de hidrólisis limitado, son beta-lactamasas predominantemente de cocos Gram positivos, incluyendo

Staphylococcus y ocasionalmente *Enterococcus*. Las enzimas hidrolizan preferencialmente bencilpenicilina y muchos derivados de penicilinas, la hidrólisis es baja a cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, una excepción es la hidrólisis de nitrocefina. Son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam, la mayoría de estas enzimas son cromosomales. ^{1,3}

Grupo 2b: hidrolizan penicilinas y cefalosporinas como cefaloridina y cefalotina; son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. En este grupo se incluyen las TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que fueron identificados principalmente en plásmidos durante las décadas de 1970s y 1980s, posterior a 1995 se han identificado varios subtipos de estas enzimas. ^{1,3}

Grupo 2be: comprende a las Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE); tienen actividad contra penicilinas y cefalosporinas, pueden hidrolizar una o más oximiino-Beta-lactámicos como cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. El primer elemento de este subgrupo fue derivado por sustituciones aminoacídicas en las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV, también se encuentra en este grupo las enzimas CTX-M que son codificadas cromosómicamente en especies de *Kluyvera*, la mayoría de las CTX-M hidrolizan cefotaxima más rápidamente que ceftazidima, muchas hidrolizan cefepime. Todas son inhibidas por tazobactam de manera más eficiente que por ácido clavulánico. En este grupo también se clasifican enzimas menos comunes no relacionadas con TEM, SHV o CTX-M, como BEL-1, BEs_1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 y miembros de las familias PER y VEB. ^{1,3}

Subgrupo 2br: está formado por Beta-lactamasas de amplio espectro que han adquirido resistencia a ácido clavulánico y que mantienen el espectro de actividad del subgrupo 2b. Hidrolizan penicilinas y cefalosporinas como cefaloridina y cefalotina, dentro de estas se incluyen enzimas como TEM-30 y TEM-31 (IRT-2 e IRT-1 respectivamente). ^{1,3}

Grupo 2ber: incluye enzimas TEM que combinan el espectro extendido con una resistencia relativa a la inhibición por ácido clavulánico, han sido denominadas enzimas del complejo mutante TEM (CMT) en este grupo se incluye a la enzima TEM-50 también conocida como CMT. ^{1,3}

Grupo 2c: está formado por penicilinasas que se caracterizan por hidrolizar carbenicilina o ticarcilina tan rápido como a bencilpenicilina. Son inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam. ^{1,3}

Grupo 2ce: contiene carbenicilinas de espectro extendido denominadas RTG-4 (CARB-10) que poseen actividad contra cefepime o cefpirome. ^{1,3}

Grupo 2d: incluye Beta-lactamasas que hidrolizan cloxacilina u oxacilina más rápidamente que bencilpenicilina, que son conocidas como enzimas OXA, muchas de estas enzimas son inhibidas por NaCl. ^{1,3}

Grupo 2de: se encuentran enzimas que hidrolizan cloxacilina u oxacilina con espectro extendido que incluye a oximiino-Beta-lactámicos pero no a carbapenémicos. La mayoría de este grupo son derivados de OXA-10. ^{1,3}

Grupo 2df: son enzimas OXA con actividad para hidrolizar a carbapenémicos, con mayor eficiencia a imipenem que a meropenem; se describieron por primera vez en el cromosoma de *Acinetobacter baumannii*, aunque algunas como OXA-23 y OXA-48 han

sido encontradas en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Este grupo ha sido dividido en nueve grupos de acuerdo a su homología aminoacídica. ^{1,3}

Grupo 2e: incluye cefalosporinas que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro y son inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam; tiene baja afinidad por aztreonam. ^{1,3}

Grupo 2f: se incluyen a las serin-carbapenemasas de la clase molecular A, son inhibidas por tazobactam y ácido clavulánico, están representadas por las familias SME, IMI-1 y NMC. Las cefalosporinas como ceftazidma no es bien hidrolizada por SME e IMI-1, pero el aztreonam es degradado por la mayoría de ellas, excepto GES-3 y GES-4. Algunas enzimas de este subgrupo son codificadas en plásmidos como KPC y algunas GES (formalmente IBC). ^{1,3}

Grupo 3: se incluyen metalo beta-lactamasas (MBL) que usualmente son producidas en combinación con una segunda o tercera beta-lactamasa en aislados clínicos, se distinguen por poseer un residuo de zinc en su sitio activo, antes se distinguían por hidrolizar carbapenémicos, pero actualmente a algunas serin-beta-lactamasas también se les atribuye esta característica (subgrupos 2df y 1f); sin embargo, no hidrolizan eficientemente a los monobactámicos y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam, pero si pueden ser inhibidas por quelantes como EDTA. Se han dividido de acuerdo a su estructura en tres subclases: B1, B2 y B3 y en subgrupos de acuerdo a su función: 3a, 3b y 3c. ^{1,3}

El subgrupo 3a incluye a MBL codificadas en plásmidos como las que pertenecen a las familias IMP y VIM que se encuentran muy diseminadas principalmente en bacterias Gram negativas no fermentadoras y en menor grado en la familia *Enterobacteriaceae*. También en esta clasificación se agrupan a enzimas como CAU-, GOB-1 y FEZ-1. ^{1,3}

En la Tabla 1, se expone la correspondencia de ambas clasificaciones.

Tabla 1. Correspondencia de las Clasificaciones de Beta-Lactamasas

| Bush | Ambler | Ubicación | Tipo | Sustratos | Representantes | Inhibidores |
|------|--------|------------|-------------------------------------|-----------------------------|--|-------------|
| 1 | C | Cromosomal | Cefalosporinasas | CAZ | AmpC: CMY (86), DHA(8), FOX, MIR, ACT | AC, CLO |
| 2a | A | | Penicilinasas espectro limitado | PEN | BLA-Z | |
| 2b | A | | Penicilinasas amplio espectro | PEN, CFS bajo espectro | TEM-1/TEM-2, SHV-1 | AC, TZ |
| 2be | A | Plásmidos | BLEE | PEN, todas CFS, AZT | TEM (187), SHV(140) CTX-M (120) | |
| 2br | A | | Resistentes al Inhibidor | PEN, CFS bajo espectro, AZT | IRT-1, IRT-2, | AC |
| 2ber | A | | Enzimas del complejo mutante TEM | | TEM-50 | |
| 2c | A | | Penicilinasas | PEN, CAR, TIC, CFS | PSE-1 | AC, TZ |
| 2ce | A | | Carbencilinas de espectro extendido | FEP, CEFPIROME | RTG-4, CARB-10 | |
| 2d | D | | Cloxacilinasas, oxacilinasas | PEN, CLOX, OXA | OXA | NaCl |
| 2de | D | | Oxacilinasas-BLEEs | PEN, CLOX, OXA, CFS | OXA-10 | |
| 2df | D | | Oxacilinasas | PEN, CLOX, OXA, CFS, CBP | OXA-23 y OXA 48 | |
| 2e | | | Cefalosporinasas | CFS amplio espectro | | AC, TZ |
| 2f | A | | Serin-carbapenemasas | CBP | SME, IMI-1, NMC, GES, KPC | AC, TZ |
| 3 | B | | MBL | PEN, CFS, CBP | B1: IMP (33), VIMs (33), SPM, BclI B2: CphA, Sfh-1 B3: L1, FEZ, GOB, CAU IND (8). NDM-1 (6) | EDTA |

Tomado de: Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamasas: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-686

Tipificación molecular

Durante la última década, los métodos tradicionales de caracterización y serotipificación de cepas, así como la tipificación de bacteriófagos han sido complementados o sustituidos con nuevos métodos moleculares, como el de huella genómica, los métodos basados PCR y el análisis de patrones de restricción de DNA cromosómico mediante electroforesis

en gel de campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) y recientemente por tipificación de secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés *Multilocus Sequencing Typing*).⁴

La tipificación molecular proporciona datos muy útiles sobre el origen y la tasa de propagación de las infecciones en poblaciones estudiadas, por lo que se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas en la evaluación y desarrollo de medidas de prevención.⁴

Electroforesis en gel de campos pulsados

Debido a su eficacia el método de PFGE sigue siendo muy utilizado para la subtipificación de muchas bacterias incluyendo a *E. coli* y *Klebsiella* spp.⁴ La técnica de PFGE se ha utilizado para la separación de grandes moléculas de DNA (de hasta 1×10^6 pb de longitud), basándose en la aplicación alternada de campos eléctricos desde diferentes ángulos, lo que logra la separación de las moléculas de acuerdo a su tamaño, es decir mientras más larga sea la molécula, menor será su migración y por lo tanto se reorientará al cambio del campo eléctrico. Esta separación está dada por la longitud del pulso; donde los pulsos cortos se utilizan para separar moléculas pequeñas, mientras que los pulsos largos son utilizados para separar aquellas moléculas de gran tamaño. Las bandas resultantes de los fragmentos se pueden detectar por medio de una tinción con bromuro de etidio.^{4,5}

Para la tipificación de bacterias se requiere la digestión del DNA con endonucleasas de restricción y la electroforesis de los fragmentos del DNA tratados con las enzimas. Los patrones de restricción de DNA de las cepas se comparan uno a uno para determinar su relación.⁶

La confiabilidad de este método depende de la identificación de todo el conjunto y patrón de fragmentos generados por enzimas de restricción, donde los inconvenientes son: la resolución de los fragmentos de la digestión puedan verse obstaculizadas si el número de los fragmentos es elevado o si hay dos o más bandas que tengan longitudes similares o que los fragmentos sean muy pequeños para poder ser detectados.⁵

Para realizar la interpretación de los patrones de restricción, se debe entender que los eventos genéticos ocurridos al azar pueden alterarlos. Si bien esto hace que la interpretación sea difícil, el conocimiento de cómo estos eventos genéticos afectan, permite asignar correctamente a cada aislamiento dentro de cuatro categorías: indistinguible del patrón, muy relacionado con el patrón, posiblemente relacionado con el patrón, o no relacionado con el patrón.⁵

Aislamientos de *E. coli* productores de CTXM-1 provenientes de diferentes pacientes y sitios anatómicos, de infecciones nosocomiales y comunitarias fueron clasificadas en dos grupos de patrones idénticos⁷ también ha auxiliado a establecer la relación entre pulsotipos de cepas aisladas de infecciones comunitarias y nosocomiales^{8,9}

Utilizando PFGE se caracterizaron 57 aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas provenientes de seis hospitales de regiones diferentes en Brasil, en cinco pulsotipos¹⁰ todos los aislados fueron resistentes a Beta-lactámicos y susceptibles a colistina y tigeciclina, los cuales mostraron fenotipos variables contra aminoglucósidos,

quinolonas, nitrofurantoina y trimetoprim-sulfametoxazol, señalando que esta herramienta puede ser utilizada para caracterizar a aislados heterorresistentes.¹⁰

Utilizando PFGE se pudo caracterizar aislados de *E. coli* productoras de CTX-M-1 resistentes a ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefazolina, ceftazidima, cefoxitina y sensibles a imipenem, así como establecer que pertenecían a una misma clona, aun cuando fueron aislados de diferentes hospitales permitiendo concluir que estas cepas aparecieron por eventos esporádicos y no causados por algún brote epidémico.⁷

En un estudio realizado en Turquía con cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, se detectó el gen OXA-48 y otros genes de BLEE como TEM, SHV, CTX-M y VEB. Al ser analizadas por PFGE se determinaron varios patrones genotípicos, de los cuales tres patrones de clonalidad se relacionaron con otros previamente analizadas, demostrando que la posible diseminación de los genes no fueron diseminadas solamente por una clona, aunque los aislados se obtuvieron de la misma unidad clínica, lo que podría significar la presencia de varias clonas que poseen el gen de OXA-48 y genes BLEE. Esta coexistencia de genes de resistencia es de suma importancia debido a que disminuye la eficacia de los β -lactámicos.¹¹

Tipificación multilocus

Las tendencias actuales señalan a la técnica de MLST como una estrategia para tipificar a los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*.^{8,9} Esta tipificación se propuso en 1998 como un método universal y definitivo para la caracterización bacteriana, basándose en el análisis de las secuencias nucleotídicas de *loci* múltiples de genes constitutivos o fragmentos de ellos¹³; las bases de datos de MLST están disponibles para asegurar que la nomenclatura uniforme es accesible de manera fácil a todos aquellos interesados en la categorización bacteriana. MLST se ha empleado para investigaciones epidemiológicas a varias escalas.¹⁴

La detección de aislados que pertenecen al complejo clonal de *K. pneumoniae* 258 (CC258) (ST258 y su variantes de un locus ST11 y ST437) es de especial interés. La clona ST258 está diseminada globalmente y es asociada principalmente con la emergencia y diseminación de aislados productores de KPC en diferentes países de Norte América, Europa y Asia. El linaje ST11 *K. pneumoniae* fue reportada en Francia en 1997 y es predominante en China, Corea del Sur, Polonia, Portugal, España y Brasil, esta clona se asocia con diferentes BLEE principalmente CTX-M-15 y CTX-M-14 y recientemente a KPC-2 y enzimas VIM.¹⁰

Se han caracterizado cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 aisladas de infecciones comunitarias con perfiles de susceptibilidad idénticos para pertenecer al perfil alélico ST131, con perfiles PFGE de 96% de identidad lo que sugiere que pertenecen a la misma cepa⁸ coincidiendo con los reportes globales que señalan a *E. coli* O25:H4-ST131 responsable de la diseminación pandémica de CTX-M-15.^{15,17}

Principales Grupos de Enzimas de acuerdo a sus Substratos

BLEE

Las BLEE son un grupo de enzimas que originalmente fueron descritas en Alemania en el año de 1983 y desde entonces se han extendido a todo el mundo rápidamente alcanzando proporciones epidémicas. Este grupo de beta-lactamasas son particularmente producidas por enterobacterias como *E. coli* y *Klebsiella sp*; Se caracterizan por hidrolizar todas las cefalosporinas, así como aztreonam, pero siendo sensibles a cefoxitina e inhibiéndose por el ácido clavulánico. Las BLEE son habitualmente mediadas por plásmidos. Los principales grupos de BLEE son las TEM y las SHV, existiendo 190 enzimas TEM y 142 enzimas SHV; éste gran número de enzimas descritas en ambos grupos se deben a las numerosas mutaciones puntuales que han surgido en las enzimas originales. Recientemente las enzimas CTX-M han venido paulatinamente reemplazando a las enzimas previamente descritas, particularmente a nivel comunitario. Actualmente existen más de 120 enzimas, repartidas en 5 grupos principales de CTX-M, conocidos como CTX-M1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 respectivamente. Otras enzimas BLEE menos prevalentes, pero de importancia clínica son los grupos VEB (7), PER (7), GES (20), TLA, IBC, SFO-1, BES-1 y BEL-1. Recientemente NDM con 6.^{1, 2, 3}

Carbapenemasas

Diversas carbapenemasas han sido identificadas en bacilos Gram negativos; éstas enzimas pertenecen a las clases moleculares A y D (dependientes de serina en su sitio activo) o bien a la clase molecular B (denominadas metalo-beta-lactamasas, ya que dependen del zinc en su sitio activo). Estas carbapenemasas han emergido también en una escala global y representan un verdadero problema de salud pública, dada el pobre armamentario terapéutico contra estos bacilos Gram negativos multi y panresistentes KPC.¹²

En la clase B de las carbapenemasas, se encuentran principalmente las enzimas tipo VIM, IMP, GIM y SIM; éstas elementalmente se encuentran ubicadas en integrones, que han sido incorporados en casetes, por lo que son fácilmente transferibles a través de plásmidos y transposones³.

Las carbapenemasas de la clase D se encuentran agrupadas en 9 clusters, que derivan de forma correspondiente a 9 subfamilias (OXA-23, OXA-24, OXA-52, OXA-58, OXA-55, OXA-48, OXA-50, OXA-60, OXA-62)². La identidad a nivel de aminoácidos entre los grupos es entre el 40 - 70%, sin embargo dentro del grupo/subfamilia la identidad es igual o mayor al 92.5%. Las OXAs se han documentado en las enterobacterias, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*^{7,12}

Importancia Clínica e Impacto en las Infecciones Nosocomiales

Las enterobacterias productoras de beta-lactamasas tienen un enorme impacto en la práctica clínica. Estas bacterias están relacionadas con infecciones como bacteriemias, infecciones intraabdominales, infecciones urinarias, neumonías, infecciones de heridas

quirúrgicas, infecciones relacionadas a dispositivos (catéteres intravasculares, diálisis, derivaciones ventrículo y aurículo peritoneales, prótesis osteoarticulares, entre otras), infecciones en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos, recién nacidos, ancianos, etc. Puesto que muchas de estas infecciones son potencialmente mortales y la mayoría de ellas requieren manejo antimicrobiano dirigido, específico y oportuno, si se inician terapias con cefalosporinas de tercera generación que serán inactivadas por las diversas beta-lactamasas, entonces estos tratamientos serán inefectivos. Está plenamente documentado que el retraso en la identificación etiológica y la detección del patrón de resistencia conlleva a un incremento en la mortalidad de los pacientes (Tumbarello, Schwaber)¹³, por lo ello, la mayoría de las terapias antimicrobianas ante este tipo de infecciones se inician en forma empírica. Para este fin es necesario conocer el perfil epidemiológico de la microbiología y patrones de resistencia en cada hospital, ya que esto determinará el manejo empírico antimicrobiano conjuntamente con el tipo de infección, factores específicos de cada paciente.

Las enterobacterias pueden diseminarse fácilmente en el entorno hospitalario si no existe un adecuado control y vigilancia de las infecciones hospitalarias ocasionadas por estos agentes. Sabemos que no solamente los pacientes con infecciones clínicas por estas bacterias son las fuentes de infección sino que también se encuentran presentes en el entorno hospitalario, predominando en superficies ambientales, equipo e instrumental médico (broncoscopios, sondas, etc.). Sin embargo, un vector de suma importancia es el mismo personal de salud, ya que se puede colonizar y portar enterobacterias al mismo paciente. Por tal motivo es fundamental que existan programas eficientes de control y vigilancia de dichas infecciones nosocomiales, en el que se preste atención a los diversos tipos de infecciones, microorganismos involucrados y patrones de resistencia antimicrobiana.

Detección Microbiológica

Detección fenotípica de resistencia a antimicrobianos

La detección fenotípica de resistencia se puede realizar por métodos cualitativos o cuantitativos. El método cualitativo más usado es el de difusión en disco en el que un disco de papel filtro que tiene una cantidad de antimicrobiano específica es aplicado a la superficie de un agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde al medio produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano.¹²

El método de dilución en caldo es un método cuantitativo en el que se exponen las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antibióticos. Posterior a una incubación se observa el crecimiento de los microorganismos para luego determinar la concentración inhibitoria mínima que se define como la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo y sus unidades son $\mu\text{g/mL}$.¹²

DetECCIÓN GENOTÍPICA DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

El análisis interpretativo del antibiograma nos permite predecir exclusivamente el tipo de resistencia con la que cuenta la bacteria; Podremos deducir un patrón BLEE, uno de AmpC y en caso de resistencia a carbapenémicos la presencia de carbapenemasas, sin embargo, no es factible la diferenciación de los subgrupos de beta-lactamasas presentes. Por ejemplo, ante un patrón fenotípico BLEE, no es posible diferenciar entre enzimas tipo TEM, SHV o CTX-M, ni mucho menos detectar el subtipo de enzima específica (ej. TEM-42, SHV-23, CTX-M-15). Es por ello que se requieren métodos de identificación genotípica, primeramente para la identificación y corroboración de los distintos grupos de beta-lactamasas, lo cual se puede realizar por PCR utilizando grupos de iniciadores genéricos para los grupos más importantes. Para una identificación específica, se requiere secuenciación de los genes de beta-lactamasas para documentar los polimorfismos específicos asociados a resistencia a los agentes beta-lactámicos.¹⁶

3. JUSTIFICACIÓN

Las enterobacterias son los agentes causales de la mayor proporción de las infecciones intrahospitalarias en el Instituto Nacional de Pediatría; se ha observado un incremento de aislamientos en los últimos años, particularmente con *E. coli*, documentándose 278 aislamientos en el año 2004 y prácticamente duplicándose a 454 aislamientos en el año 2009. El incremento de la resistencia a antibióticos beta-lactámicos ha sido alarmante progresivo. El patrón fenotípico de resistencia por Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en el año 2005 fue de 35% y 43%, mientras que para el año 2011 fue de 63% y 58% para *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente. Esto representa un 28% de incremento en la resistencia para *E. coli* y 15% de incremento para *K. pneumoniae*. Para conocer con precisión el perfil epidemiológico del tipo de resistencia al que nos enfrentamos, es necesario conocer la determinación fenotípica, confirmar genotípicamente los grupos de enzimas involucradas en los aislamientos clínicos de las diversas enterobacterias y analizar la clonalidad de dichos aislamientos, todo ello para entender mejor la dinámica de propagación. Este conocimiento permitirá precisar los tipos de resistencias que se enfrentan, mejorar las líneas de diagnóstico en el laboratorio clínico e implementar mejores programas control, monitoreo y prevención de estas infecciones. Adicional a ello y de manera destacada, establecer pautas terapéuticas basadas en la epidemiología local y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. En la actualidad es muy limitada la cantidad de estudios que aborden esta problemática en centros pediátricos de referencia, que son por su naturaleza en los que se ha observado el aumento de agentes patógenos resistentes a antibióticos. En la actualidad no existe ningún estudio nacional en pacientes pediátricos en los que se analice el tipo de beta-lactamasas presentes en las enterobacterias, haciendo una correlación epidemiológica de los patrones clonales. Tampoco se ha documentado la frecuencia y el impacto de beta-lactamasas de origen comunitario.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana es una grave amenaza a la salud pública, que crece diariamente de forma preocupante y grave. El conocer la epidemiología local de las enterobacterias y sus patrones de resistencia, permitirá establecer pautas de control para evitar su propagación, medidas para optimizar el tratamiento y las formas de tratamiento. Así mismo será factible plantear manejos antibióticos dirigidos y correctos ante la sospecha y posterior confirmación de una infección por gérmenes productores de beta lactamasas de espectro extendido.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la epidemiología y los patrones de resistencia en los aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* en los pacientes pediátricos?

6. HIPÓTESIS

1. El incremento de la resistencia a cefalosporinas en los aislamientos clínicos de enterobacterias, se debe predominantemente a la presencia de beta-lactamasas tipo BLEE.
2. La mayor proporción de BLEE de origen hospitalario son de tipo TEM y SHV, mientras que las BLEE de origen comunitario son de tipo CTX-M, particularmente CTX-M-15.
3. Dada la naturaleza del INP, que es un centro de referencia, se plantea que existe una importante heterogeneidad en los tipos de enzimas beta-lactamasas que portan las enterobacterias.
4. La detección de aislamientos *E. coli* y *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos es menos del 1%.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer la epidemiología y los patrones de resistencia en los aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* en los pacientes pediátricos.

Objetivos Específicos

Conocer la frecuencia y la distribución de las diversas infecciones en pacientes pediátricos causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* con diversos patrones de resistencia a beta-lactámicos.

Determinar los diversos grupos de beta-lactamasas presentes en dichas aislamientos.

8. CLASIFICACION DE LA INVESTIGACION

Estudio observacional, transversal y descriptivo.

9. MATERIAL Y METODOS

Criterios de inclusión

Se incluyeron a todos los pacientes ingresados al INP que contaron con cualquier infección clínica documentada por aislamiento microbiológico con *E. coli* y *K. pneumoniae* en cultivos, en el periodo de un año (Enero 2013 a Enero 2014).

Se incluyeron todos los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* que contaban con un patrón fenotípico de resistencia a cefalosporinas y/o carbapenémicos en las siguientes muestras biológicas: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), secreciones purulentas varias (heridas, infecciones cutáneas, piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares, líquido pleural, líquido peritoneal), aislamientos obtenidos de catéteres intravasculares y cualquier dispositivo de implantación quirúrgica (prótesis cardiacas-articulares-óseas, válvulas de derivación ventricular).

Los aislamientos obtenidos podían ser de pacientes ya hospitalizados o bien pacientes que ingresaron al Instituto, independientemente de la edad, sexo, factores de riesgo, condición clínica o epidemiológica.

En caso de cultivos repetidos con crecimiento del mismo patógeno, sólo se incluyó el primer aislamiento.

Criterios de exclusión

Aquellos pacientes cuyos aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, no fue posible la identificación precisa como miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Criterios de eliminación

Se eliminaron aquellos pacientes que por cualquier motivo no contaron con los datos epidemiológicos o microbiológicos completos para el análisis final.

Ubicación del estudio

El Instituto Nacional de Pediatría es el sitio de estudio en el cual se realizó la inclusión de pacientes pediátricos con infecciones clínicas. En el laboratorio de bacteriología se realizó la identificación bacteriana a través de cultivos bacteriológicos y pruebas bioquímicas correspondientes, mientras que en el Laboratorio de Microbiología Molecular se realizaron las reacciones moleculares específicas (PCR en punto final) para la detección de los diferentes grupos de beta-lactamasas estudiadas.

Logística General

Se incluyeron a todos aquellos pacientes que ingresaron o se encontraban ingresados en el Instituto Nacional de Pediatría y que contaban con alguna infección clínica, que fuera corroborada microbiológicamente a través de cultivo y cuyo aislamiento sea *E. coli* y *K. pneumoniae*. Se estableció la identidad del microorganismo utilizando un método semi-

automatizado. Se determinó si fue un agente causal de una infección ambulatoria o nosocomial, así mismo se determinó el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de interés (cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a y 4^a generación, monobactámicos y carbapenémicos) cuyos valores de CMI serán interpretados siguiendo los lineamientos del CLSI¹⁸, posteriormente se detectó fenotípicamente la producción de enzimas beta-lactamasas de los tipos: BLEE, AmpC, MBL y carbapenemasas; de acuerdo al perfil de beta-lactamasas que presentaron los aislados se realizó la detección de los genes que las codifican mediante la técnica de PCR teniendo como blancos los subtipos de las enzimas BLEE (TEM, SHV y CTX-M), AmpC (LAT, BIL y CMY), MBL (IMP y VIM) y KPC (subtipos 1 al 5).

DETECCION FENOTIPICA DE RESISTENCIA

Selección de cepas

Se seleccionaron los aislamientos de las enterobacterias que cumplieran con los criterios de inclusión y que hayan sido identificados por el Sistema Automatizado para Microbiología BD Phoenix™ durante el periodo año (Enero 2013-Enero 2014). Estos aislamientos se conservaron a -70°C, se clasificaron por servicio y se estableció si se trataba de una infección y/o colonización y si ésta era comunitaria o nosocomial. Se obtuvo la información respecto al tratamiento que recibió el paciente de acuerdo a los criterios de inclusión.

Determinación de Susceptibilidad Antimicrobiana por Métodos Automatizados

A los aislamientos seleccionados se les realizó la determinación de susceptibilidad de manera automatizada utilizando el Sistema Automatizado para Microbiología BD Phoenix™. Se obtuvieron las CIM de cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefoxitima (FOX), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), meropenem (MEM), ertapenem (ETP) utilizando las tablas de interpretación del CLSI (Tabla 2)¹⁸.

Tabla 2. Valores para la Interpretación de Diámetros de Halos de Inhibición y Correspondencia de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

| Agente antimicrobiano | Concentración | Diámetro en mm | | | CIM en µg/mL | | |
|----------------------------|---------------|----------------|-------|-----|--------------|-----|-----|
| | | S | I | R | S | I | R |
| Cefoxitina | 30 µg | ≥18 | 15-17 | ≤14 | ≤8 | 16 | ≥32 |
| Cefotaxima 3 ^a | 30 µg | ≥26 | 23-25 | ≤22 | ≤1 | 2 | ≥4 |
| Ceftazidima 3 ^a | 30 µg | ≥21 | 18-20 | ≤17 | ≤4 | 8 | ≥16 |
| Cefepime 4 ^a | 30 µg | ≥18 | 15-17 | ≤14 | ≤8 | 16 | ≥32 |
| Aztreonam | 30 µg | ≥21 | 18-20 | ≤17 | ≤4 | 8 | ≥16 |
| Meropenem | 10 µg | ≥23 | 20-22 | ≤19 | ≤1 | 2 | ≥4 |
| Imipenem | 10 µg | ≥23 | 20-22 | ≤19 | ≤1 | 2 | ≥4 |
| Ertapenem | 10 µg | ≥23 | 20-22 | ≤19 | ≤0.25 | 0.5 | ≥1 |

Se estableció si poseían un patrón de susceptibilidad que indicara la producción de beta-lactamasas utilizando los criterios establecidos en la tabla 3.

Tabla 3. Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana

| Beta-lactamasas | CTX | CAZ | FOX | FEP | ATM | IPM | MEM | ETP | Panel PCR |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
| BLEE | S/R | S/R | S | S/R | R | S | S | S | 1, 2 y 3 |
| AmpC | r/R | r/R | R | S/R | S | S | S | S | 4 |
| MBL | R | R | R | R | S/R | I/R | I/R | I/R | 5 |
| KPC | r | r | R | r | S | I/R | I/R | I/R | 5 |

R: resistente; r: halos reducidos o CIM elevadas con respecto al fenotipo salvaje, pero dentro del rango de sensibilidad; S: sensible

Pruebas Confirmatorias para Documentar la Resistencia

Detección Fenotípica de BLEE

A partir de un cultivo fresco de cada una de las cepas se hizo una suspensión en solución salina 0.85% con una turbidez equivalente a la del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Esta suspensión se sembró con hisopo en una placa de medio AMH y posteriormente se colocaron discos de ceftazidima (30 µg), ceftazidima-ácido clavulánico (30 µg/10 µg), cefotaxima (30 µg) y cefotaxima-ácido clavulánico (30 µg/10 µg). Posterior a una incubación a 37°C de 16 - 18 h la presencia de BLEE se confirmó por el incremento en la zona del diámetro >5mm para cualquier agente evaluado en combinación con ácido clavulánico comparado con el diámetro del agente solo¹⁹.

Detección molecular de las beta-lactamasas

Extracción de DNA

El DNA de las cepas en estudio se obtuvo a partir de un cultivo en caldo Luria Bertani (LB), a 37°C durante 18 h con agitación a 200 r.p.m. Posteriormente se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación 17,900 x g durante 10 min. El DNA total se extrajo utilizando el sistema minikit de Qiagen. Al final el DNA se diluyó en 50 µl de agua desionizada y estéril y se conservó a -70°C hasta su uso.¹⁹

La integridad del DNA obtenido se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %, empleando 2 µl del DNA mezclado con un volumen igual de colorante y utilizando como regulador borato de sodio (SB) 1X (Ácido bórico 0.6 M, hidróxido de sodio 10 mM)¹⁹. Terminada la electroforesis, el DNA se visualizó en un transiluminador con luz UV y se cuantificó a A₂₆₀.

Amplificación a través de PCR

La reacción se realizó en un termociclador AB7300. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µl y estaba constituida por 200 nM – 500 nM de cada iniciador, 20 ng de DNA. La amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización 94°C por 1 min,

seguido de 30 ciclos 94°C por 40s, 60°C 40s, 72°C 60s y 72°C 7 min. Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con biotium^{MR} después de someterlos a una electroforesis 100 V durante 60 min. Se realizó un total de 3 paneles de PCR la detección de los grupos más frecuentes de beta-lactamasas BLEE, como se describe previamente¹⁹.

Panel 1: de PCR multiplex bla_{TEM} / bla_{SHV}

Variantes TEM incluyendo TEM-1 y TEM-2 /

Variantes SHV incluyendo SHV-1

Panel 2: de PCR multiplex bla_{CTX-M}

Variantes de CTX-M grupo1 incluyendo CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-15

Variantes de CTX-M grupo 2 incluyendo CTX-M-2

Variantes of CTX-M grupo 9 incluyendo CTX-M-9 y CTX-M-14

Panel 3: PCR CTX-M Grupo 8/25

CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26 y CTX-M-39 a CTX-M-41

Variables del Estudio

En la tabla 4, se exponen las variables les a analizar en el presente proyecto

Hoja de Recolección de Datos

Ver anexo 1.0

Tabla 4. Variables del estudio

| Variable | Definición | | Tipo de variable |
|--------------------------------|---|---|---------------------|
| | Conceptual | Operacional | |
| Identificación del aislamiento | Nombre del género y especie del microorganismo aislado en base al patrón bioquímico que permite la identificación de una especie bacteriana | <i>E. coli</i> <i>K.pneumoniae</i> | Cualitativa nominal |
| Sitio de aislamiento | Sitio anatómico del que se obtiene el aislamiento | Hemocultivo (S) Urocultivo (U) Muestra Respiratoria (R) Líquido cefalorraquídeo (LCR) Catéter Vascular (CV) Secreción Herida (H) Sec. Herida quirúrgica (HX) Empiema Pleural (E) Líquido Peritoneal (P) | Cualitativa nominal |
| Tipo de infección | El diagnóstico clínico de la infección con la que cuenta el paciente | Herida quirúrgica (HX) Infección urinaria (IVU) Neumonía (N) Bacteriemia (B) Catéter (CAT) | Cualitativa nominal |
| Adquisición | Si la infección adquirida se adquirió en la comunidad o en el centro hospitalario | Ambulatoria-Comunitaria Nosocomial (INP) Nosocomial Extra INP (EXTRA-INP) | Cualitativa nominal |
| Servicio | Servicio en el que se localizará el paciente en el momento de la toma de muestra para cultivo | Neonatología (NEO) Neurología (NEU) Inmunología (INM) Nefrología (NEF) Gastroenterología(GAS) Infectología (INF) Medicina interna (MI) Unidad de Terapia intensiva (UTI) Urgencias (URG) | Cualitativa nominal |
| Fecha de aislamiento | Fecha en el que se realiza la toma del cultivo | Día-Mes- Año | Cualitativa ordinal |
| Días de aislamiento | Días después del internamiento en que se aisló el microorganismo | No. días | Numérica continua |

| | | | |
|------------------------------------|--|--|-----------------------|
| Fecha de ingreso | Fecha en el que el paciente es ingresado al hospital | Día-Mes- Año | Cualitativa ordinal |
| Edad del paciente | | Años/meses | Cuantitativa discreta |
| Sexo del paciente | | Femenino/Masculino | Cualitativa nominal |
| Esquema de antibióticos | Antibióticos utilizados previo o durante la aislamiento del microorganismo | Varios esquemas en base a codificación | Cualitativa nominal |
| Genotipificación de beta-lactamasa | Identificación molecular de la beta-lactamasa | SHV, TEM, CTXM-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX – 8/25 | Cualitativa nominal |

10. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó estadística descriptiva; en las variables categóricas se reportaron porcentajes y para la variable edad se reportó como medida de tendencia central la mediana.

11. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Debido a que se trabajó y se analizaron aislamientos bacterianos, el presente estudio no incluyó la investigación en seres humanos por lo que no tiene implicación en las consideraciones éticas

12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Ver anexo 2.0

13. RESULTADOS

Durante el periodo comprendido entre febrero de 2013 y enero de 2014, se recolectaron 211 aislamientos no repetitivos de *E. coli* y 94 de *K. pneumoniae*, con patrón fenotípico de resistencia sugestivo de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). De estos, se eliminaron 21 aislamientos de *E. coli* y 10 aislamientos de *K. pneumoniae* por no contar con los expedientes de los pacientes o por no contar con la información completa para el análisis. Por lo que para el análisis final, fueron incluidos 190 aislamientos de *E. coli* y 84 de *K. pneumoniae*.

I. *Escherichia coli*

Análisis de datos epidemiológicos y clínicos

De los aislamientos de *E. coli*, 110 muestras correspondieron a pacientes de sexo femenino (58%) y 80 pacientes (42%) a pacientes de sexo masculino (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de pacientes con infección por *E. coli* de acuerdo a su sexo

| Género | Número de Pacientes | Porcentaje (%) |
|------------------|----------------------------|-----------------------|
| Masculino | 80 | 42 |
| Femenino | 110 | 58 |

La mediana de edad fue 4 años, con un rango de edad que oscilaba de 3 días a 17 años. La distribución por grupos de edad se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Distribución de pacientes de acuerdo a grupos de edad con infección por *E. coli*

| Grupos de Edad | Número de Pacientes | Porcentaje (%) |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 0 a 1 mes | 12 pacientes | 6 |
| >1 mes a 1 año | 50 pacientes | 26 |
| >1 a 5 años | 50 pacientes | 26 |
| >5 a 12 años | 48 pacientes | 25 |
| > 12 a 17 años | 30 pacientes | 17 |

Mediante revisión de los expedientes clínicos, se clasificó a los diferentes aislamientos productores de BLEE según su origen de adquisición en:

(1) Adquiridos nosocomialmente en el Instituto Nacional de Pediatría (INP). Se entiende como infección nosocomial o infección asociada al cuidado de la salud a aquella que se manifiesta y que no estaba presente ni en incubación al momento del ingreso del paciente a la institución; en general, se acepta un periodo de 48 horas libre de signos o síntomas y que no esté en incubación al ingreso. Es importante el criterio clínico, ya que hay infecciones adquiridas en el hospital desde el momento del ingreso como la infusión de medicamentos o soluciones contaminadas, siendo casos que entran dentro de la definición de nosocomial.

(2) Extra-INP. Se refiere a infecciones también adquiridas nosocomialmente, pero en instituciones diferentes al Instituto Nacional de Pediatría (Extra- INP), por lo general, son centros hospitalarios o clínicas de donde provienen los pacientes referidos.

(3) Comunitaria. Una infección es adquirida en la comunidad si el paciente no ha estado recientemente en una institución de salud ni ha estado en contacto con alguien que recientemente se haya encontrado en una institución de atención de salud.

Del total de aislamientos de *E. coli*, 148 fueron clasificados como adquiridos en el INP (78%), 5 aislamientos Extra-INP (3%) y 37 comunitarios (19%) (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de pacientes de acuerdo al origen de adquisición de infecciones por *E. coli*

| Adquisición | Número | Porcentaje (%) |
|--------------------|---------------|-----------------------|
| INP | 148 | 78 |
| Comunitario | 37 | 19 |
| Extra - INP | 5 | 3 |

Se clasificó el origen de la muestra del cual se obtuvo el aislamiento (orina, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), entre otros). La tabla 8 muestra el número absoluto y el porcentaje de cada una de ellas, siendo las muestras de orina el principal sitio de aislamiento (49%), seguidas en frecuencia las muestras bronquiales (16%).

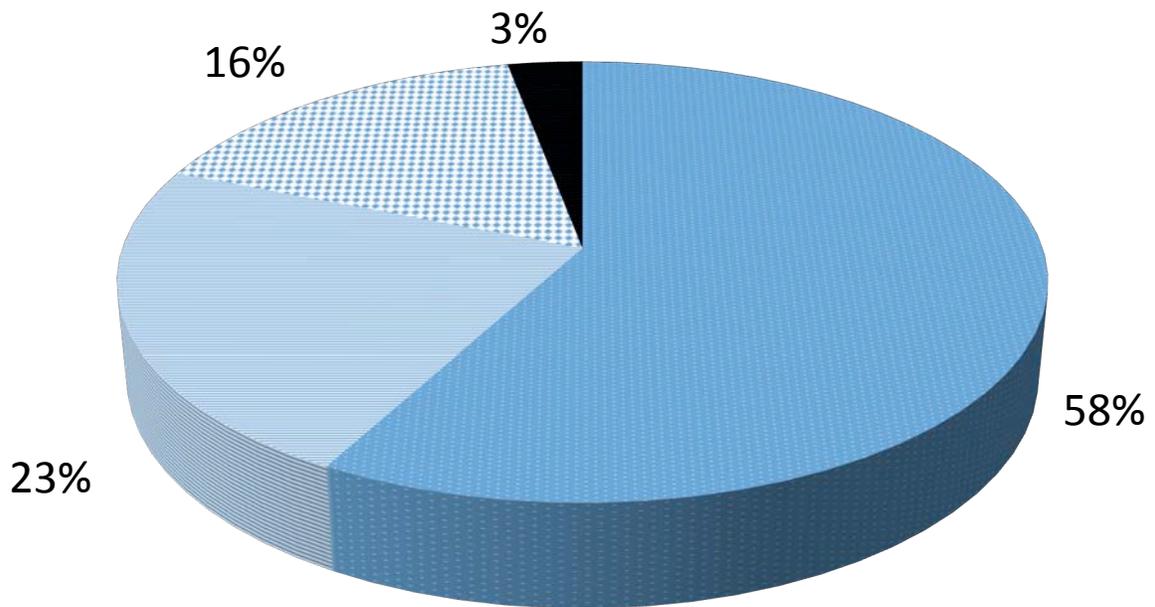
Tabla 8. Sitios de aislamientos de *E. coli*

| Sitio de Aislamiento | Número | Porcentaje (%) |
|--------------------------------|---------------|-----------------------|
| Orina | 94 | 49 |
| Aspirado bronquial | 31 | 16 |
| Secreción | 22 | 12 |
| Sangre | 21 | 11 |
| Líquido cefalorraquídeo | 6 | 3 |
| Exudado vaginal | 4 | 2 |
| Aspirado nasofaríngeo | 3 | 1.5 |
| Punta de catéter | 3 | 1.5 |
| Absceso | 2 | 1 |
| Líquido pleural | 1 | 1 |
| Biopsia pulmonar | 1 | 1 |
| Líquido peritoneal | 1 | 1 |
| Exudado ocular | 1 | 1 |

Se hizo además una clasificación de los servicios/departamentos en donde el paciente se encontraba hospitalizado y donde fueron tomados los cultivos correspondientes. Se organizaron como servicios médicos, quirúrgicos, unidades de cuidado crítico y ambulatorios (Gráfica 1).

Los servicios médicos ocupan el mayor porcentaje de aislamientos siendo la pre-hospitalización (17%) e Infectología (16%) los departamentos en donde más hubo casos reportados. Le sigue las unidades de cuidado crítico, siendo Terapia intensiva (14%) y Urgencias (14%) con el mayor número de casos; posteriormente las unidades quirúrgicas, siendo Cirugía el servicio con la mayoría de casos (9%) y finalmente los servicios ambulatorios (3%). En la tabla 9 se muestran la distribución de los servicios/departamentos en los que se presentaron dichas infecciones.

Gráfica 1. Distribución de áreas hospitalarias en las que se documentaron las infecciones por *E. coli*



- Servicios Médicos: 111 pacientes
- Unidades de cuidado crítico: 44 pacientes
- Servicios quirúrgicos: 30 pacientes
- Servicios ambulatorios: 5 pacientes

Tabla 9. Servicios en los que fueron documentadas infecciones por *E. coli*

| | Servicios | Número de pacientes | Porcentaje (%) |
|---|---------------------|----------------------------|-----------------------|
| Servicios Médicos N = 111 (58%) | Pre-hospitalización | 32 | 17 |
| | Infectología | 31 | 16 |
| | Neumología | 9 | 5 |
| | Nefrología | 8 | 4 |
| | Oncología | 7 | 3.5 |
| | Gastroenterología | 6 | 3 |
| | Inmunología | 5 | 2.5 |
| | Hematología | 4 | 2 |
| | Cardiología | 4 | 2 |
| | Neurología | 3 | .5 |
| | Endocrinología | 1 | 1 |
| | Medicina Interna | 1 | 1 |
| Unidades de Cuidado Crítico N = 44 (23%) | UTI | 14 | 7 |
| | Urgencias | 14 | 7 |
| | Neonatología | 8 | 4 |
| | Terapia CV | 8 | 4 |
| Servicios Quirúrgicos N = 30 (16%) | Cirugía | 15 | 9 |
| | Urología | 8 | 4 |
| | Neurocirugía | 4 | 2 |
| | Ortopedia | 1 | 1 |
| | Cirugía oncológica | 1 | 1 |
| Servicios Ambulatorios N = 5 (3%) | Consulta externa | 5 | 3 |

UTI: Unidad de Terapia Intensiva / Terapia CV: Unidad de Terapia Cardiovascular

Se realizó una clasificación de los diferentes diagnósticos y se unificaron por tipo de infección (infección del tracto urinario, neumonías, bacteriemias, entre otros). Las infecciones del tracto urinario son las que ocupan el primer lugar en los diagnósticos con el 50% de los casos. La segunda infección en frecuencia fueron las neumonías (19%) y en tercer lugar las bacteriemias y sus diferentes presentaciones clínicas en un 13%. Se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Tipo de infecciones ocasionadas por *E. coli*

| Tipo de Infección | Diagnóstico | Número | Porcentaje (%) |
|---|-----------------------------------|---------------|-----------------------|
| Infección del Tracto Urinario N = 95 (50%) | Infección urinaria | 88 | 93 |
| | Infección urinaria/Sepsis | 6 | 6 |
| | Infección urinaria/Choque séptico | 1 | 1 |
| Neumonías N = 36 (19%) | Neumonía | 20 | 55 |
| | Neumonía nosocomial | 9 | 25 |
| | Neumonía/Fibrosis quística | 4 | 11 |
| | Neumonía/Sepsis | 3 | 9 |
| Bacteriemia N = 25 (13%) | Sepsis | 17 | 68 |
| | Choque séptico | 6 | 24 |
| | Infección asociada a catéter | 2 | 8 |
| Infecciones de Piel y Tejidos Blandos N = 19 (10%) | Absceso | 10 | 54 |
| | Infección de herida | 5 | 26 |
| | Úlcera | 2 | 10 |
| | Infección de úlcera | 1 | 5 |
| | Infección de herida/sepsis | 1 | 5 |
| Sistema Nervioso Central. N = 6 (3%) | Ventriculitis | 5 | 83 |
| | Meningitis | 1 | 17 |
| Vulvovaginitis N = 4 (2%) | Vaginitis | 4 | 100 |
| Infecciones Oftalmológicas N = 2 (1.5%) | Conjuntivitis | 1 | 50 |
| | Endoftalmitis | 1 | 50 |
| Fiebre sin Foco N = 1 (0.5%) | Fiebre sin foco | 1 | 100 |
| Peritonitis N = 1 (0.5%) | Peritonitis | 1 | 100 |
| Traqueoendobronquitis N = 1 (0.5%) | Traqueoendobronquitis | 1 | 100 |

Análisis de las beta-lactamasas encontradas en *E. coli*

De los 190 aislamientos de *E. coli* analizados, todos contaban con un patrón fenotípico de BLEE; en ninguno de ellos se encontró un patrón sugerente de resistencia a carbapenémicos. Para determinar el tipo de enzimas beta-lactamasas presentes, se realizó el análisis genotípico de las siguientes enzimas BLEE: TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 y CTX-M-8/25

De los 190 aislamientos de *E. coli*, 138 contenían una sola beta-lactamasa (73%) siendo CTX-M-1 la más frecuentemente hallada, encontrándose en 131 aislamientos. De estas, 102 eran de origen intrahospitalario, seguidos de aislamientos de origen comunitario.

Con menos aislamientos le sigue en frecuencia TEM, SHV y CTX-M-9. No se encontraron aislamientos con CTX-M-8/25.

Del total de aislamientos, 45 de ellos (23%), contenían dos enzimas. La CTX-M-1 en combinación con TEM aporta el mayor número de aislamientos de 2 enzimas en las muestra analizadas (38 aislamientos), predominando las de origen hospitalario seguido de

las comunitarias. Le sigue la combinación de CTX-M-1 y SHV con 4 aislamientos, siendo 3 de origen hospitalario y una de origen comunitario.

Siete de los 190 aislamientos (4%) contenían 3 enzimas. Se documentaron 5 aislamientos con la combinación TEM+SHV+CTX-M-1, siendo 4 de origen hospitalario y uno extra-INP. Dos aislamientos tenían la combinación TEM+CTX-M-1+CTX-M-9; ambos de origen hospitalario. Como se puede observar, nuevamente CTX-M-1, es parte de las enzimas encontradas en los 7 aislamientos portadoras de tres enzimas.

La tabla 11 ilustra muestra las enzimas detectadas y su lugar de adquisición.

Tabla 11. Tipos de enzimas encontradas en *E. coli* y origen de adquisición

| TIPOS DE ENZIMAS EN <i>E. coli</i> | | | ADQUISICIÓN | | |
|------------------------------------|-----|------|-------------|-----------|-------------|
| Enzimas | N | % | INP | Extra-INP | Comunitario |
| CTX-M-1 | 131 | 68.5 | 102 | 4 | 25 |
| TEM | 3 | 1.5 | 3 | 0 | 0 |
| SHV | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| CTX-M-9 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| TEM+CTX-M-1 | 38 | 20 | 28 | 0 | 10 |
| TEM+CTX-M-2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| TEM+CTX-M-9 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SHV+CTX-M-1 | 4 | 2 | 3 | 0 | 1 |
| CTX-M-1+CTX-M-9 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| TEM+SHV+CTX-M-1 | 5 | 2.5 | 4 | 1 | 0 |
| TEM+CTX-M-1+CTX-M-9 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 |

La tabla 12 relaciona el tipo de enzima con el sitio de aislamiento y lugar de adquisición

Tabla 12. Tipo de enzima, aislamiento y origen de adquisición de *E. coli*

| ENZIMA (N) | MUESTRA | ORIGEN | | |
|---------------------------------|-----------------------|--------|-----------|-------------|
| | | INP | EXTRA INP | COMUNITARIA |
| TEM (3) | Orina | 1 | 0 | 0 |
| | Sangre | 1 | 0 | 0 |
| | Aspirado bronquial | 1 | 0 | 0 |
| SHV (2) | Sangre | 2 | 0 | 0 |
| CTX-M-1 (131) | Orina | 47 | 1 | 19 |
| | Aspirado bronquial | 19 | 0 | 2 |
| | Sangre | 14 | 0 | 1 |
| | Secreción | 12 | 2 | 1 |
| | LCR | 4 | 0 | 0 |
| | Aspirado nasofaríngeo | 1 | 0 | 1 |
| | Absceso | 1 | 1 | 0 |
| | Biopsia pulmonar | 1 | 0 | 0 |
| | Exudado ocular | 1 | 0 | 0 |
| | Exudado vaginal | 1 | 0 | 1 |
| | Líquido peritoneal | 1 | 0 | 0 |
| CTX-M-9 (2) | Secreción | 1 | 0 | 0 |
| | Orina | 0 | 0 | 1 |
| TEM+CTX-M-1 (38) | Orina | 13 | 0 | 9 |
| | Aspirado bronquial | 4 | 0 | 0 |
| | Secreción | 4 | 0 | 0 |
| | LCR | 2 | 0 | 0 |
| | Punta de catéter | 2 | 0 | 0 |
| | Sangre | 1 | 0 | 0 |
| | Exudado vaginal | 1 | 0 | 1 |
| | Líquido pleural | 1 | 0 | 0 |
| TEM + CTX-M-2 (1) | Punta de catéter | 1 | 0 | 0 |
| SHV + CTX-M-1 (4) | Aspirado bronquial | 1 | 0 | 0 |
| | Orina | 1 | 0 | 0 |
| | Secreción | 1 | 0 | 0 |
| | Aspirado Nasofaríngeo | 0 | 0 | 1 |
| TEM + CTX-M-9 (1) | Sangre | 1 | 0 | 0 |
| CTX-M-1+CTX-M-9 (1) | Aspirado Bronquial | 1 | 0 | 0 |
| TEM+SHV+CTX-M-1 (5) | Aspirado Bronquial | 3 | 0 | 0 |
| | Orina | 1 | 1 | 0 |
| TEM+CTX-M-1+ CTX-M-9 (2) | Sangre | 1 | 0 | 0 |
| | Secreción | 1 | 0 | 0 |

La muestra de donde más aislamientos hubo, tanto de una como de dos enzimas es la de orina, siendo la mayoría de origen hospitalario y con la presencia, como ya se había anotado, de la enzima CTX-M-1. A las muestras de orina de origen hospitalario, le siguen aquellas adquiridas en la comunidad. La mayoría de los aislamientos en sangre para una enzima se presentaron en muestras hospitalarias en el INP. Finalmente, los aislamientos de *E. coli* con tres enzimas se presentaron en primer lugar en aspirado bronquial, seguidos de orina, sangre y secreción. De los siete aislamientos de tres enzimas, 6 son hospitalarios.

La tabla 13 relaciona las enzimas aisladas por servicio. Se adiciona el número de aislamientos por enzima o combinaciones de enzima.

Tabla 13. Relación entre enzimas en *E. coli* y servicios

| SERVICIO | ENZIMA | NÚMERO DE AISLAMIENTOS |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Cardiología | CTX-M-1 | 2 |
| | TEM + CTX-M-1 | 2 |
| Cirugía | CTX-M-1 | 11 |
| | TEM + CTX-M-1 | 4 |
| Cirugía Oncológica | CTX-M-1 | 1 |
| Consulta Externa | CTX-M-1 | 5 |
| Endocrinología | CTX-M-1 | 1 |
| Gastroenterología | CTX-M-1 | 3 |
| | SHV | 1 |
| | TEM + CTX-M-1 | 1 |
| | TEM + SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Infectología | CTX-M-1 | 24 |
| | TEM + CTX-M-1 | 5 |
| | CTX-M-1 + CTX-M-9 | 1 |
| | TEM + CTX-M-1 + CTX-M-9 | 1 |
| Hematología | CTX-M-1 | 3 |
| | TEM + CTX-M-9 | 1 |
| Inmunología | TEM + CTX-M-1 | 7 |
| | CTX-M-1 | 3 |
| | TEM + CTX-M-2 | 1 |
| Medicina Interna | CTX-M-1 | 1 |
| Nefrología | CTX-M-1 | 4 |
| | TEM + CTX-M-1 | 2 |
| | TEM | 1 |
| | TEM + CTX-M-1 + CTX-M-9 | 1 |
| Neonatología | CTX-M-1 | 6 |
| | SHV | 2 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Neumología | CTX-M-1 | 6 |
| | TEM + CTX-M-1 | 2 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Neurocirugía | CTX-M-1 | 4 |
| Neurología | CTX-M-1 | 3 |
| Oftalmología | CTX-M-1 | 1 |
| Oncología | CTX-M-1 | 6 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Ortopedia | CTX-M-1 | 1 |
| Pre-hospitalización | CTX-M-1 | 18 |
| | TEM + CTX-M-1 | 12 |
| | CTX-M-9 | 2 |
| Terapia Intensiva | CTX-M-1 | 11 |
| | TEM | 3 |
| | TEM + CTX-M-1 | 2 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Terapia Cardiovascular | CTX-M-1 | 4 |
| | TEM + SHV + CTX-M-1 | 3 |
| Urgencias | CTX-M-1 | 9 |
| | TEM + CTX-M-1 | 3 |
| | TEM | 1 |
| | TEM + SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Urología | CTX-M-1 | 4 |
| | TEM + CTX-M-1 | 4 |

II. *Klebsiella pneumoniae*

Análisis de datos epidemiológicos y clínicos

En el caso de *K. pneumoniae* se incluyeron 84 aislamientos no repetitivos para el mismo número de pacientes. De estos, 46 correspondían a pacientes de sexo femenino (55%) y 38 al sexo masculino (45%). La distribución por sexo se resume en la Tabla 14.

Tabla 14. Distribución de pacientes con infección por *K. pneumoniae* de acuerdo a su sexo

| Sexo | Número de pacientes | Porcentaje (%) |
|------------------|----------------------------|-----------------------|
| Masculino | 38 | 45 |
| Femenino | 46 | 55 |

La mediana de edad fue 1 año, con un rango de edad que oscilaba entre 3 días a 18 años. La distribución por grupos de edad se resume en la Tabla 15.

Tabla 15. Distribución de pacientes de acuerdo a grupos de edad con infección por *K. pneumoniae*

| Grupo de edades | Número de pacientes | Porcentaje (%) |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 0 a 1 mes | 11 pacientes | 13 |
| >1 mes a 1 año | 35 pacientes | 42 |
| >1 a 5 años | 16 pacientes | 19 |
| >5 a 12 años | 14 pacientes | 17 |
| >12 a 18 años | 8 pacientes | 9 |

De los 84 aislamientos de *K. pneumoniae*, 75 aislamientos fueron clasificados como adquiridos nosocomialmente en el INP (89%), 5 aislamientos Extra-INP (6%) y 4 comunitarios (5%). Las definiciones de nosocomial o asociado al cuidado de la salud, extrahospitalario y comunitario son las mismas mencionadas para el caso de *E. coli*. La tabla 16 resume la distribución del origen de adquisición.

Tabla 16. Distribución de pacientes de acuerdo al origen de adquisición de infecciones por *K. pneumoniae*

| Lugar | Número | Porcentaje (%) |
|--------------------|--------|----------------|
| INP | 75 | 89 |
| Comunitario | 4 | 5 |
| Extra-INP | 5 | 6 |

Se clasificó el origen de la muestra del cual se obtuvo el aislamiento (orina, sangre, Líquido cefalorraquídeo (LCR), entre otros). La tabla 17 muestra el número absoluto y el porcentaje de cada una de ellas, siendo las muestras de sangre el principal sitio de aislamiento para este germen.

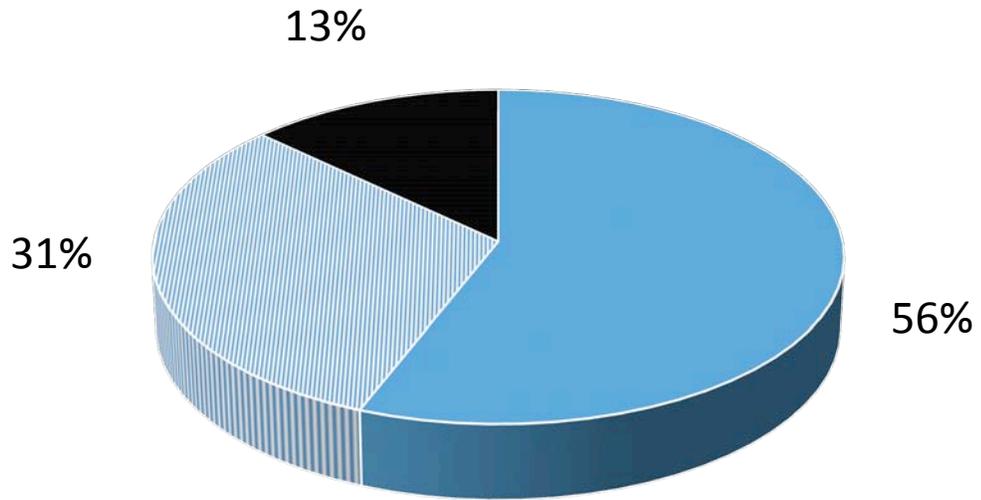
Tabla 17. Sitios de aislamientos de *K. pneumoniae*

| Sitio | Número | Porcentaje (%) |
|--------------------------------|--------|----------------|
| Sangre | 25 | 30 |
| Orina | 22 | 26 |
| Aspirado bronquial | 13 | 15 |
| Secreción de herida | 11 | 13 |
| Punta de catéter | 6 | 7 |
| Aspirado nasofaríngeo | 2 | 2 |
| Exudado vaginal | 1 | 1 |
| Herida quirúrgica | 1 | 1 |
| Líquido cefalorraquídeo | 1 | 1 |
| Líquido pleural | 1 | 1 |
| Absceso | 1 | 1 |

También se hizo una clasificación de los servicios / departamentos en donde el paciente se encontraba hospitalizado y donde fueron tomados los cultivos correspondientes. Se organizaron como servicios médicos, quirúrgicos y unidades de cuidado crítico. No se reportaron aislamientos en pacientes provenientes de servicios ambulatorios (Gráfica 2).

Similar a lo que se encontró con *E. coli*, los servicios médicos ocupan el mayor porcentaje de aislamiento siendo Infectología el departamento en donde más hubo más casos reportados (25%). Le sigue en frecuencia las unidades de cuidado crítico siendo neonatología (10%) y la terapia intensiva (10%) los servicios con mayores casos; finalmente los servicios quirúrgicos, siendo Cirugía el servicio con la mayoría de casos (10%). En la tabla 18 se muestran la distribución de los servicios/departamentos en los que se presentaron dichas infecciones.

Gráfica 2. Distribución de áreas hospitalarias en las que se documentaron las infecciones por *K. pneumoniae*



■ Servicios médicos: 46 pacientes

▨ Unidades de cuidado crítico: 27 pacientes

■ Servicios quirúrgicos: 11 pacientes

Tabla 18. Servicios en los que fueron documentadas las infecciones por *K. pneumoniae*

| | Servicio | Número de pacientes | Porcentaje (%) |
|---|---------------------|----------------------------|-----------------------|
| Servicios Médicos N = 46 (56%) | Infectología | 21 | 25 |
| | Gastroenterología | 4 | 5 |
| | Neumología | 4 | 5 |
| | Cardiología | 3 | 4 |
| | Nefrología | 3 | 4 |
| | Neurología | 3 | 4 |
| | Oncología | 3 | 4 |
| | Pre-hospitalización | 2 | 2 |
| | Inmunología | 2 | 2 |
| | Medicina interna | 2 | 2 |
| Unidades de Cuidado Crítico N = 27 (31%) | Neonatología | 8 | 10 |
| | UTI | 8 | 10 |
| | Urgencias | 7 | 8 |
| | Terapia CV | 4 | 4 |
| Servicios Quirúrgicos N = 11 (13%) | Cirugía | 8 | 10 |
| | Neurocirugía | 2 | 2 |
| | Urología | 1 | 1 |

UTI: Unidad de Terapia Intensiva / Terapia CV: Unidad de Terapia Cardiovascular

Así mismo, se realizó una clasificación de los diferentes diagnósticos y se unificaron por tipo de infección (infección del tracto urinario, neumonías, bacteriemias, entre otros). Las bacteriemias e infecciones relacionadas ocuparon el primer lugar en los diagnósticos con el 30% de los casos. La segunda infección en frecuencia fueron las infecciones del tracto urinario (26%) y en tercer lugar las neumonías y sus diferentes presentaciones clínicas en un 20% (Tabla 19).

Tabla 19. Tipo de infecciones ocasionadas por *K. pneumoniae*

| Tipo de Infección | Diagnóstico | Número | Porcentaje (%) |
|---|------------------------------|---------------|-----------------------|
| Bacteriemia N = 25 (30%) | Sepsis | 15 | 60 |
| | Choque séptico | 8 | 32 |
| | Infección asociada a catéter | 2 | 8 |
| Infección del Tracto Urinario. N = 22 (26%) | Infección urinaria | 17 | 77 |
| | Infección urinaria/Sepsis | 5 | 23 |
| Neumonías N =17 (20%) | Neumonía | 10 | 59 |
| | Neumonía/sepsis | 4 | 26 |
| | Neumonía nosocomial | 1 | 11 |
| | Neumonía/choque séptico | 1 | 11 |
| | Derrame pleural | 1 | 11 |
| Infecciones de Piel y Tejidos Blandos N = 12 (14%) | Infección de herida | 7 | 59 |
| | Infección de herida/Sepsis | 2 | 17 |
| | Infección de úlcera | 1 | 8 |
| | Absceso | 1 | 8 |
| | Celulitis | 1 | 8 |
| Traqueoendobronquitis N =2 (2%) | Traqueoendobronquitis | 2 | 100 |
| Vulvovaginitis N = 1 (1%) | Vaginitis | 1 | 100 |
| Sepsis con Foco Abdominal. N = 1 (1%) | Sepsis de foco abdominal | 1 | 100 |
| Sistema Nervioso Central N = 1 (1%) | Ventriculitis | 1 | 100 |
| Endocarditis N = 1 (1%) | Endocarditis | 1 | 100 |
| Fiebre sin Foco N = 1 (1%) | Fiebre sin foco | 1 | 100 |

Análisis de las beta-lactamasas encontradas en *K. pneumoniae*

De los 84 aislamientos de *K. pneumoniae*, todos contaban con un patrón fenotípico de BLEE; en ninguno se encontró un patrón sugerente de resistencia a carbapenémicos. Se realizó el análisis genotípico de las mismas enzimas BLEE: TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 y CTX-M-8/25. De los 84 aislamientos, solamente 2 contenían una sola enzima beta-lactamasa (2%), siendo SHV y CTX-M-1 las únicas presentes. Ambas eran de origen hospitalario. Veintisiete aislamientos presentaron dos enzimas (32%) y de ellas, 25 contenían la enzima CTX-M-1; 14 de ellas en combinación con TEM y 11 con SHV. De los 25 aislamientos, 23 eran de origen hospitalario. Finalmente, 55 aislamientos presentaron la combinación de 3 enzimas (65%). De las cuales, la combinación TEM+SHV+CTX-M-1 representó el 100%. De estos, 55 aislamientos, 50 fueron hospitalarios (91%), mientras que 3 fueron extra-INP (5%), y este patrón fue encontrado en 2 aislamientos comunitarios (4%).

La tabla 20 resume los tipos de enzimas encontradas, así como los sitios de adquisición de *K. pneumoniae*.

Tabla 20. Tipos de enzimas encontradas en *K. pneumoniae* y origen de adquisición

| TIPOS DE ENZIMAS | | | ADQUISICIÓN | | |
|---------------------|----|----|-------------|-----------|-----------|
| Enzima | N | % | INP | Extra-INP | Comunidad |
| CTX-M-1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SHV | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| TEM + SHV | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| TEM + CTX-M-1 | 14 | 17 | 12 | 1 | 1 |
| SHV + CTX-M-1 | 11 | 13 | 9 | 2 | 0 |
| TEM + SHV + CTX-M-1 | 55 | 65 | 50 | 3 | 2 |

Al analizar los sitios de aislamientos de *K. pneumoniae*, se encontró que el aspirado bronquial, la punta de catéter y las secreciones de herida, son los sitios de aislamientos más frecuentes con una sola enzima, siendo todos ellos de origen hospitalario.

La orina, sangre y punta de catéter, son los sitios de aislamiento más frecuentes con 2 enzimas y que en conjunto suman 17 aislamientos hospitalarios. Los sitios de aislamiento más frecuentes en el caso de las 3 enzimas fueron encontrados en sangre, aspirado bronquial y orina. Casi en su totalidad, con excepción de dos muestras de orina, el origen de los aislamientos era hospitalario. La tabla 21 relaciona el tipo de enzima con el sitio de aislamiento, así como origen de adquisición.

Tabla 21. Tipo de enzima, aislamiento y origen de adquisición de *K. pneumoniae*

| ENZIMA | MUESTRA | ORIGEN | | |
|-----------------------------|-----------------------|--------|-----------|-------------|
| | | INP | EXTRA INP | COMUNITARIA |
| SHV (1) | Secreción de herida | 1 | 0 | 0 |
| CTX-M-1 (1) | Aspirado Bronquial | 1 | 0 | 0 |
| TEM + SHV (2) | Punta de catéter | 1 | 0 | 0 |
| | Aspirado Bronquial | 1 | 0 | 0 |
| TEM + CTX-M-1 (14) | Orina | 5 | 0 | 1 |
| | Sangre | 4 | 0 | 0 |
| | Punta de Catéter | 1 | 0 | 0 |
| | Aspirado Nasofaríngeo | 1 | 0 | 0 |
| | Secreción de Herida | 1 | 1 | 0 |
| SHV + CTX-M-1 (11) | Orina | 3 | 0 | 0 |
| | Punta de catéter | 2 | 0 | 0 |
| | Secreción de Herida | 1 | 0 | 0 |
| | Aspirado bronquial | 1 | 0 | 0 |
| | Sangre | 1 | 2 | 0 |
| | Líquido Pleural | 1 | 0 | 0 |
| TEM+SHV+CTX-M-1 (55) | Sangre | 18 | 0 | 0 |
| | Aspirado Bronquial | 10 | 0 | 0 |
| | Orina | 9 | 2 | 2 |
| | Secreción de Herida | 6 | 0 | 1 |
| | Puntas de catéter | 2 | 0 | 0 |
| | Absceso | 1 | 0 | 0 |
| | Aspirado Nasofaríngeo | 1 | 0 | 0 |
| | Exudado Vaginal | 1 | 0 | 0 |
| | Herida Quirúrgica | 1 | 0 | 0 |
| | LCR | 1 | 0 | 0 |

La tabla 22 relaciona las enzimas aisladas por servicio. Se adiciona el número de aislamientos por enzima o combinaciones de enzima.

Tabla 22. Relación entre el servicio y tipo de enzimas en *K. pneumoniae*

| SERVICIO | ENZIMAS | NUMERO DE AISLAMIENTOS |
|------------------------|---------------------|------------------------|
| Cardiología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 2 |
| | CTX-M-1 | 1 |
| Cirugía | TEM + SHV + CTX-M-1 | 6 |
| | TEM + SHV | 1 |
| Gastroenterología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 2 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| | TEM + CTX-M-1 | 1 |
| Infectología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 12 |
| | TEM + CTX-M-1 | 5 |
| | SHV + CTX-M-1 | 3 |
| | SHV | 1 |
| Inmunología | TEM + CTX-M-1 | 2 |
| Medicina interna | TEM + SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Nefrología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 2 |
| | TEM + CTX-M-1 | 1 |
| Neonatología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 7 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Neumología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 3 |
| | TEM + CTX-M-1 | 1 |
| Neurocirugía | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| | TEM + SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Neurología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 3 |
| Oncología | TEM + SHV + CTX-M-1 | 3 |
| Pre-hospitalización | TEM + CTX-M-1 | 1 |
| | TEM + SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Terapia intensiva | TEM + SHV + CTX-M-1 | 7 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| Terapia cardiovascular | SHV + CTX-M-1 | 2 |
| | TEM + SHV + CTX-M-1 | 2 |
| Urgencias | TEM + SHV + CTX-M-1 | 3 |
| | TEM + CTX-M-1 | 2 |
| | SHV + CTX-M-1 | 1 |
| | TEM + SHV | 1 |
| Urología | SHV + CTX-M-1 | 1 |

14. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Escherichia coli

De los 190 aislamientos, presentados, el 58% correspondieron a pacientes de sexo femenino. La mayoría de los pacientes se encontraban en un rango de edad que oscilaba entre el mes de edad y los 12 años (148 en total). Se repartieron de forma prácticamente igual en tres grupos etarios que comprendía a los mayores de un mes y el año de edad, los mayores de un año hasta los 5 años y los mayores de 5 hasta los 12 años. Hubo menos casos en menores de un mes y mayores de 12 años.

Los aislamientos de origen hospitalario (INP) aportaron el 78% de los mismos, seguido de los comunitarios con el 19% y por último los extrahospitalarios (3%). Los cuatro primeros sitios de aislamiento fueron: orina (94 aislamientos), aspirado bronquial (31 aislamientos), secreción (22 aislamientos) y sangre (21 aislamientos). Siendo la orina el principal sitio de aislamiento del germen, fueron las infecciones del tracto urinario (cistitis, pielonefritis, asociadas a sepsis y choque séptico) las que predominaron como diagnóstico de los pacientes.

Hubo más aislamientos reportados en los servicios médicos, siendo la pre-hospitalización e Infectología los departamentos con mayor número de reportes. La explicación puede obedecer a la cantidad de pacientes que ingresan al instituto por motivos infecciosos y que además lo hacen a través del servicio de pre-hospitalización, en muchos de ellos diagnosticándose infecciones del tracto urinario y siendo tratados con antibióticos en estos mismos servicios. Los siguientes servicios donde hubo aislamientos fueron las unidades de cuidado crítico y las quirúrgicas, siendo la terapia intensiva y cirugía los más afectados. Esto se debe posiblemente a la complejidad de los casos atendidos en el hospital y que son tratados en los mencionados servicios donde además se utiliza una importante cantidad de antibióticos de amplio espectro.

Respecto a la identificación de beta-lactamasas, el lugar de adquisición y sitio de aislamiento se puede concluir que la mayoría de los aislamientos tuvieron una sola enzima (138 aislamientos que corresponde a 73% del total).

La enzima más frecuente fue CTX-M-1, con 131 aislamientos; de dichos aislamientos, 102 (78%) correspondían a muestras de adquisición hospitalaria (INP), 25 comunitarias (19%) y 4 de forma extra hospitalaria (extra-INP: 3%). Los dos primeros sitios de aislamiento de esta enzima fueron orina (51%), seguido de aspirado bronquial (16%).

De los 67 aislamientos de orina, 47 de ellos (70%) correspondían a muestras adquiridas en INP, seguido de 19 muestras comunitarias (28.5%) y una muestra fue extra-INP (1.5%). De los 21 aislamientos en aspirado bronquial, 19 de ellos (91%) correspondían a muestras adquiridas en INP y 2 fueron de adquisición comunitaria (9%).

Los otros 7 aislamientos con una sola enzima, se repartieron entre las enzimas TEM, SHV y CTX-M-9 de forma similar. Le sigue en frecuencia los aislamientos de dos enzimas (45 de los 190 que corresponde a 24%), siendo la combinación TEM + CTX-M-1, la que más casos tuvo con 38 de ellos.

El principal sitio de aislamiento fue de nuevo la orina con 22 aislamientos, siendo 13 adquiridos en INP (59%) y 9 comunitarios (41%). Por último, las combinaciones con 3 enzimas se documentaron en 7 aislamientos (3%), siendo la combinación TEM+SHV+CTX-M-1 la que más aportó con 5 aislamientos, 3 de ellos fueron encontrados en aspirado bronquial, siendo todos de adquisición intrahospitalaria en el INP.

En relación al servicio y enzimas aisladas, se puede observar que en todos los servicios hubo presencia de la enzima CTX-M-1, en algunos de ellos como enzima única y en otros combinada con una o dos enzimas más. El mayor número de casos por servicios lo aportó dicha enzima sin combinación alguna, con excepción del servicio de Inmunología. Los servicios de Infectología, Oncología, Neonatología, Terapia intensiva, Cirugía, Neumología, Pre hospitalización y Urgencias fueron los más afectados.

La mayoría de los estudios de identificación genotípica y fenotípica de beta-lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *E. coli*, han demostrado la alta prevalencia del gen que codifica para la enzima CTX-M-1. Se puede concluir que la enzima CTX-M-1 es endémica a nivel hospitalario.

Klebsiella pneumoniae

En el caso de *K. pneumoniae*, 84 aislamientos fueron incluidos, 46 de los que correspondían a pacientes de sexo femenino (55%). La distribución por edades de los pacientes fue menos uniforme, siendo el mayor número de aislamientos en pacientes con edades entre el mes y el primer año de vida (35 de los 84 aislamientos). El menor número de casos se documentó en mayores de 12 años.

La distribución por origen de adquisición es liderada por los hospitalarios con 75 aislamientos (89%), seguido de 5 extra-hospitalarios (6%) y finalmente los comunitarios con 4 aislamientos (5%). Los primeros sitios de aislamiento fueron: sangre (25 aislamientos), orina (22 aislamientos), aspirado bronquial (13 aislamientos) y secreción de herida (11 aislamientos).

Los servicios médicos, en particular el departamento de Infectología es en el que más casos se presentaron; le siguen las unidades de cuidados críticos siendo Terapia Intensiva, Neonatología y Urgencias los que más casos aportaron y finalmente los servicios quirúrgicos, siendo de nuevo cirugía el que más casos tuvo.

En este estudio la sangre representó el principal sitio de aislamiento más frecuente de *K. pneumoniae*, de manera que son las bacteriemias y cuadros relacionados (sepsis y choque séptico) el principal diagnóstico de los pacientes que ingresaron al estudio, le sigue en frecuencia los aislamientos en orina e infección urinaria.

Con respecto a la identificación de beta-lactamasas, el origen de adquisición y sitio de aislamiento se puede afirmar que a diferencia de lo encontrado con *E. coli*, para los aislamientos de *K. pneumoniae*, la mayoría de los aislamientos contaban con tres enzimas, seguido de aquellos aislamientos con dos enzimas y en último lugar los que contaban con una sola enzima.

De los 84 aislamientos, 55 tuvieron tres enzimas, siendo la combinación de TEM+SHV+CTX-M-1 la que aportó todos los casos (65% del total). Cincuenta aislamientos eran hospitalarios (91%), 3 extra hospitalarios (5%) y dos comunitarios (4%).

De estos 55 aislamientos, los 3 principales sitios de aislamiento fueron: sangre (18 aislamientos, todos de adquisición hospitalaria), orina (13 aislamientos siendo 9 hospitalarios, 2 Extra hospitalarios y 2 comunitarios) y aspirado bronquial (10 aislamientos, todos hospitalarios).

Los aislamientos con dos enzimas fueron 27 de los 84 aislamientos totales (32%) y al igual que en *E. coli*, la combinación TEM+CTX-M-1 fue la que más casos aportó con 14 aislamientos (32%). El sitio con mayor número de aislamientos con dos enzimas fue la orina con 6 aislamientos; cinco de ellos de adquisición hospitalaria (83%) y 1 comunitario (17%). Le sigue la sangre con 4 aislamientos (todos hospitalarios).

El último lugar lo ocupa los aislamientos con una sola enzima (SHV y CTX-M-1), cada uno con un aislamiento, siendo ambos hospitalarios.

En relación al servicio y enzimas encontradas, se puede observar que de igual forma con *E. coli*, la enzima CTX-M-1 se encuentra presente en todos los servicios donde hubo aislamiento de *K. pneumoniae*, pero a diferencia del germen anterior, la enzima aporta el mayor número de casos estando combinada con una o dos enzimas más. Los servicios donde más aislamientos hubo fueron Infectología, Neonatología, Cirugía y Terapia intensiva. Solamente los servicios de Inmunología y Urología, no contaron de acuerdo a este estudio, con aislamientos de 3 enzimas. En el resto de los servicios si fue encontrada.

15. DISCUSIÓN

Las enterobacterias representan un grupo de patógenos de primordial importancia tanto a nivel hospitalario como a nivel comunitario. *E. coli* y *K. pneumoniae* representan prácticamente el 90% de los aislamientos de la familia *Enterobacteriaceae*. En el INP, después de los *Staphylococcus* coagulasa negativos, son los aislamientos más frecuentes. En este estudio se pudieron recolectar 274 aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* con patrón BLEE; de éstos aislamientos 190 correspondieron a *E. coli* (69%) y 84 de *K. pneumoniae* (31%), por lo que representa una relación 3:1, que es lo que reporta la literatura con relaciones de 2:1 y 3:1 en los diversos centros hospitalarios³⁰. En relación al género, se encontró que el sexo femenino predominó tanto para *E. coli* y *K. pneumoniae*, esto fenómeno puede explicarse ya que una gran proporción de aislamientos fueron en orina, particularmente *E. coli* (el 49% de los aislamientos) y 26% de *K. pneumoniae*, sabiendo que estas infecciones de vías urinarias (IVU) predominan en mujeres. En relación al grupo de edad para la adquisición de estas infecciones es de hacer notar que las infecciones por *K. pneumoniae* fue significativamente en pacientes menores de edad, con una mediana de un año, a comparación de los pacientes con *E. coli* cuya mediana de edad fue de 4 años, siendo esto estadísticamente significativo, este fenómeno puede ser explicado debido a que *K. pneumoniae* predominantemente de origen nosocomial en servicios como infectología (25%) donde predominan pacientes lactantes, y en neonatología (10%) donde se encuentran hospitalizados recién nacidos.

Para conocer si la dichas enterobacterias fueron adquiridas intrahospitalariamente o a nivel comunitario, se buscó su origen de adquisición, encontrándose que *E. coli* fue adquirida hospitalariamente en el 78%, mientras que para *K. pneumoniae* fue en un 89%; cabe resaltar que *E. coli* tuvo hasta un 19% de adquisición comunitaria, mientras que *K. pneumoniae* sólo fue un 6%. Esto se debe a que *E. coli* se obtuvo con mayor frecuencia en IVU, muchas de ellas siendo de adquisición comunitaria, siendo esta infección la más frecuente de adquisición comunitaria con aislamientos de enterobacterias, además de ser la pre-hospitalización e infectología los servicios de presentación más frecuente, con un 17% y 16% respectivamente. Por su parte *K. pneumoniae* es predominantemente adquirida a nivel hospitalario, pudiéndose apreciar este fenómeno con un mayor número de bacteriemias (30% de los aislamientos) siendo los servicios de cuidados críticos el 31% de los servicios donde se aisló dicho patógeno.

Tanto para *E. coli* como *K. pneumoniae*, las 4 principales infecciones ocasionadas fueron IVU, neumonía, infección de heridas, y bacteriemias; solamente que en un orden de frecuencia diferente, para *E. coli*: 1. IVU (50%), 2. Neumonía (19%), 3. Infección de herida (10%), 4. Bacteriemia (13%), representando todas ellas el 88% de infecciones por *E. coli*. Para *K. pneumoniae*: 1. Bacteriemia (30%), 2. IVU (26%), 3. Neumonía (20%), 4. Infección de herida (13%), representando todas ellas el 84% de infecciones por *K. pneumoniae*. Como podemos ver las neumonías y las infecciones de herida representan un porcentaje similar, siendo las IVU y las bacteriemias en donde tienen mayor diferencia.

Cuando se analizaron los patrones de beta-lactamasas que presentaban los diferentes aislamientos, se encontró que hubo una buena correlación entre el patrón fenotípico sugerente de BLEE y la detección molecular de diferentes beta-lactamasas. Es importante mencionar que en esta primera fase del estudio, sólo se detectaron algunos de los principales grupos de beta-lactamasas tipo BLEE, sin llegar a identificar el subtipo enzimático, el cual se identificará en el total de los aislamientos a través de secuenciación, por lo que en este estudio no se puede sacar conclusiones de la distribución y la epidemiología de los diferentes subtipos de enzimas, pero sí al menos tener una aproximación epidemiológica basal para los diversos grupos de beta-lactamasas buscados.

Un aspecto que es de vital importancia resaltar es que en el caso de *E. coli* predominó la portación de CTX-M-1 en 94% todos los aislamientos, ya sea en forma aislada o combinada con otras enzimas. El 77% de estos aislamientos fueron de origen nosocomial, lo que indica que este patrón es endógeno y está plenamente diseminado en el INP, sin tener una distribución particular en algún servicio. Mientras que el 20% fue de origen comunitario, particularmente en aislamientos urinarios. Aunque no se tiene el subtipo enzimático es muy probable que esta CTX-M-1 corresponda a CTX-M-15 que originalmente fue descrita a nivel comunitaria en aislamientos urinarios en *E. coli*, y que seguramente se introdujo hace más de una década en el hospital, diseminándose ampliamente, quedando como un tipo de BLEE predominante como está descrito en numerosos estudios²⁰. De manera similar los aislamientos de *E. coli* con este patrón de resistencia con CTX-M-1 fue identificado en el 3% restante adquiridos de forma extra-INP.

En aquellos aislamientos de *E. coli* con la presencia de CTX-M-1 se reportó de forma aislada en el 73%, en un 24% en combinación de una segunda enzima y en un 3% con la combinación de 2 enzimas adicionales.

El segundo patrón enzimático más frecuente después de la CTX-M-1 en forma aislada fue la combinación de CTX-M-1+TEM, representando el 20% del total de los aislamientos. Aunque el 74% de esta combinación fue encontrada a nivel nosocomial, el 16% restante procedía de la comunidad, aspecto que resalta importancia ya que a nivel comunitario empiezan a aparecer aislamientos también con combinación enzimática, de ahí que la infección más frecuente con este patrón fue la IVU y el servicio con mayor número de aislamientos fue sido la pre-hospitalización. El segundo servicio con mayor número de aislamientos con este patrón fue inmunología con 9 aislamientos, lo cual podría sugerir una diseminación en ese servicio.

De los patrones con combinación de 3 enzimas es de particular relevancia la detección de CTX-M-9 en 6 aislamientos de *E. coli* (que corresponde al grupo donde pertenecen CTX-

M-9 o CTX-M-14). La distribución de CTX-M-9 fue en forma aislada en 2 aislamientos detectados en la pre-hospitalización, 1 de adquisición hospitalaria y otro de adquisición comunitaria en orina; de tratarse de CTX-M-14 es una enzima bien documentada a nivel comunitario principalmente en aislamientos urinarios. De tratarse de CTX-M-9, sería el primer reporte de esta enzima en México. Los restantes 4 aislamientos fueron de adquisición nosocomial, 2 de ellos con combinación con una enzima adicional (CTX-M-9+TEM), aislada de aspirado bronquial en un paciente de infectología, mientras que otro paciente en hematología lo presentó en sangre con la combinación de CTX-M-1+CTX-M-9. Lo últimos 2 aislamientos con CTX-M-9 se presentaron de forma combinada con 2 enzimas adicionales, ambos aislamientos con CTX-M-1+CTX-M-9+TEM, tratándose de una bacteriemia en infectología y otra infección de herida en un paciente del servicio de nefrología.

Un segundo patrón con combinación de 3 enzimas fue encontrado en 5 aislamientos de *E. coli*, portando las enzimas CTX-M-1+TEM+SHV, todas ellas fueron de adquisición nosocomial, 2 en orina (urgencias y gastroenterología); además resalta que los 3 aislamientos restantes fueron en el servicio de Terapia cardiovascular, ocasionando neumonía en 3 diferentes pacientes y en un periodo de tiempo específico (5-13 febrero, 2013), que correlaciona con un brote por esta clona de *E. coli*, que si bien por el momento no contamos con el patrón clonal por PFGE, confirmamos que es la misma clona dado el patrón de resistencia con 3 enzimas.

Un estudio realizado en Bangladesh²¹, en el que se recolectaron 40 aislamientos de *E. coli* en muestras de orina y secreciones varias durante 4 años (2003-2007) tenían fenotipo BLEE y genotípicamente se demostró que todos tenían la enzima CTXM-1 (100%), seguidos de TEM (82%) y por último OXA-1 (47%). Ante la presencia de porcentajes tan altos, se concluye que muchos estos aislamientos, contenían al menos 2 enzimas de forma simultánea. Como parte del estudio se documentó que un aislamiento contenía además genes de resistencia para fluoroquinolonas. Por la baja frecuencia en nuestro país no se buscó intencionada patrones de resistencia por enzimas tipo OXA.

Con respecto a los 84 aislamientos de *K. pneumoniae*, se observó un fenómeno contrario a *E. coli*, ya que la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae* predominaron los patrones combinados, siendo con 3 enzimas el 66%, 2 enzimas el 32%, y tan sólo un 2% con una enzima. Así, podemos afirmar que el 98% de los aislamientos de *K. pneumoniae* presentan un patrón de enzimático combinado, asociado esto a lo ya comentado en relación a que la gran mayoría de aislamientos son de origen nosocomial, lo que sugiere la importante transmisión horizontal de genes de resistencia. De los 55 aislamientos de *K. pneumoniae* con 3 enzimas el 100% fue la combinación de TEM+SHV+CTX-M-1, y de ellos el 91% fue de adquisición hospitalaria, 5% extra-INP y sólo el 4% de origen comunitario. Llama la atención este último patrón en 2 aislamientos adquiridos a nivel comunitario, ambos obtenidos de orina. A nivel hospitalario se encontró prácticamente en todos los diferentes servicios del hospital, aunque predominó en infectología (12), terapia intensiva y neumología con 7 aislamientos cada uno. La bacteriemia fue la infección con el mayor número de aislamientos con este patrón combinado, con un 33%, seguido de neumonía en un 20% y la infección de vías urinarias en 16%.

En los aislamientos de *K. pneumoniae* con 2 enzimas, predominó el patrón de TEM+CTX-M-1 en un 52% (17% de todos los aislamientos), mientras que SHV+CTX-M-1 representó

el 40% (13% de todos los aislamientos) y TEM+SHV con 2 aislamientos (7% de 2 combinaciones y 2% de los 84 aislamientos). De este grupo de combinación con 2 enzimas, solamente 1 aislamiento, correspondiente a la combinación TEM+CTX-M-1, fue de adquisición comunitaria, encontrándose en orina; esto demuestra nuevamente que a nivel comunitario comienzan a aparecer clonas portadoras de 2 enzimas.

Finalmente, a diferencia de lo que ocurre con *E. coli*, en la cual el 73% presenta aislamientos con una sola enzima, en *K. pneumoniae* solo se encontraron 2 aislamientos, uno con CTX-M-1 causando neumonía y otro con SHV originando una infección de herida quirúrgica, ambos de adquisición nosocomial. Similar a lo que ocurre con *E. coli*, podemos afirmar que en *K. pneumoniae* el grupo de enzimas predominantes fue CTX-M-1 en un 97%, aunque en *K. pneumoniae* predomina en forma combinada con una o dos enzimas adicionales.

En el caso de *K. pneumoniae*, no se encontró el patrón de CTX-M-9 como sucedió en 6 de los aislamientos de *E. coli*. En ninguno de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* se detectaron enzimas del grupo CTX-M-8/25, que detectan CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39, CTX-M-40 y CTX-M-41. Aunque no se buscó en forma intencionada con pruebas moleculares, ninguno de los aislamientos presentó un patrón fenotípico sugerente de resistencia a carbapenemasas. En la actualidad, entre 5-10% de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* en los diversos hospitales pueden contener carbapenemasas²², situación no encontrado en nuestro estudio.

Para poner nuestros resultados en contexto, comentamos un estudio realizado en pacientes pediátricos en Tailandia²³, en el que comenta que desde la descripción de las primeras enzimas beta-lactamasas detectadas en Alemania en 1983 (SHV-2), se ha visto la diseminación de diferentes tipos de beta-lactamasas en todo el mundo debido a la mutación y cambios en secuencias de aminoácidos que les ha otorgado capacidad de mayor hidrólisis a más antibióticos. Las primeras descripciones de la enzima CTX-M, se hicieron en 1992 después de observar que observar una serie de enzimas No-TEM, No-SHV, que hidrolizaban con rapidez a la cefotaxima y menos a la ceftazidima. Este estudio determinó los genotipos de BLEE en 235 aislamientos de *E. coli* y 127 aislamientos de *K. pneumoniae*, en muestras de orina, sangre, esputo y secreciones; fue realizado con muestras de dos hospitales generales que contaban con servicios de medicina, UTI, cirugía y pediatría general. Para ambos gérmenes, se observó más aislamientos en muestras de pacientes de sexo femenino, similar a lo detectado en el presente estudio. Todos los servicios tuvieron aislamientos de forma similar para ambos gérmenes, predominando en el servicio de medicina y de cirugía para el caso de *E. coli*, mientras que para *K. pneumoniae*, se sumó a los anteriores el servicio de UTI. Para ambos, hubo más aislamientos en muestras de orina, seguidos de las muestras de exudados y menos en sangre, aspecto que contrasta en nuestro estudio, donde *E. coli* fue efectivamente encontrada con más frecuencia en orina, sin embargo *K. pneumoniae* fue más frecuentemente encontrada en sangre.

En dicho estudio el análisis genotípico para *E. coli*, se encontró que con excepción de una muestra, todos contenían la enzima CTX-M, unos con CTX-M-14, otros con 15, 27, 40 y 55. Esta situación fue similar en nuestro estudio al demostrar que el 97% de los aislamientos de *E. coli* portan algún patrón CTX-M, ya sea en forma aislada o combinada.

La mayoría de los aislamientos de dos enzimas los aportó la combinación TEM-1+CTX-M-14, seguido de TEM-1+CTX-M-15, situación que contrastaremos cuando se tenga el subtipo de enzima una vez secuenciadas las distintas beta-lactamasas. A diferencia de nuestro estudio, en este reporte si se encontraron con aislamientos de 4 y hasta 5 enzimas, donde CTX-M y TEM estaban predominantemente involucradas.

En el análisis genotípico para *K. pneumoniae* y coincidiendo con nuestros hallazgos, se documentó que la mayoría de aislamientos tenían 3 enzimas de forma simultánea, siendo las más frecuentes las combinaciones TEM-1+SHV-12+CTX-M-14, TEM-1+SHV-12+CTX-M-15 y TEM-1+SHV-11+CTX-M-15. Le sigue los aislamientos de 2 enzimas y el último lugar lo comparte los aislamientos de una, 4 y 5 enzimas. Al igual que en *E. coli*, con excepción de una muestra, todas las demás contaban con la presencia de CTX-M.

El estudio destaca la alta prevalencia de CTX-M en ambos gérmenes, cuando en años previos (estudios de 1994), mostraban algunos aislamientos con SHV, pero ninguno con CTX-M, que como se comentó, originalmente fue descrita en aislamientos urinarios de *E. coli* de adquisición comunitaria. Estudios realizados entre 1999 y 2003, demostraron un aumento de 65% en aislamientos de CTX-M. Estudios recientes²⁴ demuestran que CTX – M es la beta-lactamasa más difundida en todo el mundo, siendo *bla*_{CTX-M-15} el genotipo dominante. La distribución de este y otros genotipos varía según el país donde se estudie. En Europa, principalmente en estudios realizados en Escandinavia y España, muestran que el 50 a 60% de los aislamientos de *E. coli* tienen el genotipo *bla*_{CTX-M-15}, seguido del *bla*_{CTX-M-14}, mientras que en Japón predomina los aislamientos del genotipo CTXM-9. En Suramérica, predominan los aislamientos de CTX-M-2 y CTX-M-8 (este último es raro en otras zonas geográficas del mundo).²⁵

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Paterson D, Bonomo R. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-686
2. Ambler R, Coulson A, Frère J, Ghuysen J, Joris B, Forsman M, Levesque R, Waley S. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991;276(Pt 1):269-270
3. Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976
4. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Caliskan A. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009;62(5):372-377
5. Tenover F, Arbeit R, Goering V, Mickelsen P, Murray B. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(6):426-439.
6. Tenover F, Arbeit R, Goering V, Mickelsen P, Murray B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(9):2233-2239.
7. Prelog M, Fille M, Prodinger W, Grif K, Brunner A, Würzner R, Zimmerhackl L. CTX-M-1-related extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli*: so far a sporadic event in Western Austria. *Infection.* 2008;36(4):362-367.
8. Owens R, Johnson J, Stogsdill P, Yarmun L, Lolans K, Quinn J. Community transmission in the United States of a CTX-M-15-producing sequence type ST131 *Escherichia coli* strain resulting in death. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(9):3406-3408.
9. Little M, Qin X, Zerr D, Weissman S. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2012;39(1):52-57.
10. Andrade L, Curiao T, Ferreira J, Longo J, Climaco E, Martinez R, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(7):3579-3583.

11. Nazik H, Öngen B, Mete B, Aydin S, Yemisen M, Kelesoglu F, Tabak F. Coexistence of blaOXA-48 and aac(6')-Ib-cr genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Istanbul, Turkey. *J. Int. Med. Res.* 2011;39(5):1932-1940.
12. Baker S, Hanage W, Holt K. Navigating the future of bacterial molecular epidemiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010;13(5):640-645.
13. Schwaber M, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* (2007) 60, 913–920
14. Maiden M. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006;60:561-588.
15. Rogers B, Sidjabat H, Paterson D. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(1):1-14.
16. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(7):524–534
17. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-2238
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards: January 2014.
19. Sambrook, R. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
20. Cantón R, González J, Galán J. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012 Apr 2;3:110
21. Taslima L, Khajanchi B, Ishrat A, Mohammad I, Mahmood B, Akter M, Alim R, et al. Phenotypic and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in Bangladesh. *PLoS ONE.* 2014;(9):e108735
22. Lepelletier D, Batard E, Berthelot P, Zahar J, Lucet J, Fournier S, Jarlier V, Grandbastien B. Maîtrise de la diffusion des entérobactéries productrices de carbapénémases: épidémiologie, stratégies de prévention et enjeux. *Rev Med Interne* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2014.12.006>. Accedido Marzo 22, 2015

23. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(8):2818-2824.
24. Cirkovic I, Pavlovic L, Konstantinovic N, Kostic K, Jovanovic S, Djukic S. Phenotypic detection of beta-lactamases production in *Enterobacteriaceae*. *Srp Arh Celok Lek*. 2014 Jul-Aug; 142(7-8):457-63.
25. Brolund A. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol*. 2014, 4:2455. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v4.24555>. Accedido Marzo 22, 2015

17. ANEXO 1.0. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

| Información Clínica / Epidemiológica | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----|------------|-------------|----------|----------------|--------------------------------|-------|----------------|------|-----|
| Nombre del paciente | | | | | | | | | Exp. | |
| Fecha de nacimiento dd/mm/aa | | | | | | Sexo | | | | |
| Fecha de Ingreso: dd/mm/aa | | | | | | Días de EIH al aislamiento: | | | | |
| Servicio | | | | | | | | | | |
| Fecha de aislamiento | | | | | | Sitio de aislamiento | | | | |
| Tipo de infección | | | Comunitaria | | Nosocomi al | | Dx: | | | |
| Tratamiento | | | | | | Antibiótico | | | | |
| Fecha de inicio dd/mm/aa | | | | | | Duración (días) | | | | |
| Información Microbiológica | | | | | | | | | | |
| Microorganismo aislado | | | | | | % Identificación | | | | |
| Perfil de susceptibilidad | | | | | | Detección Beta-lactamasas | | | | |
| Antibiótico | | CIM(µg/mL) | | | Interpretación | | BLEEs | AmpC | MBL | KPC |
| Ceftriaxone | | | | | | | | | | |
| Cefotaxime | | | | | | | | | | |
| Ceftazidima | | | | | | | | | | |
| Cefepime | | | | | | | | | | |
| Cefoxitina | | | | | | | | | | |
| Aztreonam | | | | | | | | | | |
| Meropenem | | | | | | | | | | |
| Imipenem | | | | | | | | | | |
| Ertapenem | | | | | | | | | | |
| Pip/TZB | | | | | | | | | | |
| Ciprofloxacina | | | | | | | | | | |
| PCR | | | | | | | | | | |
| Panel 1 | | Panel 2 | | Panel 3 | | Panel 4 | | Panel 5 | | |
| TEM-SHV | | CTX-M | | | | | | Carbapenemasas | | |
| Amplicón | P/A | Amplicón | P/A | Amplicón | P/A | Amplicón | P/A | Amplicón | P/A | |
| 800 | | 688 | | 326 | | 997 | | 139 | | |
| 713 | | 404 | | | | 538 | | 390 | | |
| | | 561 | | | | | | 538 | | |

18. ANEXO 2.0. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

| Actividad | Tiempo en meses | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | -4 | -3 | -2 | -1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Redacción de protocolo | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aprobación de protocolo | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Obtención de material y equipo | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Obtención y conservación de cepas | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | |
| Colección de información | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | |
| Determinación de perfiles de susceptibilidad | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | |
| Detección fenotípica de b-lactamasas | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | |
| Obtención de DNA | | | | | | | | | | | █ | █ | █ | | | | | | | | | |
| Estandarización de PCR | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | | | | | | | | | | | | |
| Amplificación de genes b-lactamasas | | | | | | | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | | | | |
| Análisis de resultados | | | | | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ | █ |
| Publicación de resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | █ | █ | █ | █ |

