



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

FRECUENCIA (%) DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  
PRODUCTORES DE  $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO AISLADOS DE HEMOCULTIVOS DE  
PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE  
PEDIATRÍA (INP)

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ABRAHAM CAMARENA SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESINA

Q.F.B. PATRICIA ARZATE BARBOSA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2017





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



---

## JURADO ASIGNADO

Presidente: Profesor. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

Vocal: Profesora. ROSALIA GUEVARA LEONEL

Secretario: Profesora. PATRICIA ARZATE BARBOSA

1 er. Suplente: Profesora. GABRIELA LÓPEZ HERRERA

2do. Suplente: Profesora. TANYA PLETT TORRES

### **Sitio en donde se desarrolló el tema:**

Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México

### **Asesor del tema**

\_\_\_\_\_

**Q.F.B. Patricia Arzate Barbosa**

### **Sustentante**

\_\_\_\_\_

**Abraham Camarena Sánchez**



## INDICE

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	5
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	5
<b>INDICE DE DIAGRAMA</b> .....	6
<b>INDICE DE GRAFICAS</b> .....	6
<b>ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS</b> .....	7
<b>1. DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	10
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	12
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	13
4.1 Objetivos generales.....	13
4.2 Objetivos particulares .....	13
<b>5. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE</b> .....	14
5.1 Epidemiología de las enterobacterias .....	15
5.2 Infecciones causadas por enterobacterias .....	15
5.3 Factores de virulencia de las enterobacterias .....	16
5.4 Enterobacterias de importancia clínica .....	18
5.5 Aislamiento de enterobacterias .....	18
<b>6. ENTEROBACTERIAS QUE PRODUCEN BLEEs</b> .....	19
6.1 <i>Escherichia coli</i> .....	20
6.1.1 Clasificación de patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	21
6.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	28
6.2.1 Mecanismo de patogenicidad de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29
6.3 <i>Proteus mirabilis</i> .....	29
6.3.1 Mecanismo de patogenicidad de <i>Proteus mirabilis</i> .....	30
<b>7. ANTIBIÓTICOS</b> .....	31
7.1 Generalidades .....	31
7.2 Clasificación por su composición química .....	32
7.3 Clasificación de antibióticos para bacilos Gram negativos.....	33
7.3.1 Aminoglucósidos .....	33
7.3.2 Quinolonas .....	33
7.3.3 Fenicoles .....	34
7.3.4 Sulfonamidas y Diaminopirimidinas .....	34
7.3.5 Polimixinas .....	34



7.3.6 Tetraciclinas .....	35
7.3.7 Betalactámicos .....	35
7.4 Antibióticos betalactámicos .....	39
7.4.1 Estructura química y clasificación de los betalactámicos .....	40
7.4.2 Penicilinas .....	43
7.4.3 Cefalosporinas .....	44
7.4.4 Cefalosporinas de Primera Generación.....	45
7.4.5 Cefalosporinas de Segunda Generación.....	46
7.4.6 Cefalosporinas de Tercera Generación.....	46
7.4.7 Cefalosporinas de Cuarta Generación .....	47
7.4.8 Cefalosporinas de Quinta Generación.....	47
7.4.9 Cefamicinas.....	48
7.4.10 Monobactámicos .....	49
7.4.11 Carbapenémicos .....	50
7.4.12 Inhibidores de las $\beta$ -lactamasas.....	52
7.5 Mecanismos de resistencia bacteriana .....	54
7.5.1 Mecanismo de resistencia en bacilos Gram negativos en antibióticos no betalactámicos. ....	56
7.5.2 Mecanismo de resistencia en bacilos Gram negativos en antibióticos betalactámicos. ....	57
7.5.3 $\beta$ -lactamasas.....	60
7.5.4 Clasificación de $\beta$ -lactamasas.....	62
7.5.5 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs).....	69
7.6 Tipos de BLEEs.....	69
7.6.1 TEM.....	69
7.6.2 SHV.....	70
7.6.3 CTX-M.....	70
7.6.4 OXA.....	71
7.6.5 PER.....	71
7.7 Resistencia múltiple a los antibióticos en bacilos Gram negativos.....	72
7.8 Epidemiología de las BLEEs .....	73
7.9 Factores de riesgo.....	76
7.10 Características genéticas de las BLEEs.....	77
<b>8. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE BLEEs.....</b>	<b>78</b>
8.1 Métodos fenotípicos para la detección de BLEEs .....	80
8.1.1 Sensibilidad bacteriana por difusión en agar.....	80
8.1.2 Prueba de combinación de disco .....	81



---

8.1.3 Prueba de sinergia de disco doble .....	82
8.1.4 Microdilución en caldo .....	83
8.1.5 Tiras E- test .....	83
8.1.6 Confirmación fenotípica de las BLEEs .....	85
8.2 Métodos complementarios para la detección de BLEEs .....	86
8.2.1 Métodos Genotípicos.....	86
8.3 Métodos cromogénicos para la detección de BLEEs .....	88
8.3.1 ChromID ESBLs .....	88
9. <b>METODOLOGÍA</b> .....	89
10. <b>RESULTADOS</b> .....	93
11. <b>DISCUSIÓN</b> .....	103
12. <b>CONCLUSIONES</b> .....	110
13. <b>ANEXO I</b> .....	112
14. <b>REFERENCIAS</b> .....	114



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de ExPEC ( <i>E. coli</i> Patogeno extraintestinal) .....	23
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de <i>E. coli</i> de tracto gastrointestinal .....	23
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los antibióticos por su estructura química .....	32
<b>Tabla 4.</b> Estructura química de los betalactámicos.....	41
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de los antibióticos betalactámicos .....	42
<b>Tabla 6.</b> Mecanismos de resistencia .....	56
<b>Tabla 7.</b> Correspondencia entre la clasificación de Ambler y Bush. ....	63
<b>Tabla 8.</b> Grupos funcionales de las $\beta$ -lactamasas basados en el esquema de Bush, Jacoby y Medeiros .....	68
<b>Tabla 9.</b> Componentes de los frascos de cultivo BACTEC Peds Plus/F® .....	112
<b>Tabla 10.</b> Pruebas bioquímicas que contiene el panel NMIC/ID-406 del sistema BD Phoenix100® para la identificación de Gram negativos.....	112
<b>Tabla 11.</b> Los diferentes antibióticos que contiene el panel NMIC/ID-406 del sistema BD Phoenix100® para la identificación de Gram negativos .....	113

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de patotipos de <i>E. coli</i> del tracto gastrointestinal .....	27
<b>Figura 2.</b> Síntesis de peptidoglicano.....	37
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de los betalactámicos .....	38
<b>Figura 4.</b> Anillo betalactámico.....	40
<b>Figura 5.</b> Ácido 6-aminopenicilánico.....	44
<b>Figura 6.</b> Ácido 7-aminocefalosporánico .....	45
<b>Figura 7.</b> Estructura general de las cefamicinas.....	48
<b>Figura 8.</b> Núcleo estructural de los monobactámicos.....	49
<b>Figura 9.</b> Estructura química del aztreonam.....	49
<b>Figura 10.</b> Núcleo estructural de los carbapenémicos.....	51
<b>Figura 11.</b> Inhibidores de las $\beta$ -lactamasas. ....	52



<b>Figura 12.</b> Mecanismo de inactivación del ácido clavulánico frente una enzima $\beta$ -lactamasa en la que se genera inactivación irreversible .....	53
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de acción por $\beta$ -lactamasas .....	60
<b>Figura 14.</b> Tiras E-test ESBL <sup>®</sup> .....	84
<b>Figura 15.</b> Tira E-test ESBL <sup>®</sup> . Prueba positiva para BLEEs .....	85

## INDICE DE DIAGRAMA

<b>Diagrama 1.</b> Metodología para el proceso de hemocultivo.....	92
--	----

## INDICE DE GRAFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Hemocultivos procesados en el laboratorio de bacteriología del INP.....	93
<b>Gráfica 2.</b> Frecuencia de bacilos Gram negativos productores de BLEEs aislados de hemocultivos analizados en el laboratorio de bacteriología del INP. ....	94
<b>Gráfica 3.</b> Enterobacterias productoras de BLEEs .....	95
<b>Gráfica 4.</b> Cepas productoras de BLEEs durante el periodo que comprende agosto 2015 a agosto 2016.....	96
<b>Gráfica 5.</b> Cepas productoras de BLEEs por sala del hospital.....	97
<b>Gráfica 6.</b> Frecuencia (%) de cepas BLEEs positivas por grupo de edad de los pacientes.....	98
<b>Gráfica 7.</b> Tipo de Muestra .....	99
<b>Gráfica 8.</b> Antibiograma de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	100
<b>Gráfica 8.1</b> Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> .....	101
<b>Gráfica 8.2</b> Antibiograma de <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	102



---

## ABREVIATURAS/ACRONIMOS

**AAF1:** Fimbrias de adherencia agregativa 1

**ACT:** N-acetil-transferasas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADP:** Adenosín difosfato

**ANT:** O-ade-nil-transferasas

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ARNr:** Ácido ribosómico

**AST:** Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BFP:** Pilus formador de haces

**BLEEs:**  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido

**Ca:** Calcio

**cAMP:** Adenosín monofosfato cíclico

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention

**CDT:** Prueba de combinación de disco

**Cfa:** Factor de colonización

**CFTR:** Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística

**CIAAS:** Comité de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud

**Cl:** Cloro

**CLSI:** Clinical & laboratory standards institute (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio)

**CMB:** Concentración mínima bactericida

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**CT:** Toxina del cólera

**DAEC:** *E.coli de adherencia difusa*

**DDST:** Double-Disc Synergy Test (Prueba de sinergia de disco doble)

***E. coli:*** *Escherichia coli*



- EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAST:** Toxina termoestable enteroagregante
- ECEI:** *Escherichia coli* entero invasiva
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EHEC:** *Escherichia coli* entero hemorrágica
- EPEC:** *Escherichia coli* entero patógena
- EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
- ESBLs:** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas
- ETEC:** *Escherichia coli* entero toxígena
- EUA:** Estados Unidos de América
- FADH:** Flavín adenín dinucleótido
- GB3:** Globotriaosilceramida
- GCC:** Guanilato ciclasa C
- GI:** Gastrointestinal
- GMPc:** Guanosín monofosfato cíclico
- H<sub>2</sub>S:** Ácido sulfhídrico
- INP:** Instituto Nacional de Pediatría
- ITU:** Infecciones en el Tracto Urinario
- K. oxytoca:*** *Klebsiella oxytoca*
- K. pneumoniae:*** *Klebsiella pneumoniae*
- LBE:** Locus de borramiento de los enterocitos
- LPS:** Lipolisacárido
- LT:** Toxina lábil
- MDR:** Sistema de multirresistencia
- Mg:** Magnesio
- MH:** Mueller Hilton agar
- MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
- MYSTIC:** Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (Prueba de Recolección de Información Anual de Susceptibilidad al Meropenem)



**Na:** Sodio

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NAG:** Ácido N-acetilglucosamina

**NAM:** Acido N-acetilmurámico

**OPH:** O-fosforo-transferasas

***P. aeruginosa:*** *Pseudomona aeruginosa*

***P. chrysogenum:*** *Penicillium chrysogenum*

**PABA:** Ácido para-aminobenzoico

**PBP:** Penicillin Binding Proteins (Proteínas de unión a penicilina)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PET:** Toxina codificada por plásmidos

**PFGE:** Electroforesis en gel de campo pulsado

**pH:** Potencial de hidrógeno

**RFLP:** Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

***S. aureus:*** *Staphylococcus aureus*

***S. clavuligerus:*** *Streptomyces clavuligerus*

**SENTRY:** Programa de vigilancia antimicrobiana

**SHU:** Síndrome hemolítico urémico

**SMART:** Study Monitoring Antibicrobial Resistance Trends (Estudio de monitoreo de las tendencias de seguimiento de resistencia a los antimicrobianos)

**SNC:** Sistema nervioso central

**ST:** Toxina termoestable

**Stx:** Toxina Shiga

**tARN:** Ácido ribonucleico de transferencia

**Tir:** Receptor translocador intimina

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

**TSI:** Hierro-triple azúcar



## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio que se realizó tuvo como finalidad determinar la prevalencia de bacilos Gram negativos productores de BLEEs durante un periodo que comprendió del 01 agosto 2015 al 31 agosto 2016, se hizo la tabulación de las frecuencias en base a la revisión de los resultados clínicos de pacientes pediátricos que presentaron una infección por diversos microorganismos en el que se encontraban enterobacterias productoras de BLEEs, la muestra de sangre de cada paciente fue procesada a partir de hemocultivos que fueron analizados en el laboratorio de bacteriología del INP.

Se empleó estadística básica descriptiva para obtener la frecuencia absoluta y relativa con la finalidad de realizar un análisis de las variables en estudio que fueron las siguientes: número de hemocultivos analizados durante el periodo establecido, edad de los pacientes, tipo de muestra, el número total de microorganismos aislados, el análisis específico de las cepas de bacilos Gram negativos productores de BLEEs incluyendo la frecuencia de resistencia a diferentes antibióticos y finalmente realizar un análisis comparativo para establecer cuál fue la enterobacteria que presentó una mayor producción de BLEEs.

Con los resultados obtenidos en este estudio se pretende mostrar que las bacterias productoras de BLEEs siguen siendo un problema a nivel hospitalario.



## 2. INTRODUCCIÓN

En 1928 ocurrió uno de los acontecimientos más importantes para el desarrollo de los antibióticos, fue gracias al bacteriólogo Alexander Fleming que permitió cambiar el curso de las enfermedades infecciosas al observar el efecto inhibitor de un hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* sobre el crecimiento de *Staphylococcus* en una placa de cultivo. Sin embargo el consumo inadecuado de antibióticos se ha extendido a nivel global, este hecho ha traído como consecuencia resistencia a los antimicrobianos, en la actualidad se enfrentan nuevos retos para combatir las enfermedades infecciosas.

Los primeros registros de las  $\beta$ -lactamasas fueron reportados en Alemania en 1983, a través de los años surgieron nuevos reportes de mutaciones puntuales de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que inicialmente actuaban en penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido pero no en penicilinas de amplio espectro ni en cefalosporinas de generaciones más nuevas, este hecho dio como resultado el reemplazo de diferentes aminoácidos, cambiando así el sitio activo de las  $\beta$ -lactamasas. Años más tarde cuando se comenzaron a utilizar agentes betalactámicos de amplio como lo son oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam) empezaron a surgir nuevas clases de  $\beta$ -lactamasas como TEM-3, TEM-4, SHV-2 y SHV-3, confiriendo una resistencia a los betalactámicos y cefalosporinas de amplio espectro<sup>1</sup>.

El uso terapéutico del antimicrobiano debe cumplir con una doble función la primera que sea una molécula con alta acción tóxica para la bacteria y la otra ser una molécula menos tóxica para el organismo hospedador, aunque se conocen blancos específicos para acción de los antimicrobianos, las bacterias tienen la capacidad de generar diferentes mecanismos de resistencia, como por ejemplo mutaciones en el sitio blanco o la producción enzimas que inactivan al agente antimicrobiano. A pesar de que actualmente se encuentran disponibles diferentes grupos de antibióticos la resistencia bacteriana sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo por diversos factores clínicos y económicos. Diferentes reportes aseguran que la resistencia bacteriana en los últimos años ha estado incrementando en los



países en desarrollo, a pesar de que la selección natural de las bacterias hace que exista una cierta resistencia inevitable debido a la presión selectiva. El problema puede empeorar si el tratamiento es inadecuado a causa de un resultado de laboratorio impreciso, esto puede prolongar la hospitalización de los pacientes y en casos más graves puede ser fatal <sup>2</sup>.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La alta incidencia de infecciones nosocomiales producidas por bacilos Gram negativos productores de BLEEs representa un peligro latente para el sector salud debido a que en los últimos años se han descrito elevadas tasas de resistencia a los antibióticos, esto se debe a que existen diferentes factores genéticos que facilitan los mecanismos de resistencia bacteriana, las cepas bacterianas que producen BLEEs dificultan el tratamiento del paciente prolongando su estancia hospitalaria.

A nivel nacional, en particular en el INP se desconoce el impacto epidemiológico y económico que generan infecciones causadas por enterobacterias que producen BLEEs, así como su diseminación hospitalaria. Por esta razón es conveniente determinar la frecuencia bacterias productoras de BLEEs, adicionalmente es importante generar el uso racional de antibióticos para evitar complicaciones como la multirresistencia en infecciones bacterianas, en base a lo anterior se pretende disminuir la morbilidad de pacientes en el ambiente hospitalario.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Determinar la frecuencia en (%) de cepas que producen  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido que fueron aisladas de hemocultivos en el laboratorio de bacteriología de pacientes del INP reportados en el periodo que comprende 01 de agosto del 2015 al 31 de agosto del 2016.

### 4.2 Objetivos particulares

- Conocer el bacilo Gram negativo que prevalece en la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.
- Analizar las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en función de la edad del paciente del INP.
- Relacionar la presencia de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido de acuerdo al tipo de sala de donde proviene la muestra clínica del INP.
- Determinar el mes con mayor prevalencia de aislamientos de bacilos Gram negativos productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en el periodo estudiado.
- Presentar la resistencia que tienen las enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido a los diferentes antibióticos que se utilizan en las pruebas del laboratorio de bacteriología del INP.



## 5. FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

La familia *Enterobacteriaceae* denominada así por Rahn en 1937 está constituida por un conjunto de bacilos Gram negativos heterogéneos en cuanto a su hábitat y capacidad patógena, pero incluidos en ella por la semejanza en sus características estructurales, fisiológicas y su por homología genética<sup>1</sup>.

En la actualidad conforman un grupo de más 40 géneros, cientos de especies y subespecies, estos géneros se han clasificado en función de sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación ADN-ADN y secuenciación del ARNr 16S<sup>2</sup>.

Las enterobacterias son microorganismos con forma de bacilo sin agrupación por lo general miden 0.6 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo, se caracterizan porque pueden ser móviles (con flagelos peritricos) o inmóviles (*Klebsiella sp* y *Shigella sp*), no forman esporas, algunos miembros de esta familia como lo son *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp* generan capsula<sup>3</sup>.

La mayoría de las especies son capaces de ocupar indistintamente hábitats muy variados en el medio ambiente, en las plantas o en el tubo digestivo de los animales; otras ocupan entornos más restringidos, como los sistemas acuáticos, vegetales o el tubo digestivo de ciertos animales. Es importante mencionar que algunas de estas especies se hallan adaptadas estrictamente al hombre, por tal motivo la familia *Enterobacteriaceae* incluye especies comensales y patógenas, estas últimas pueden producir infecciones oportunistas. Las enterobacterias han sido siempre los agentes más comunes de las infecciones del tracto urinario, pero ahora son también los agentes patogénicos predominantes en diversas infecciones sistémicas del origen endógeno y de infecciones nosocomiales que se observan en la actualidad<sup>4</sup>.

En los laboratorios de tercer nivel las enterobacterias con frecuencia son aisladas de urocultivos, una gran proporción de hemocultivos, cavidad peritoneal, y tracto respiratorio<sup>2</sup>.



## 5.1 Epidemiología de las enterobacterias

Los pacientes hospitalizados durante un largo periodo de tiempo o que se encuentran inmunodeprimidos, en especial los pacientes que reciben tratamiento con diversos antibióticos, se encuentran expuestos a contraer una infección por alguno de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* esto sucede, cuando existe una colonización por bacterias patógenas en el aparato digestivo, aparato genitourinario, respiratorio, orofaringe y piel<sup>1</sup>.

Se han reportado diferentes factores que contribuyen al incremento de las infecciones nosocomiales causadas por enterobacterias, entre estos factores se encuentran los siguientes: el uso de procedimientos invasivos terapéuticos (catéteres intravenosos, endoscopias, intervenciones quirúrgicas), además del empleo de potentes inmunosupresores y estancias hospitalarias prolongadas<sup>4</sup>.

## 5.2 Infecciones causadas por enterobacterias

La habilidad de causar enfermedad de los diferentes bacilos Gram negativos y particularmente de la familia *Enterobacteriaceae*, es muy variable, abarca la flora comensal raramente nociva, patógenos oportunistas y los principales patógenos que producen enfermedad en individuos en perfecto estado de salud.

Las enterobacterias producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, aproximadamente el 30% provocan bacteriemias y más del 70% son infecciones del aparato urinario (ITU) e infecciones intestinales además están asociadas a producir abscesos, neumonías, meningitis, bacteriemias, septicemias. Este grupo de enterobacterias normalmente son microorganismos comensales, pero se pueden convertir en patógenas cuando adquieren genes que codifican factores de virulencia por medio de algún mecanismo de transferencia génica, por ejemplo la conjugación bacteriana<sup>5</sup>.



### 5.3 Factores de virulencia de las enterobacterias

Se considera factor de virulencia a todas las características que son codificadas por genes que aumentan la capacidad de las bacterias para producir enfermedad o que causan daño al huésped, por ejemplo: adhesinas, cápsulas, fimbrias y toxinas <sup>6</sup>.

Los principales factores de virulencia de las bacterias Gram negativas son:

- a) **Pili o fimbrias** están constituidos por una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica y se encuentran ancladas en la membrana externa de los bacilos Gram negativos, tienen la característica de ser largos y flexibles. La función principal de las fimbrias es servir como soporte de las adhesinas, encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedera<sup>5</sup>.
- b) **Adhesinas** son lectinas (proteínas que tienen afinidad por los azúcares) y su función es la adherencia de la bacteria a receptores que se encuentran en la célula del hospedero estos receptores pueden ser de (fibronectina o manosa). La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas. En algunos casos, la fimbria posee dos o más adhesinas distintas para dos o más receptores diferentes y se les llama adhesinas fimbriales<sup>6</sup>.
- c) **Endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS)** es un factor de virulencia que se encuentra en las bacterias Gram negativas. La porción lipídica (lípidio A) está embebido en la membrana externa con el core, las porciones del antígeno "O" se extienden hacia afuera de la superficie de la bacteria, la actividad de esta endotoxina depende del componente lípidio A del lipopolisacárido que se libera durante la lisis bacteriana, algunas de las manifestaciones sistémicas de las infecciones por bacterias Gram negativas se inician por la endotoxina y son las siguientes: activación del complemento, liberación de citocinas, leucocitosis, trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada, fiebre, disminución de la circulación periférica, shock y puede causar la muerte<sup>4</sup>.



- d) **Exotoxinas** son toxinas que se liberan al medio extracelular, estas toxinas pueden viajar desde un foco infeccioso a zonas alejadas del cuerpo y producir daño en zonas muy distantes del lugar del crecimiento microbiano. Las exotoxinas se encuentran en Gram negativos se clasifican por su estructura y función en:
- 1) **Toxinas citolíticas** actúan como enzimas para atacar a los componentes celulares y causar la lisis.
  - 2) **Toxinas A-B** son dos polipéptidos unidos covalentemente, el componente B de la toxina se une a su receptor en la célula hospedera y se separa del componente A, que está encargado de la actividad enzimática responsable de la toxicidad. La mayoría de las toxinas bacterianas bien caracterizadas caen dentro de la categoría A-B, por ejemplo, toxina colérica, tetánica, diftérica y toxina Shiga<sup>6</sup>.
- e) **Cápsulas** están compuestas por unidades de polisacáridos y proteínas, sirve para protegerse de la fagocitosis mediante los antígenos capsulares hidrofílicos, los cuales repelen la superficie hidrofóbica de la célula fagocítica. Estos antígenos interfieren en la unión de los anticuerpos a las bacterias al ser poco inmunógenos es decir, con esto logran inhibir la activación del complemento<sup>5</sup>.
- f) **Sideróforos** son moléculas de bajo peso molecular que tienen la capacidad de quelar el hierro y se consideran parte del secuestro de factores de crecimiento, además son característicos de la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de esta familia se encuentran dos principales sideróforos que son la enterobactina y aerobactina, esta última es propia de las cepas de *E. coli* en infecciones extraintestinales (codificada por plásmidos). Estos sistemas de recaptación de hierro son necesarios para la gran mayoría de bacterias debido a que lo utilizan como cofactor para varias enzimas indispensables, y también para el transporte de nutrientes tales como vitamina B12<sup>5, 6</sup>.



El sistema de secreción de tipo III es una vía Sec-independiente, se encuentra presente en varias bacterias Gram negativas, por ejemplo: *Escherichia sp*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Bordetella sp*, *Yersinia sp*. En general es un sistema especializado de gran importancia debido a que exporta factores de virulencia directamente dentro de las células eucariotas, a través de un complejo mecanismo macromolecular, compuesto por más de 20 diferentes proteínas. El sistema de inyección molecular, ocurre desde el citosol bacteriano hasta el citosol de la célula eucariota, participan diversas proteínas supramoleculares que ayudan a crear un estrecho canal en el que viajan los sustratos dependientes de energía (ATP), para que sean liberadas las proteínas efectoras. Una vez que la formación del canal ha terminado, la exportación de sustratos es mediada por proteínas chaperonas que además desempeñan un papel importante en la estabilización del citoplasma. Los factores de virulencia que se propagan a través del mecanismo anterior provoca alteraciones en el funcionamiento de las células hospederas, con esto las bacterias facilitan su crecimiento y supervivencia<sup>7</sup>.

#### 5.4 Enterobacterias de importancia clínica

Las enterobacterias de mayor importancia en el área clínica son: *Escherichia coli*, *E. albertii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae*, *Salmonella enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. typhi*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *Yersina pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *Plesiomonas shigelloides*<sup>6,7</sup>.

#### 5.5 Aislamiento de enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* tiene unos requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa-positiva, oxidasa-negativa. La ausencia de actividad de citocromo oxidasa es una característica importante, debido a que se puede realizar rápidamente mediante una prueba sencilla y se utiliza para diferenciar a las bacterias Gram negativas fermentadoras de las no fermentadoras, tan sólo existen algunas excepciones



a esta regla. De manera general todos los miembros pueden proliferar rápidamente de forma aerobia o anaerobia porque tiene la capacidad de ser anaerobios facultativos. Las enterobacterias en su mayoría crecen en medios generales como gelosa nutritiva, agar tripticasa-soya, gelosa sangre y chocolate entre otros. Son cultivadas en medios selectivos para inhibir el crecimiento de Gram positivos y en cultivos diferenciales para distinguir esta familia entre bacterias lactosa positiva o lactosa negativa<sup>8</sup>.

Las características de las colonias de estos microorganismos en los diferentes medios se han utilizado para distinguir a los miembros más frecuentes de la familia *Enterobacteriaceae*. La capacidad que tienen las bacterias de fermentar lactosa se detecta a través de cambios de color en los medios de cultivos diferenciales que contienen lactosa, como el agar MacConkey que se ha utilizado para diferenciar a las cepas fermentadoras de lactosa, por ejemplo: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii* (tienen la característica de ser colonias de color rosado-púrpura en agar MacConkey) y se diferencian de las cepas que no fermentan lactosa o lo hacen lentamente, por ejemplo: *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae* y *Yersinia pestis* (sus colonias son incoloras en agar MacConkey)<sup>6,8</sup>.

## 6. ENTEROBACTERIAS QUE PRODUCEN BLEEs

Las BLEEs son enzimas producidas habitualmente por varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Es frecuente que se reporte a *Escherichia coli* junto con *Klebsiella pneumoniae* como las principales bacilos Gram negativos que generan BLEEs en el área clínica en los últimos años, con menos frecuencia se ha informado a *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis* productores de BLEEs. Sin embargo se han informado casos esporádicos poco comunes en *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens* productores de BLEEs<sup>6</sup>.

Diversos reportes confirman que los bacilos Gram negativos que producen BLEEs son resistentes a varios antibióticos betalactámicos pero también a otras clases de antimicrobianos, tales como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, quinolonas, tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazol<sup>7</sup>.



## 6.1 *Escherichia coli*

Es la bacteria más aislada del laboratorio de microbiología clínica, forma parte de la flora gastrointestinal normal de los humanos y de los animales. Sin embargo las especies patógenas tienen diversos factores de virulencia que están involucrados en el proceso de diferentes afecciones gastrointestinales (diarrea del viajero) y extraintestinales tales ITU, meningitis y sepsis <sup>8,9</sup>.

Se caracteriza por ser bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, oxidasa-negativo es móvil, fermenta rápidamente diversos azúcares como la lactosa, produciendo ácido y gas. El principal ácido que se produce es el ácido láctico, así como ácido fórmico, acético en cantidades menores junto con alcohol etílico y son capaces de producir indol a partir de triptófano<sup>9</sup>.

Esta bacteria crece abundantemente en medios nutritivos ordinarios y pueden cultivarse en medios más sencillos, es decir, los que tienen una fuente de nitrógeno inorgánico y glucosa, el crecimiento de *E. coli* se produce a una temperatura que oscila entre 10 °C y 46° C siendo el nivel óptimo de 37°C <sup>9,10</sup>.

Los medios utilizados para el aislamiento de *E. coli* son los medios diferenciales y selectivos. El medio EMB contiene un inhibidor que es el azul de metileno que tiene como función inhibir el crecimiento de otro tipo bacterias como lo son las Gram positivas y un colorante que sirven como indicador que es eosina, por esta razón las colonias de *E. coli* que crecen en este medio EMB tienen la característica generar colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado, debido a que tienen la capacidad de fermentar rápidamente la lactosa. Otro medio en el que se desarrolla *E. coli* es MacConkey, que contiene como inhibidor cristal violeta y como indicador el rojo neutro por esta razón las colonias presentan una coloración rojo con un halo turbio, además tiene la sales biliares que inhiben selectivamente el crecimiento de los Gram positivos<sup>10</sup>.



### 6.1.1 Clasificación de patotipos de *Escherichia coli*

*E. coli* fue descubierta por Theodor Escherich en 1885, mientras realizaba su investigación sobre bacterias que se encontraban en deposiciones de pacientes pediátricos, pero en ese tiempo la llamó *Bacterium coli commune*, que significa “bacteria común del colon”, tiempo más tarde fue estudiada por diversos investigadores y hasta 1954 fue nombrada *E. coli* en honor a su descubridor <sup>11</sup>.

*E. coli* es una de las primeras bacterias que coloniza el intestino humano pocas horas después del nacimiento. Los neonatos tienen su primer contacto con estas bacterias en el canal de parto que se encuentra con frecuencia contaminado por cepas de la flora fecal materna o que se encuentran esparcidas por el personal de enfermería y obstetricia<sup>12</sup>.

Es considerada una bacteria de la biota normal del intestino del hombre que establece una relación simbiótica, esta relación le confiere dos principales ventajas al hospedero, la primera es sintetizar compuestos útiles para el ser humano y la segunda es protegerlo de la colonización por otros microorganismos que pudieran resultar perjudiciales para la salud, sin embargo, existen diferentes patotipos que pueden ser patógenos debido a la adquisición y transferencia de genes que les permite convertirse en un patógeno altamente diverso y adaptado. Los patotipos de *E. coli* patógena pueden causar una amplia gama de enfermedades humanas que abarcan desde el tracto gastrointestinal hasta sitios extraintestinales como el tracto urinario, el torrente sanguíneo y el sistema nervioso central <sup>11, 12</sup>.

De acuerdo con lo anterior *E. coli* actualmente se separa en 3 grupos que son cepas comensales, patotipos intestinales y patógenos extraintestinales, esta clasificación se realiza en base a un análisis de isoenzimas MLEE (Multilocus enzyme Electrophoresis) en el que se identifica el fragmento génico TspE4.C2 y los genes *chuA*, *yjaA* que sirven como marcadores de patogenicidad <sup>13, 14</sup>. Por esta razón las cepas de *E. coli* son designadas en 4 grupos filogénicos principales: A, B1, B2 y D. Las cepas comensales se ubican principalmente en los grupos en los filogrupos A y B1, mientras que las patógenas



extraintestinales se agrupan en el B2 y el D, y los patotipos intestinales, en cualquiera de los filogrupos<sup>15, 16</sup>.

Una característica que distingue a la *E. coli* patógena de la no patógena es que las cepas patógenas tienen la capacidad de colonizar sitios en el cuerpo donde la *E. coli* no patógena normalmente no tiene "invasividad". El primer paso en la colonización por *E. coli* implica la unión de las bacterias a células específicas del huésped por medio de componentes superficiales conocidos como factores de virulencia que pueden ser fimbrias o *pilis* que determinan el sitio de infección que puede ser, por ejemplo epitelio del intestino delgado, epitelio del intestino grueso o uroepitelio<sup>14</sup>. Cada grupo patógeno principal de *E. coli* consiste en una serie de patotipos o subpatotipos que están estrechamente relacionados en virtud de su capacidad para adquirir los genes que codifiquen los factores de virulencia que están relacionados con su modo de patogénesis<sup>17</sup>.

Los miembros más importantes de cada grupo son relativamente fáciles de identificar y clasificar de acuerdo con el patotipo o mediante análisis de genes específicos. Sin embargo, debido a la multiplicidad de factores de virulencia y la capacidad de las cepas de *E. coli* para intercambiar información genética, a menudo es complicado clasificarlos por técnicas habituales de laboratorio, debido a esto actualmente se utilizan métodos genotípicos para su identificación<sup>13</sup>.

De manera general las cepas de *E. coli* asociadas a infecciones se clasifican en patotipos, los cuales se asignan de acuerdo a sus factores de virulencia asociados a la enfermedad que causan, no obstante los filogrupos también incluyen a las *E. coli* que no son patógenas.

En base a lo anterior *E. coli* se dividen en 3 grandes grupos :

**Grupo 1.** *E.coli* comensal tiene la característica de realizar una simbiosis con el huésped, este grupo de bacterias habitan en el ser humano y en mamíferos homeotermos<sup>14, 15</sup>.



**Grupo 2.** ExPEC (*E. coli* Patogeno extraintestinal) son aquellas cepas que están asociadas a infecciones en diferentes aparatos y sistemas que se encuentran fuera del tracto gastrointestinal **Tabla 1** <sup>14, 15, 16</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de ExPEC

Grupo 2	Patotipo ( <i>E.coli</i> )
A	<i>E.coli uropatogena</i> (UPEC)
B	<i>E.coli asociada a meningitis</i> (NMEC)
C	<i>E.coli patogeno avian</i> (APEC)
D	<i>E.coli asociada a septicemia</i> (SEPEC)

**Grupo 3.** *E. coli* asociada a infecciones del tracto gastrointestinal, son las principales causantes de la diarrea en adultos y niños. El grupo de *E. coli* gastrointestinal se clasifica en base a sus factores de virulencia que expresa cada uno de los patotipos y en los diferentes mecanismos de patogenicidad que causan la enfermedad, este grupo se divide en 6 patotipos ver **Tabla 2** <sup>18</sup>.

**Tabla 2.** Clasificación de *E. coli* de tracto gastrointestinal <sup>18, 20, 21, 22</sup>.

Grupo 3	Patotipos Gastrointestinales de <i>E.coli</i>	Lugar de acción
A	<i>E.coli enterohemorrágica</i> (EHEC)	Intestino grueso
B	<i>E.coli enteropatogena</i> (EPEC)	Intestino delgado
C	<i>E.coli enterotoxigenica</i> (ETEC)	Intestino delgado
D	<i>E.coli enteroagregativa</i> (EAEC)	Intestino delgado
E	<i>E.coli enteroinvasiva</i> (EIEC)	Intestino grueso
F	<i>E.coli de adherencia difusa</i> (DAEC)	Intestino delgado

Al rededor del mundo la gastroenteritis infecciosa es una causa importante de mortalidad, principalmente en pacientes pediátricos, se ha reportado a nivel mundial que es la quinta causa de muerte en niños menores de 5 años con aproximadamente 801 000 defunciones por año, estas cifras consideran a la gastroenteritis un problema de salud pública<sup>19</sup>.



A continuación se describe cada uno de los 6 patotipos de *E. coli* gastrointestinal. Ver **(Figura 1)** <sup>18, 20, 21, 22</sup>.

A. ***E.coli enteropatogena (EPEC)***: Estas cepas fueron las primeras en asociarse a la enfermedad diarreica y continúan siendo la principal causa de diarrea infantil en niños menores de 1 año en los países pobres, tienen la característica de expresar la isla de patogenicidad LEE que codifica la proteína intimina, esta es una proteína de membrana externa que media la adherencia de estas cepas a las células epiteliales, incluyendo el sistema de secreción tipo III y el receptor de intimina, adicionalmente cuenta con el plasmido EAF (Factor de Adherencia de EPEC). El daño histopatológico de la lesión en el enterocito inicia con la unión de la bacteria a las microvellosidades por medio de un pili formador de haces (Bfp A), seguido del borramiento de la microvellosidad y la formación de una estructura en forma de pedestal, por medio la vía de secreción tipo III es liberado Tir (translocated intimin receptor) y posteriormente la intimina que se une al Tir, esta unión tiene como consecuencia la polimerización de la actina generando la acumulación de elementos de actina en el citoesqueleto por debajo de las bacterias ancladas. El resultado es la pérdida de la integridad de los enterocitos generando la muerte de las células epiteliales, esto trae como consecuencia una mala absorción, vómitos y diarrea acuosa de tipo osmótico<sup>18, 20, 21</sup>.

B. ***E.coli enterohemorrágica (EHEC)***: Estas cepas producen toxinas tipo *shiga* (Stx-1 y Stx-2), ambas citotoxinas cuentan con seis subunidades B que son responsables de la unión a la superficie celular, junto con una subunidad A que corta RNA ribosomal que causa la interrupción de la síntesis de proteínas, esto produce la destrucción de la microvellosidad intestinal e inducen la muerte de las células huésped, esto da lugar a disminución de la absorción, por esta razón la enfermedad inicia desde una diarrea leve no complicada a una colitis hemorrágica con dolor abdominal intenso y diarrea sanguinolenta con moco que puede ser sin fiebre o con febrícula, esta infección es más frecuente durante los



meses templados y la incidencia máxima se describe en niños menores de 5 años. La mayor parte de las infecciones se producen por el consumo de alimentos contaminados como carne, frutas y verduras. Estas cepas contienen la isla de patogenicidad (PAI) llamada Locus of Enterocyte Effacement (LEE), una complicación importante de *E. coli* O157:H7 es el síndrome hemolítico urémico (SHU) <sup>20, 21, 22</sup>.

C. ***E. coli enterotoxigenica (ETEC)***: Las cepas de ETEC se adhieren a la superficie de las células epiteliales y posteriormente colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de *pili* o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFAs (factores de colonización antigénicos), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la secreción de una o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT-1) y toxina termoestable (STa). Los genes que codifican para las enterotoxinas residen en un plásmido que también puede contener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de STa se han encontrado en transposones. Las toxinas LT-1 y STa aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP, respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la hipersecreción de líquidos y electrolitos. Es importante mencionar que ETEC es una de las causas más frecuentes de deshidratación por diarrea en niños menores de 2 años y es la principal causa de diarrea, conocida como diarrea del viajero, que en general se desarrolla en un individuo sano proveniente de un país industrializado que visita regiones tropicales caracterizadas por deficientes condiciones de higiene <sup>20, 21, 22</sup>.

D. ***E. coli enteroagregativa (EAEC)***: se define como una *E. coli* que se adhiere a los enterocitos por medio de un patrón conocido como autoagregativo, en el que las bacterias se adhieren entre sí en una configuración de "ladrillo apilado". La estrategia básica de la infección por EAEC comprende la colonización de la mucosa intestinal del colon, seguida de la secreción de enterotoxinas y citotoxinas. Las cepas EAEC se adhieren a las de la mucosa intestinal por medio de estructuras fimbriales conocidas como Fimbrias de Adherencia Agregativa (AAF/I, AAF/II, AAF/III). Existen diversos factores de virulencia de EAEC que



están regulados por genes que codifican para factores de virulencia, estos genes son *aggR*, *aatA* y *aaiC*. Por esta razón las cepas pueden expresar diferentes factores de virulencia como son las Fimbrias de Adherencia Agregativa, toxinas termoestables enteroagregantes (EAST) y las toxinas codificadas por plásmidos (Pet). Las cepas de ECEA causan diarrea acuosa persistente con vómitos, deshidratación, febrícula, hemorragia y la disminución de la absorción de líquidos. Es importante mencionar que afecta tanto en niños menores de 6 meses de edad y adultos, es una de las pocas bacterias asociadas a la diarrea crónica que tiene como consecuencia el retraso del crecimiento en niños<sup>18, 20, 22</sup>.

- E. ***E.coli enteroinvasiva (EIEC)***: En la actualidad se tiene conocimiento de que las cepas de EIEC están bioquímicamente, genéticamente y patogénicamente relacionadas con *Shigella sp.* Por esta razón numerosos estudios han demostrado que *Shigella sp* y *Escherichia sp* son taxonómicamente indistinguibles a nivel de especie. La fase inicial de la patogénesis de EIEC comprende la penetración de las células epiteliales, seguida de la lisis de la vacuola endocítica y posteriormente la multiplicación intracelular, estas bacterias pueden moverse lateralmente a través del epitelio, este movimiento direccional se da a través del citoplasma por medio de la nucleación de los microfilamentos de actina, con esto la bacteria logra su extensión para colonizar las células epiteliales adyacentes, además de la invasión y diseminación dentro de las células epiteliales EIEC también induce apoptosis en macrófagos infectados y la destrucción de las células que recubren el colon. Es importante mencionar que todos los factores de virulencia que expresa *EIEC* se encuentran codificados en la secuencia *pWR100* que se transfiere de una bacteria a otra por medio de los plásmidos. Las cepas de ECEI son poco frecuentes en los países en vías de desarrollo, clínicamente se manifiestan como un cuadro similar a la disentería bacteriana con una incidencia elevada de fiebre y diarrea sanguinolenta, espasmos, diarrea acuosa que puede progresar a disentería con escasas heces sanguinolentas. Se presenta en naciones occidentales



afecta a personas adultas y principalmente a niños menos de 6 años<sup>20, 21, 22</sup>.

F. ***E.coli* de adherencia difusa (DAEC)**: Las cepas de DAEC se caracterizan porque se adhieren a las células de los enterocitos por medio adhesinas fimbriales llamadas F1845 y por otro factor de virulencia llamado DAF (factor de aceleración de la descomposición). Las cepas DAEC pueden inducir proyecciones similares a dedos que se extienden desde la superficie de los enterocitos infectados hasta rodear a la bacteria, es decir la "incrustan" pero sin una internalización completa, proporcionando protección contra diversos antibióticos. DAEC tiene la particularidad de no formar microcolonias de tipo EPEC, por este motivo los investigadores diferenciaron este patotipo de *E. coli*, sin embargo, actualmente se encuentra en investigación su mecanismo de patogenicidad. Estas cepas son potencialmente diarrogénicas que afectan a niños menores de 1 año de edad.<sup>18, 20, 22</sup>.

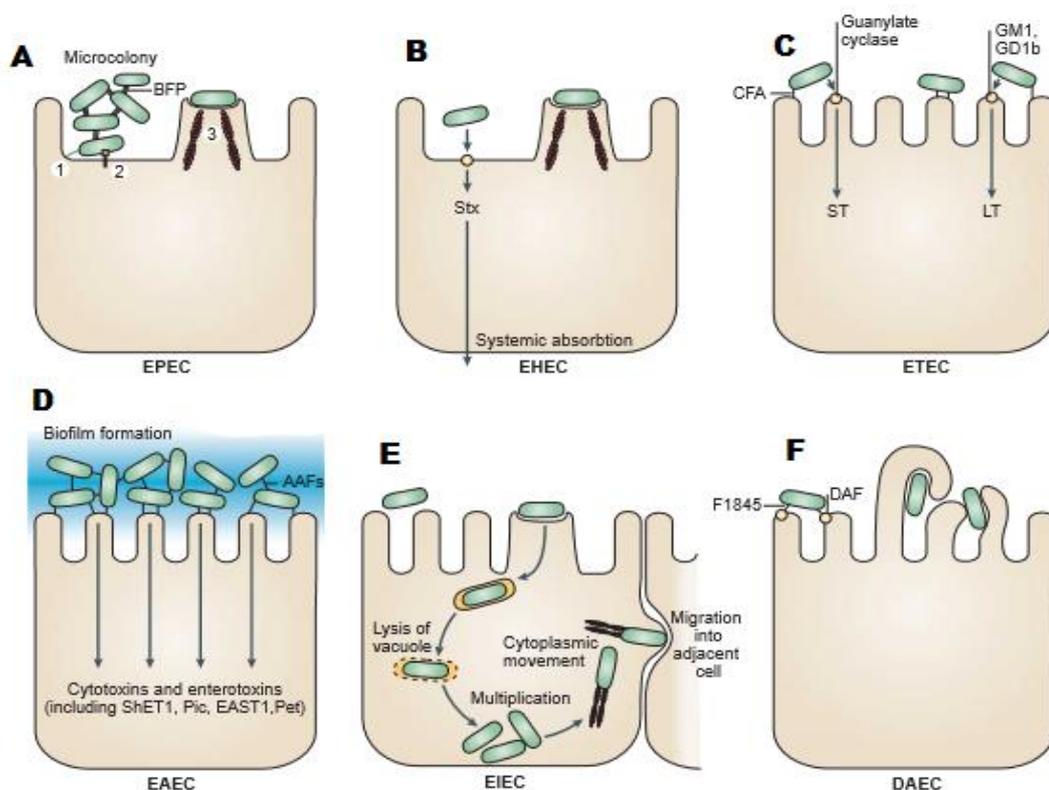


Figura 1. Esquema de patotipos de *E. coli* del tracto gastrointestinal<sup>18</sup>.



## 6.2 *Klebsiella pneumoniae*

Es una de las especies de mayor importancia clínica, en el ser humano se encuentra en el aparato digestivo como una bacteria comensal. No obstante cuando adquiere factores de virulencia tiene la capacidad de colonizar el aparato gastrointestinal y sobre todo la nasofaringe, esta enterobacteria se caracteriza por ser oportunista, dentro de las enfermedades más frecuentes que produce son neumonía, infecciones en vías urinarias, heridas quirúrgicas, tejidos blandos, enteritis, meningitis (en lactantes) y septicemia<sup>6</sup>.

Es un bacilo Gram negativo, no móvil, fermentador de lactosa, no descarboxila la ornitina, hidroliza la urea, posee metabolismo anaerobio facultativo, produce colonias mucoides en placas debido a la producción de una cápsula de polisacárido abundante. Por otra parte *K. pneumoniae* se puede encontrar en muestras clínicas extraintestinales (respiratorias, heridas y otros lugares donde potencialmente podría ser responsable de un proceso infeccioso), suele crecer en muchos medios de cultivo como agar (nutritivo, sangre, chocolate, infusión cerebro corazón (BHI) y MacConkey), el crecimiento óptimo de *K. pneumoniae* es de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ <sup>8</sup>.

El aislamiento de *K. pneumoniae* se realiza a partir de medios diferenciales y selectivos, como el agar MacConkey que contiene sales biliares y cristal violeta que inhibe el crecimiento de microorganismo Gram positivos, además el medio contiene como indicador el rojo neutro que permite diferenciar a *K. pneumoniae* como lactosa positiva. Las colonias que crecen en el agar MacConkey tienen la característica de ser grandes y mucoides de un color rosado, una de las pruebas bioquímicas que se utiliza para identificar a *K. pneumoniae* de *K. oxytoca*, es la producción de indol a partir de triptófano, en esta prueba *K. oxytoca* es positiva<sup>9, 10</sup>.



### 6.2.1 Mecanismo de patogenicidad de *Klebsiella pneumoniae*

La primera etapa en el proceso infeccioso es la adherencia de *Klebsiella sp* a las células del hospedero por medio de las proyecciones filamentosas conocidas como *pilis* que se encuentran en la superficie bacteriana, existen dos tipos de *pilis* predominantes en *Klebsiella sp* de tipo 1 y tipo 3. El tipo 1 está asociado en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario, adhiriéndose a las células del túbulo proximal.

Por otra parte los *pilis* tipo 3 se adhieren a las células del tracto respiratorio logrando la colonización, esto genera la proliferación de patógenos potenciales que pueden conducir a una neumonía, principalmente en pacientes con ventilación mecánica que se encuentran hospitalizados durante un largo periodo de tiempo. El mecanismo exacto de la resistencia a la inmunidad de los llamados factores séricos, es desconocido; una posible explicación es el enmascaramiento del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria por parte de la cápsula, de tal forma que exhibe una estructura que no activa el complemento<sup>23, 24</sup>.

### 6.3 *Proteus mirabilis*

*P. mirabilis* se diferencia de otras *Enterobacteriaceae* por su capacidad para desaminar fenilalanina. Esta enterobacteria se encuentra en múltiples hábitats del medio ambiente como suelos, agua contaminada con materia fecal, inclusive puede estar presente en las instalaciones de los hospitales. La infección del aparato urinario es la enfermedad más frecuente causada por este género *Proteus*, esto se debe a que produce grandes cantidades de ureasa, también se atribuye como un agente causal de la neumonía, septicemia e infecciones de heridas<sup>10</sup>.

Existen varias especies de *Proteus*, pero *P. mirabilis* junto con *P. vulgaris* representan la mayoría de los aislados clínicos, se diferencian de otros bacilos entéricos debido a que presentan flagelos peritricos que producen una película translúcida de crecimiento en un agar no selectivo este fenómeno de movimiento se denomina swarming. La diferenciación entre *P. mirabilis* y *P. vulgaris* puede hacerse sobre la base de producción de indol dado que este



último es indol positivo. Estas especies producen ureasa,  $H_2S$  (ácido sulfhídrico), son lactosa negativos, presentan alta movilidad, además producen fenilalanina desaminasa. Estas enterobacterias no producen toxinas solubles, pero generan enzimas conocidas como hemolisinas que producen lisis en los eritrocitos, mediante la producción de poros en la membrana citoplasmática<sup>8,9</sup>.

*P. mirabilis* causa ITU (Infecciones en el Tracto Urinario) de modo ocasional en huéspedes sanos y con mucha frecuencia en aquellos que están expuestos a catéteres, anomalías anatómicas o funcionales del tracto urinario, esta enterobacteria puede ser la segunda causa de bacteriemia sólo después de *E. coli* a partir de origen urinario, además puede provocar otras infecciones sobre todo en enfermos hospitalizados<sup>9</sup>.

### 6.3.1 Mecanismo de patogenicidad de *Proteus mirabilis*

El primer paso en el proceso infeccioso es la adherencia del microorganismo, debido a que es vital para supervivencia por medio de los *pilis*, estas bacterias pueden adherirse al endotelio del tracto urinario.

La unión de *Proteus sp* a las células uroepiteliales inicia varios eventos en principio la secreción de interleucinas y posteriormente la producción de ureasa, es importante mencionar que la presencia de la motilidad bacteriana y fimbrias favorecen la invisibilidad del tracto urinario. La infección por *Proteus sp* en las vías urinarias, se da la hidrólisis de urea en amoníaco y dióxido de carbono que disminuye el pH de la orina para disminuir la solubilidad, el par tampón de amoníaco/amonio tiene un pKa de 9.0, lo que resulta en la combinación de orina altamente alcalino rico en amoníaco, dando como resultado la precipitación de sales de calcio y magnesio, finalmente se genera la formación de cálculos que son producidos por *Proteus sp*, los cálculos se encuentran compuestos de cristales de estruvita, carbonato de calcio y apatita, es por esto que la alcalinización de la orina por la ureasa incrementada resulta tóxica para el epitelio renal<sup>25</sup>.



## 7. ANTIBIÓTICOS

### 7.1 Generalidades

Los antibióticos se consideran uno de los avances más importantes que la investigación farmacológica ha aportado para mejorar la salud de la población. Sin embargo desde su comercialización en 1940 se ha demostrado un incremento en la resistencia y existe evidencia que afirma la idea de que el consumo de antibióticos es el principal factor que ha acelerado el fenómeno natural biológico evolutivo, este hecho a través de los años ha estado causando gran impacto en la salud pública especialmente a nivel hospitalario.

Los antimicrobianos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos como actinomicetos, bacterias y hongos, pueden ser sintetizados por métodos químicos, tienen como principal función la destrucción de los microorganismos o impedir su multiplicación y desarrollo. Hoy en día no se utilizan moléculas de origen natural, por lo cual no se establece más la diferenciación entre antimicrobianos con quimioterapéuticos, es por esta razón que el término antibiótico es que se usa actualmente <sup>26</sup>.

De acuerdo al efecto que ejercen sobre la bacteria se dividen en:

- a) **Bacteriostáticos:** El efecto bacteriostático consiste en producir la inhibición del crecimiento bacteriano, mientras tanto, se espera que la inmunogenésis aporte los elementos defensivos necesarios para el control de la enfermedad.
- b) **Bactericidas:** El efecto bactericida consiste en producir la muerte de los microorganismos sensibles, los antimicrobianos actúan en la fase de crecimiento logarítmico bacteriano, su acción terapéutica es irreversible.

Estos efectos se pueden llevar a cabo mediante pruebas *in vitro* enfrentando una concentración estándar de microorganismos con una serie de diluciones de antimicrobianos. De acuerdo a lo anterior el efecto bactericida es la concentración más baja que inhibe el crecimiento del microorganismo y se denomina concentración inhibitoria mínima (CIM), mientras que el efecto bactericida es la concentración más baja que destruye el 99.9% de la población conocida como concentración bactericida mínima (CBM) <sup>26, 27</sup>.



## 7.2 Clasificación por su composición química

Los antibióticos se pueden clasificar por su composición química, los que se describen a continuación son algunos de los que se usan en la práctica clínica para el tratamiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas:

**Tabla 3.** Clasificación de los antibióticos por su estructura química <sup>27, 28</sup>.

Grupo	Antibióticos	Espectro de acción
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Penicilinas (incluyendo a las de amplio espectro) Cefalosporinas Cefamicinas Monobactámicos Carbapenémicos Ácido clavulánico	Este grupo es de amplio espectro Gram negativos: <i>Escherichia sp, Klebsiella sp, Proteus sp, Haemophilus sp, Enterobacter sp, Salmonella sp, Shigella sp, Citrobacter sp, Serratia sp, Pseudomonas sp.</i> Gram positivos: <i>Streptococcus sp, Clostridium sp, Bacillus sp, Corynebacterium sp, Treponema sp, Actinomyces sp, Leptospira sp, Neisseria sp, Bacteroides sp.</i>
<b>Aminoglucósidos</b>	Estreptomina Gentamicina Amikacina Dibekamicina	<i>Escherichia sp, Klebsiella sp, Proteus sp, Enterobacter sp, Salmonella sp, Serratia sp, Mycobacterium sp, Citrobacter sp, Edwardsiella sp, Pseudomonas sp, Staphylococcus sp.</i>
<b>Fenicoles</b>	Cloranfenicol	<i>Salmonella sp, Escherichia sp, Haemophilus sp, Aeromonas sp, Rickettsia sp, Brucella sp, Serratia sp, Shigella sp, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Proteus sp, Chlamydia sp, Mycoplasma sp.</i>
<b>Polimixinas</b>	Polimixina B Polimixina E	Gram negativos incluyendo <i>Pseudomonas sp.</i>
<b>Glucopéptidos</b>	Vancomicina	<i>Clostridium sp, Staphylococcus sp, Corynebacterium sp, Bacillus sp.</i>
<b>Macrólidos</b>	Azitromicina Claritromicina Eritromicina	Gram positivos y anaerobios (con excepción de <i>Bacteroides sp</i> ).
<b>Lincosamidas</b>	Clindamicina Lincomicina	Gram positivos, en general anaerobios
<b>Tetraciclinas</b>	Doxiciclina Clortetraciclina Tetraciclina	<i>Brucella sp, Mycoplasma sp, Chlamydia sp, Rickettsia sp.</i>
<b>Sulfamidas</b>	Trimetoprim /Sulfametoxazol Cotrimoxazol	Amplio espectro Gram negativos y Gram positivos
<b>Quinolonas</b>	Ácido nalidíxico Ácido oxolínico Ciprofloxacino Enoxacilina	<i>Pseudomonas sp, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Staphylococcus sp</i> (productores de betalactamasas)
<b>Oxazolidinonas</b>	Linezolid	Gram positivos incluidos los resistentes a otros antibióticos

Esta clasificación es de gran utilidad para seleccionar el antibiótico o las combinaciones que se deban emplear, cuando se traten de infecciones polimicrobianas <sup>28</sup>.



## 7.3 Clasificación de antibióticos para bacilos Gram negativos

Por su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican por:

- 1) Inhiben la síntesis de la pared celular (impide el cruzamiento del peptidoglicano).
- 2) Inhiben función de la membrana celular (afectan su permeabilidad).
- 3) Inhiben la síntesis proteica (al unirse a la subunidades 30s o 50s).
- 4) Inhibición de la síntesis de los ácido nucleicos (bloquean la replicación de ADN, inactivando la ADN girasa).
- 5) Antagonismo competitivo (bloqueo de la síntesis de factores metabólicos) <sup>29</sup>.

A continuación de manera general se presenta cada uno de los mecanismos de acción de los antibióticos:

### 7.3.1 Aminoglucósidos

Una vez que se encuentra el aminoglucósido en el citoplasma bacteriano, se une a los ribosomas en la subunidad 30s e interfiere en la síntesis proteica bacteriana al alterar la lectura del ARNm, causando un bloqueo en el inicio de la síntesis proteica, como consecuencia se realiza una terminación prematura de la lectura del ARN (esto genera una síntesis de proteínas incompletas) o una lectura errónea del ARNm con la incorporación de aminoácidos incorrectos a la proteína sintetizada <sup>29, 30</sup>.

### 7.3.2 Quinolonas

Las quinolonas son agentes bactericidas y afectan el funcionamiento normal del ADN bacteriano, penetran en la bacteria a través de las porinas, una vez dentro inhiben la enzima ADN-girasa (topoisomerasa II), encargada de desenredar las hebras de ADN (que se encuentran súper enrolladas), esto evita su replicación y transcripción que son procesos vitales para bacteria. La inhibición de la enzima ADN- girasa justifica la actividad bacteriostática, pero no la acción bactericida de las quinolonas, para que exista el efecto bactericida, es necesario que actúen las exonucleasas inducibles que destruyen definitivamente el ADN bacteriano<sup>30</sup>.



### 7.3.3 Fenicoles

El antibiótico más representativo del grupo es el cloranfenicol, su actividad antimicrobiana consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas de las células bacterianas. El cloranfenicol se une a la subunidad 50s del ribosoma, interfiere con el enlace de nuevos aminoácidos de la cadena peptídica, específicamente inhibe a la enzima peptidil transferasa <sup>27</sup>.

### 7.3.4 Sulfonamidas y Diaminopirimidinas

Las sulfamidas son análogos del ácido para-aminobenzoico (PABA), y por tanto, compiten por la enzima dihidropteroato sintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Para las bacterias es vital realizar la síntesis de los folatos (ácido fólico, ácido folínico) porque son precedentes de muchas reacciones bioquímicas en el interior de la célula, en especial de elementos esenciales como los aminoácidos o las bases púricas y pirimidícas de los nucleónicos (purina y timidina) que están encargadas de conformar el material genético ADN y ARN <sup>29, 30</sup>.

Otro antibiótico que actúa en esta misma ruta es el trimetoprim que pertenece al grupo de las diaminopirimidinas, el trimetoprim inhibe competitivamente a la enzima dihidropteroato reductasa que cataliza la conversión de ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico, de este modo se bloquea la ruta y se evita la generación del ácido folínico, esto da como resultado que se inhiba la formación de timidina, algunas purinas, metionina y glicina<sup>31</sup>.

En la actualidad el trimetoprim/ sulfametoxazol es uno de los antibióticos más importantes dentro de este grupo debido a su amplio espectro es una opción importante en el área clínica y en combinación con las sulfonamidas (sulfametoxazol) actúan en puntos diferentes de la misma ruta metabólica, su acción resulta sinérgica, por esta razón se usan en combinación (trimetoprim / sulfametoxazol) <sup>30, 31</sup>.

### 7.3.5 Polimixinas

El sitio de acción de las polimixinas es la membrana celular bacteriana y ocurre mediante interacciones electrostáticas entre el polipéptido catiónico (Polimixina E) y las moléculas aniónicas de los lipopolisacáridos de la membrana externa



de las bacterias Gram negativas lo que favorece el desarreglo de la membrana celular bacteriana. La polimixina E desplaza  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  lo que desestabiliza la molécula de lipopolisacárido que se encuentra cargada negativamente, generando una alteración de la membrana externa. El resultado de este proceso es un aumento en la permeabilidad de la envoltura celular, esto tiene como consecuencia la lisis celular bacteriana y, subsecuentemente, muerte celular<sup>27, 21</sup>.

### 7.3.6 Tetraciclinas

Las tetraciclinas penetran en el citoplasma bacteriano por un proceso dependiente de energía y se unen de forma irreversible a la subunidad 30s del ribosoma (proteínas S7, S14, S19), bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-tRNA, e impidiendo la continuación de la síntesis proteica, es decir impiden la introducción de nuevos aminoácidos en la cadena de péptidos<sup>31</sup>.

### 7.3.7 Betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos:

- Inhibición de síntesis de la pared bacteriana.
- Inducción a la autólisis bacteriana por medio de la activación de endolisinas<sup>29</sup>.

La pared celular es una estructura que envuelve a las bacterias de todos los géneros, con algunas excepciones como son los micoplasmas debido a que carecen de pared celular. En las bacterias Gram negativas su pared es compleja, está integrada por una membrana externa formada por lípidos, proteínas y de una capa interna delgada de peptidoglicano<sup>8</sup>.

La pared bacteriana se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática, se encuentra principalmente constituida por peptidoglicano (también llamado mureína), es un polisacárido que contiene azúcares aminados alternantes, estos son el ácido N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM)<sup>22</sup>.



A continuación se describe en brevemente la síntesis del peptidoglicano:

De forma general la síntesis del peptidoglicano ocurre en el citoplasma, donde se sintetizan los precursores a partir de diferentes elementos que son los siguientes: uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-NAG), ácido fosfoenolpirúvico, uridintrifosfato (UTP) y NADH, a partir de estos se forma el ácido uridin difosfato N-acetilmurámico (UDP-NAM).

En seguida, se inicia la adición secuencial y ordenada de los distintos aminoácidos en el residuo NAM para formar UDP-NAM-pentapéptido los aminoácidos que lo conforman son (L-alanina, ácido D-glutámico y ácido meso-diaminopimélico que es exclusivo de las bacterias Gram negativas, también se encuentran paralelamente dos residuos de D-alanina que son producidos por la enzima alanina racemasa, se enlazan entre sí por medio de la acción de la enzima D-alanina sintetasa, dando lugar a la formación de un dipéptido D-alanin- D-alanina, que conforma la cadena de aminoácidos (pentapéptido) <sup>32</sup>.

Posteriormente el UDP-NAM-pentapéptido por medio de un enlace de pirofosfato es acarreado por un transportador que se sitúa dentro de la membrana citoplasmática, conocido como bactoprenol (lípidio isoprenoide C<sub>55</sub>) que en un inicio se encuentra como fosfato de bactoprenol, una vez que se realiza la captación por medio de una enzima transferasa UDP transfiere NAG a la unidad bactoprenol-NAM-pentapéptido, después ocurren reacciones enzimáticas que forman NAG-NAM pentapéptido mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 con esto se forma una unidad de bactoprenol- NAG-NAM-pentapéptido <sup>33</sup>.

El portador bactoprenol-NAG-NAM-pentapéptido, transporta a través de la membrana la unidad NAG-NAM-pentapéptido hacia el espacio periplásmico, esta unidad se adhiere al extremo en desarrollo de una cadena de peptidoglicano esto ocurre por medio de la reacción de transglicosilación, lo cual aumenta la longitud de la cadena por la unidad de repetición. Por su parte el bactoprenol regresa a través de la membrana al momento de hacerlo pierde un fosfato, convirtiéndose en fosfato de bactoprenol con esto está listo para iniciar un nuevo ciclo <sup>34</sup>.



La última fase de la síntesis de la pared bacteriana se lleva a cabo en el espacio periplásmico y consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos, esto se lleva a cabo mediante una reacción de transpeptidación que esta catalizada por medio de las PBPs transpeptidasas que forman un enlace transversal peptídico entre D-alanina-ácido mesodiaminopimelico, finalmente se realiza una reacción de carboxipeptidación esto genera el rompimiento de los residuos subterminales de D-alanina, con esto se forma un tetrapéptido que es característico de la red entrecruzada de peptidoglicano que mantiene la rigidez estructural y la característica de resistencia a la presión osmótica interna típica de las bacterias que crecen en la mayoría de los ambientes (Figura 2) <sup>32, 33, 34</sup>.

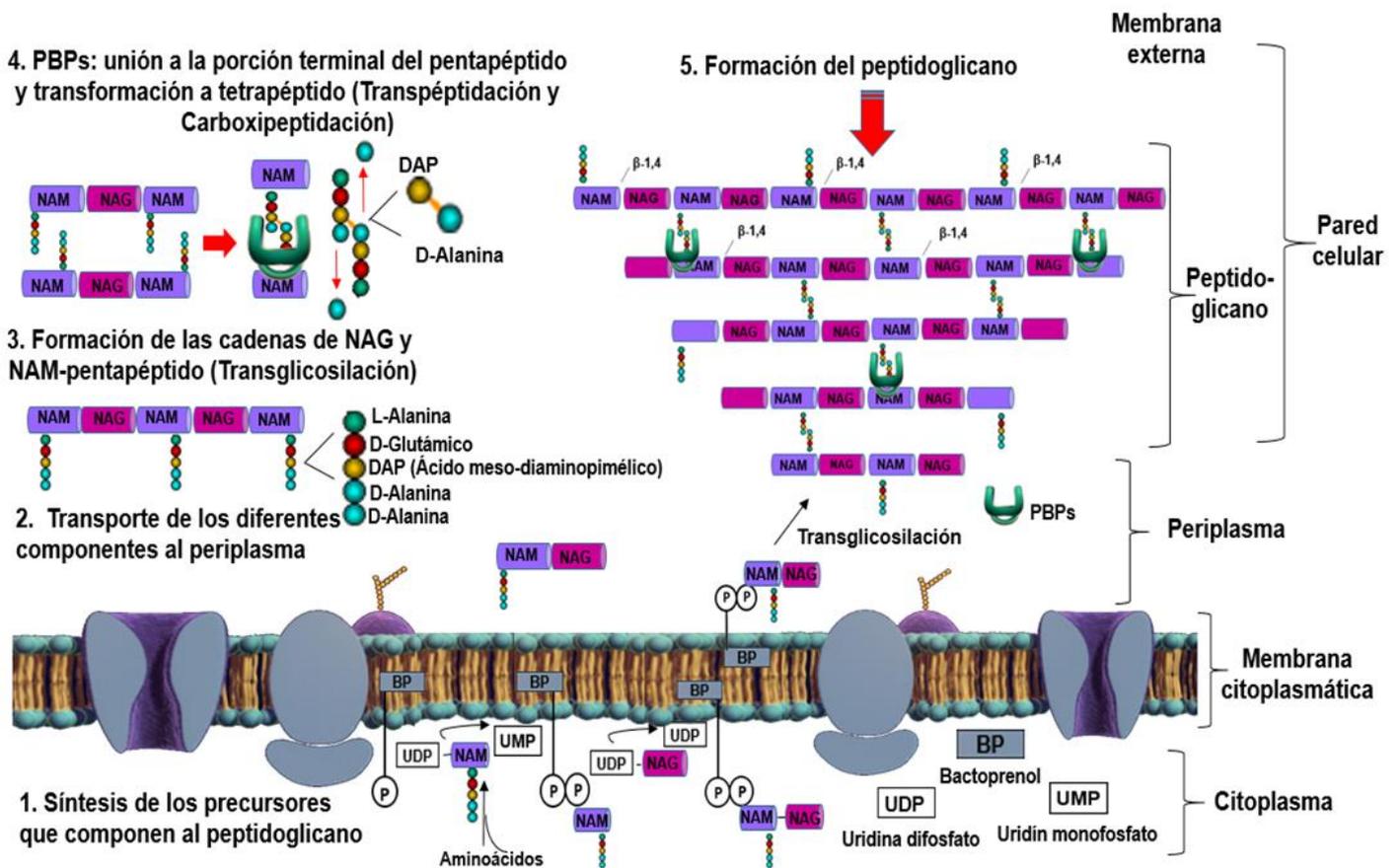


Figura 2. Síntesis de peptidoglicano <sup>32, 33, 34</sup>.

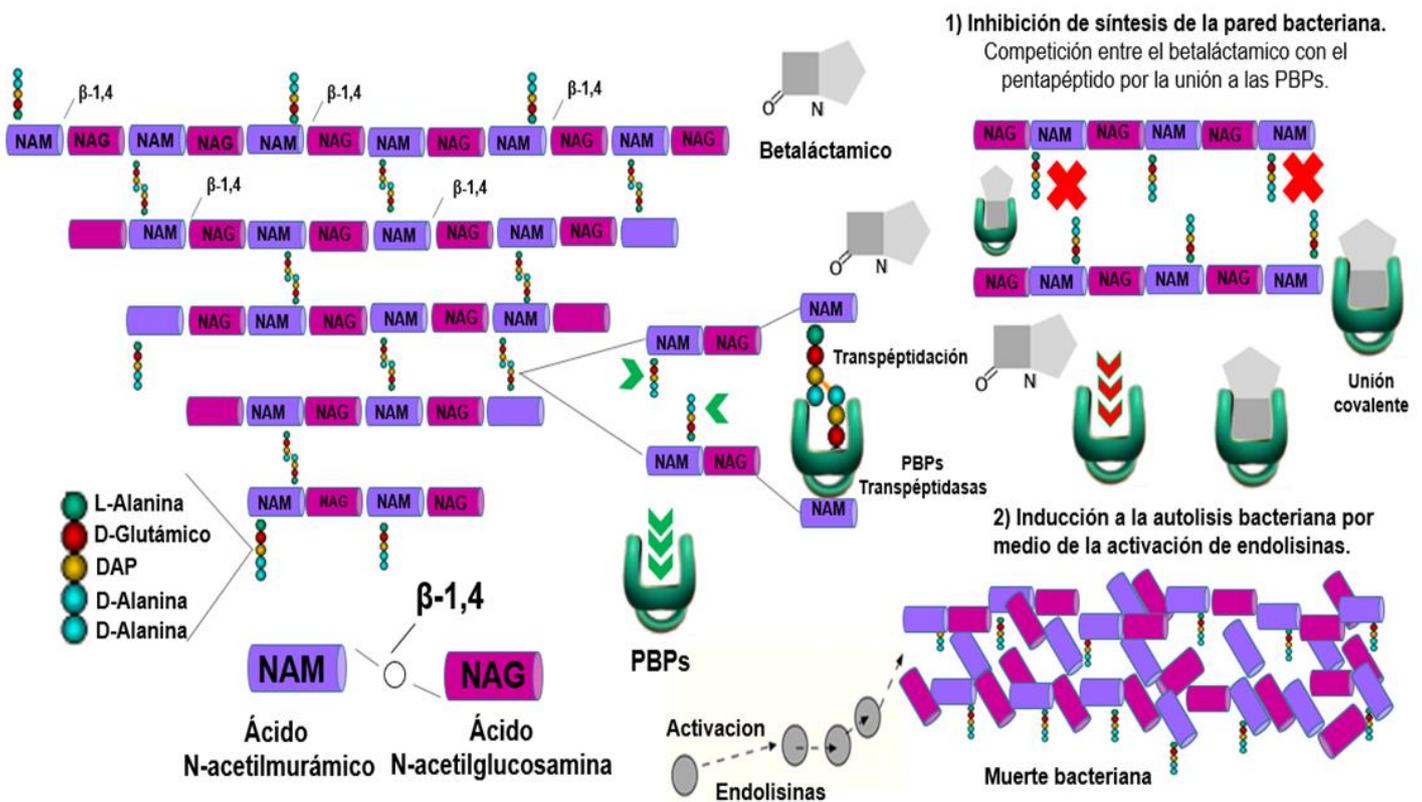
De acuerdo con lo anterior, todos los antibióticos betalactámicos contienen en su estructura química el anillo  $\beta$ -lactama que es primordial porque tiene una estructura espacial similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las



cadena del peptidoglicano, que es el sustrato natural de las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs).

Los betalactámicos actúan como sustratos competitivos contra acil-D-alanin-D-alanina, debido a que ambos compiten por la unión a las PBPs, en esta interacción enzimática los betalactámicos ganan al tener mayor afinidad, esto genera una unión covalente entre las PBPs y el anillo  $\beta$ -lactama que es irreversible<sup>35</sup>.

Las PBPs transpeptidasas son enzimas bacterianas esenciales para la síntesis del peptidoglicano cuando son bloqueadas, se produce una inhibición de la reacción de transpeptidación que es fundamental para generar enlaces cruzados de cadenas peptídicas que el confieren rigidez a la pared bacteriana. Por este motivo se desestabiliza la pared celular y finalmente se produce la hidrólisis autolítica del peptidoglicano (mediada por endolisinas), como resultado de estos eventos, la bacteria queda sin pared expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica (**Figura 3**)<sup>33, 34, 35</sup>.



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los betalactámicos<sup>33, 34, 35</sup>.



Los antibióticos betalactámicos son bactericidas ya que su efecto se basa en poner en acción a otros grupos de enzimas que están implicadas en la degradación y recombinación del peptidoglicano. Es importante mencionar que las paredes bacterianas son únicas por contener peptidoglicano, debido a esto, los antibióticos betalactámicos interfieren sólo con este componente de la pared celular y no afectan a las células eucariotas, el resultado por lo general es un índice terapéutico alto, además las paredes sólo se sintetizan en células que están en una multiplicación activa, los betalactámicos sólo son efectivos contra las bacterias en crecimiento <sup>33, 35</sup>.

#### **7.4 Antibióticos betalactámicos**

Desde el comienzo de la era antibiótica los betalactámicos han sido la piedra angular de la terapia antiinfecciosa, su eficacia clínica se atribuye a muchos rasgos atractivos de esta clase antimicrobiana porque en principio su mecanismo de acción es bactericida y combinado con un excelente perfil de seguridad permite a los pacientes tolerar una cantidad relativamente grande de exposición a estos fármacos <sup>34</sup>.

Estos antimicrobianos son la clase más diversa, con múltiples agentes en las subclases de penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Esta diversidad también se extiende al espectro de cobertura de esta clase, que va desde la terapia de espectro estrecho con penicilinas antiestafilocócicas como la nafcilina, hasta los antibióticos carbapenémicos que poseen parte de la cobertura antimicrobiana más amplia.

Los betalactámicos son el grupo de antibióticos más prescritos en la práctica médica, tanto en atención primaria como en los hospitales. En el mercado internacional el consumo de los antibióticos betalactámicos asciende a ventas anuales de unos 15 mil millones de dólares y representa el 65% del mercado total de antibióticos, esto representa aproximadamente que una de cada dos recetas se prescribe antibióticos betalactámicos <sup>36</sup>. El gran éxito que han tenido es porque poseen una gran eficiencia terapéutica y no son tóxicos para el ser humano ya que actúan bloqueando las enzimas encargadas de ensamblar la estructura del peptidoglicano que sólo se encuentran en las células bacterianas

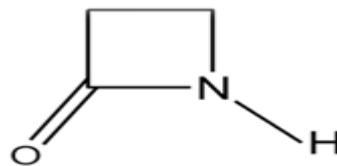


procariotas y no tienen homología con las células eucariotas, ambas características hacen que estos antibióticos sean una buena opción terapéutica ante infecciones<sup>35</sup>.

Las indicaciones para el uso terapéutico de los antibióticos betalactámicos varían desde infecciones primarias, forúnculos pequeños, carbuncos, infecciones respiratorias y urinarias, también se prescriben para gonorrea, neumonía, endocarditis, meningitis, septicemia. En general, el espectro de los betalactámicos incluye a bacterias Gram negativas (*Escherichia sp*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp*, *Enterobacter sp*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Citrobacter sp*, *Serratia sp*, *Pseudomonas sp*), además de Gram positivas aerobias y anaerobias (*Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Clostridium sp*, *Bacillus sp*, *Corynebacterium sp*, *Actinomyces sp*, *Leptospira sp*, *Bacteroides sp*, *Neisseria sp*). No obstante estos antimicrobianos no son activos sobre micoplasmas ya que estos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia sp* debido a que los betalactámicos tienen escasa capacidad de penetración dentro de la célula<sup>32, 36</sup>.

#### 7.4.1 Estructura química y clasificación de los betalactámicos

La estructura general de estos compuestos es el anillo betalactámico que está constituido por la condensación de alanina y  $\beta$ -dimetilcisteína (**Figura 4**)<sup>30</sup>.



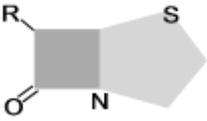
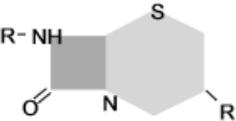
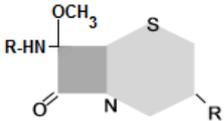
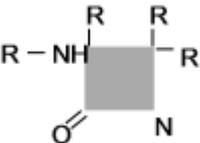
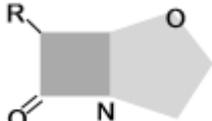
**Figura 4.** Anillo betalactámico<sup>30</sup>.

Este anillo constituye a varios grupos de antibióticos betalactámicos, es heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno según la naturaleza de los radicales se diferencia de las distintas moléculas, siendo las cadenas laterales complementarias las más relacionadas con su actividad antimicrobiana, farmacocinética y toxicidad, cabe destacar que el anillo betalactámico para los diferentes grupos de antibióticos se encuentra unido a otro anillo secundario, esto dependerá de cada uno de los grupos de antibióticos betalactámicos, entre los que se encuentran los siguientes:



Penicilinas, Cefalosporinas, Cefamicinas Monobactámicos, Carbapenémicos e Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (**Tabla 4**). En todos estos grupos, al sufrir mínimas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores<sup>33, 36</sup>.

**Tabla 4.** Estructura química de los betalactámicos<sup>33, 36</sup>.

	Anillo betalactámico	Anillo secundario	Núcleo del Betalactámico	Grupo Antibiótico
		Anillo tiazolidina	Ácido 6-aminopenicilánico	<b>PENICILINAS</b>
		Anillo dihidrotiazina	Ácido 7-aminocefalosporánico	<b>CEFALOSPORINAS</b>
		Anillo dihidrotiazina	Ácido 7-aminocefalosporánico + enlace 7 $\alpha$ - metoxilo	<b>CEFAMICINAS</b>
		Ninguno	Monobactamo	<b>MONOBACTÁMICOS</b>
		Anillo pirrolidínico	Carbapenemo	<b>CARBAPENÉMICOS</b>
		Anillo oxazolidina	Clavamo/oxapenamo	<b>ÁCIDO CLAVULÁNICO</b>



La afinidad del anillo betaláctamico por el residuo acil-D-alanin-D-alanina del dipéptido les permite interactuar con diversas proteínas enzimáticas con actividad de transpeptidasas, transglicosilasas y carboxipeptidasas situadas en la superficie de la membrana plasmática bacteriana, moléculas encargadas de modelar la configuración definitiva de la capa del peptidoglucano, además de guiar su reorganización durante la división de bacterias, a estas proteínas de membrana se les conoce como PBPs, como ya se mencionó anteriormente la actividad antibacteriana de los betalactámicos está en relación con su capacidad para interferir de forma competitiva, en la actividad de las PBPs <sup>31, 33</sup>.

Los antibióticos betalactámicos se clasifican de la siguiente manera (**Tabla 5**):

**Tabla 5.** Clasificación de los antibióticos betalactámicos <sup>34</sup>.

Grupo	Ejemplo
Penicilinas naturales	Penicilina G, Penicilina V
Penicilinas resistentes a la penicilinasasa (PRP)	Nafcilina, Meticilina
PRP: isoxazolil penicilinas	Oxacilina, Cloxacilina, Dicloxacilina
Aminopenicilinas	Ampicilina, Amoxicilina
Carboxipenicilinas	Carbenicilina, Ticarcilina
Ureidopenicilinas	Piperacilina, Azlocilina, Mezlocilina
Cefalosporinas de primera generación	Cefalotina, Cefazolina, Cefradina, Cefapirina
Cefalosporinas de segunda generación	Cefamandol, Cefuroxima, Cefonicida, Cefaclor
Cefalosporinas de tercera generación	Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefpodoxima, Cefoperazona, Cefpiramida.
Cefalosporinas de cuarta generación	Cefepima, Cefpiroma
Cefalosporinas de quinta generación	Ceftarolina, Ceftobiprole
Cefamicinas	Cefoxitina, Cefotetán, Cefmetazol



<b>Monobactámicos</b>	Aztreonam
<b>Carbapenémicos</b>	Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Doripenem
<b>Inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas</b>	Clavulanato, Sulbactam, Tazobactam

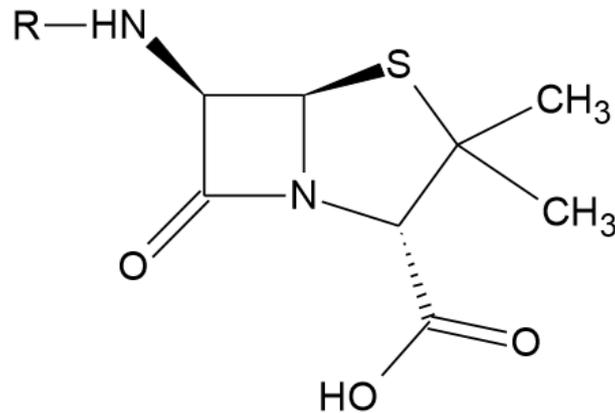
#### 7.4.2 Penicilinas

Su descubrimiento se atribuye a Alexander Fleming quien en 1928, observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se inhibía ante la presencia del hongo *Penicillium chrysogenum*, esto era posible porque producía una sustancia capaz de impedir el crecimiento de muchos *Staphylococcus sp.* Posteriormente en 1930, Cecil George Paine utilizó por primera vez la penicilina como tratamiento tópico en pacientes neonatos con infecciones oculares y cutáneas. Sin embargo tuvo varios problemas de estabilidad química, por lo que el primer tratamiento parental con penicilina, tuvo que esperar hasta 1940 en este año Florey, Chain y asociados aislaron la penicilina e hizo viable el negocio de producir y comercializar la penicilina G, a mediados de ese mismo año, la penicilina G estaba disponible para uso general en los EUA iniciando así una nueva era de los antibióticos<sup>31</sup>.

Las penicilinas constituyen el grupo de los antimicrobianos betalactámicos más importantes, además de ser los más utilizados en la población, su descubrimiento constituyó el comienzo de una nueva era de la medicina. La estructura básica de las penicilinas está conformada por un anillo de tiazolidina que se une a un anillo betalactámico que porta un grupo amino secundario (R-NH) (**figura 5**). Estos radicales R, pueden unirse al grupo amino, la integridad estructural del núcleo del ácido 6-aminopenicilánico es fundamental para la actividad biológica de estos compuestos, si existe una hidrólisis del anillo betalactámico a causa de las  $\beta$ -lactamasas bacterianas se obtiene como producto el ácido peniciloico, que carece de actividad antimicrobiana<sup>37</sup>.



Los radicales en la fracción del ácido 6-aminopenicilánico determinan las propiedades farmacológicas y antibacterianas de la molécula.



**Figura 5.** Ácido 6-aminopenicilánico  
Núcleo estructural de las Penicilinas <sup>37</sup>.

Las penicilinas más usadas en el ámbito clínico son: ampicilina, bencilpenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, nafcilina, oxacilina, piperacilina y ticarcilina <sup>35</sup>.

El espectro antimicrobiano de las penicilinas abarca inicialmente los cocos Gram positivos, cocos Gram negativos, bacilos Gram positivos (facultativos y anaerobios) y para algunos bacilos Gram negativos anaerobios. La producción de derivados semisintéticos a partir de la molécula nativa ha permitido la evolución de ciertos fármacos con diversas actividades frente a diferentes bacterias, como las aminopenicilinas que presentan una mayor penetración en las bacterias Gram negativas e incluso penicilinas con actividad antipsedomónica como son las ureidopenicilinas y carboxipenicilinas <sup>36, 37</sup>.

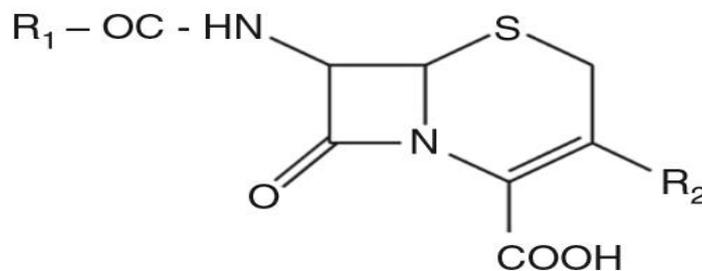
### 7.4.3 Cefalosporinas

Las cefalosporinas son uno de los grupos más importantes en el desarrollo de los antibióticos betalactámicos, la primera cefalosporina reportada fue la cefalotina que se introdujo para uso clínico en 1964. Hoy en día existen más de 20 cefalosporinas diferentes en uso de las cuales 17 se comercializan en EUA, la cefalosporina está entre las clases de antibióticos más recetados debido a su



amplio espectro de actividad, baja toxicidad, su facilidad de administración y su perfil farmacocinética efectiva. La actividad bactericida de las cefalosporinas fue descrita por primera vez por el profesor Giuseppe Brotzu, de la universidad de Cerdeña en 1945, fue aislada a partir de hongos en las Ciénegas del puerto de Cagliari <sup>38</sup>.

Las cefalosporinas son fármacos cuya estructura básica está constituida por el ácido 7-aminocefalosporánico que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiazina y un anillo betaláctamico. La introducción de modificaciones en la cadena lateral de este anillo origina las diversas cefalosporinas (**figura 6**) <sup>39</sup>.



**Figura 6.** Ácido 7-aminocefalosporánico <sup>39</sup>.

Núcleo estructural de las cefalosporinas

#### 7.4.4 Cefalosporinas de Primera Generación

Las cefalosporinas de primera generación son las que mantienen una mejor actividad frente a microorganismos Gram positivos, con la excepción de *S. aureus* (productor de  $\beta$ -lactamasas), neumococos resistentes a penicilina y de los enterococos, resistentes de forma intrínseca a cefalosporinas, es importante mencionar que presentan un espectro estrecho para bacterias Gram negativas.

La actividad estrecha se atribuye a la presencia de  $\beta$ -lactamasas, el desarrollo de nuevos fármacos tanto cefalosporinas como de otros grupos de antibióticos ha limitado bastante su aplicación, de modo que ésta se reduce.

Se usan fundamentalmente para infecciones del tracto urinario no complicadas faringoamigdalitis y neumonía neumocócica<sup>39</sup>.



#### 7.4.5 Cefalosporinas de Segunda Generación

Esta generación mejora el espectro frente a bacterias Gram negativas, con respecto a la de la primera generación. En este grupo el aumento de espectro y la mayor actividad antimicrobiana, junto con la mayor disponibilidad de fármacos orales, incrementan de forma notable el número de procesos en que son potencialmente útiles, tanto en el hospital como en la comunidad<sup>38</sup>.

Su actividad se destaca frente a microorganismos Gram positivos, especialmente *Streptococcus sp* y frente a *Haemophilus sp*, *Neisseria sp*, *Moraxella sp*, son una alternativa en el tratamiento de diversos procesos otorrinolaringológicos como faringoamigdalitis, otitis, sinusitis, agudizaciones de origen infecciosas de pacientes con EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) y otro tipo de infecciones respiratorias como infecciones de tracto urinario. Es importante mencionar que las cefalosporinas de segunda generación también tienen actividad frente a bacterias Gram negativas ante una infección causada por *Escherichia sp* y *Klebsiella sp* (No productoras de  $\beta$ -lactamasas)<sup>40</sup>.

#### 7.4.6 Cefalosporinas de Tercera Generación

Las cefalosporinas de tercera generación incrementan notablemente su espectro de actividad e inducen algunas características farmacocinéticas interesantes como su buen acceso al líquido cefalorraquídeo.

Esta generación se muestra muy activa frente a neumococos moderadamente resistentes a penicilina y otros *Streptococcus sp*, pero pierden actividad frente a *Staphylococcus sp* (productores de  $\beta$ -lactamasas) y bacilos Gram negativos como *Escherichia sp*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp*, estas últimas bacterias pueden presentar resistencia mediada por BLEEs. Por otra parte el amplio espectro que presentan las cefalosporinas de tercera generación también se usan frente a microorganismos como (*Morganella sp*, *Providencia sp*, *Serratia sp* y *Citrobacter sp*). Las cefalosporinas de tercera generación constituyen un pilar fundamental de la terapéutica antimicrobiana, sobretodo en el ámbito hospitalario, donde se usan constantemente en infecciones respiratorias de la piel y tejidos blandos<sup>41</sup>.



#### 7.4.7 Cefalosporinas de Cuarta Generación

Son moléculas básicamente semejantes a las cefalosporinas de tercera generación, en conjunto éstas son producto del esfuerzo para ampliar la acción antimicrobiana y responder a la emergencia de cepas multirresistentes aisladas de pacientes hospitalizados, se trata de cefalosporinas que mejoran de forma notable la actividad de las de tercera generación frente bacterias Gram negativas, *Staphylococcus sp*, neumococos y otros *Streptococcus sp* patógenos. Sus principales indicaciones son para neumonía nosocomial, episodios febriles en neutropénicos y cuadros sépticos de adquisición nosocomial, debido a la frecuente multirresistencia de los agentes etiológicos cuando las infecciones son de adquisición intrahospitalaria, también pueden estar indicadas en infecciones del tracto urinario nosocomiales complicadas, infecciones polimicrobianas de piel y tejidos blandos <sup>42</sup>.

#### 7.4.8 Cefalosporinas de Quinta Generación

Las cefalosporinas de quinta generación son un nuevo grupo de cefalosporinas que se encuentran disponibles en algunos países, estas cefalosporinas tienen la cualidad de mostrar actividad bactericida para bacterias Gram positivas, en especial contra el MRSA y algunas bacterias Gram negativas <sup>41</sup>.

La ceftarolina pertenece a la quinta generación de cefalosporinas y su estructura fue diseñada para unirse a las PBP2a de MRSA, que a diferencia de otras cefalosporinas tienen baja afinidad por este sitio, la ceftarolina también tiene una actividad moderada contra *Enterococcus faecalis*. Sin embargo se ha reportado que *Enterococcus faecium* presenta resistencia<sup>42</sup>.

Dentro de esta quinta generación existe otro agente importante que es el ceftobiprole que también presenta actividad contra *Enterococcus faecalis* y MRSA, además de estos patógenos su espectro de acción también abarca a bacterias Gram negativas clínicamente importantes, que incluyen a *Citrobacter sp*, *Escherichia sp*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Serratia sp* y *Pseudomonas sp*. Se ha reportado en diferentes estudios que ceftobiprole ha demostrado actividad contra aislamientos que expresan  $\beta$ -lactamasas de AmpC, pero no ha mostrado consistentemente actividad contra aislamientos que expresan BLEEs.



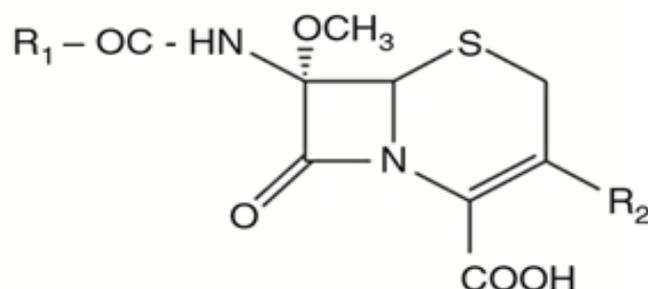
A pesar de que en un inicio se retiró del mercado el ceftobiprole actualmente se encuentra disponible en algunos países y es de gran relevancia para el tratamiento de los pacientes <sup>42, 43</sup>.

#### 7.4.9 Cefamicinas

Las cefamicinas forman parte de la familia de los antibióticos betalactámicos tienen una actividad de amplio espectro, son producidas por actinomicetos, a menudo las cefamicinas se consideran cefalosporinas de segunda generación porque son estructuralmente similares, además son de gran utilidad en el área clínica <sup>44</sup>.

Se caracterizan por la presencia de un grupo 7- $\alpha$ -metoxilo, que confiere una resistencia alta a las  $\beta$ -lactamasas, incluyendo a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido que son producidas por microorganismos Gram positivos y Gram negativos (**Figura 7**) <sup>45</sup>.

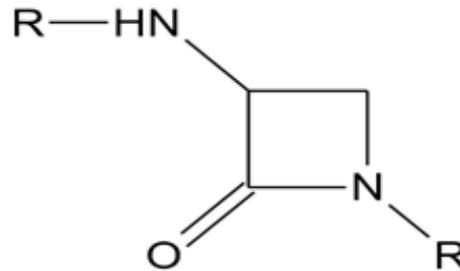
La cefoxitina tiene una excelente estabilidad metabólica, siendo la primera cefamicinas semisintética resistente a casi todas las  $\beta$ -lactamasas. Por otra parte la cefoxitina es bactericida, es activa contra muchas bacterias Gram negativas resistentes a la cefalotina. Por su parte la cefoxitina demuestra un espectro muy amplio que incluye a *Proteus sp* y muchas cepas de *Serratia sp*. En contraste con las cefalosporinas, el espectro de actividad de cefoxitina es eficaz frente a patógenos anaeróbicos, como por ejemplo a *Bacteroides fragilis*, por esta razón las cefamicinas se utilizan en las infecciones anaerobias mixtas, como en infecciones de la piel, infecciones óseas, infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario, peritonitis y enfermedad inflamatoria pélvica <sup>44</sup>.



**Figura 7.** Estructura general de las cefamicinas <sup>45</sup>.



#### 7.4.10 Monobactámicos

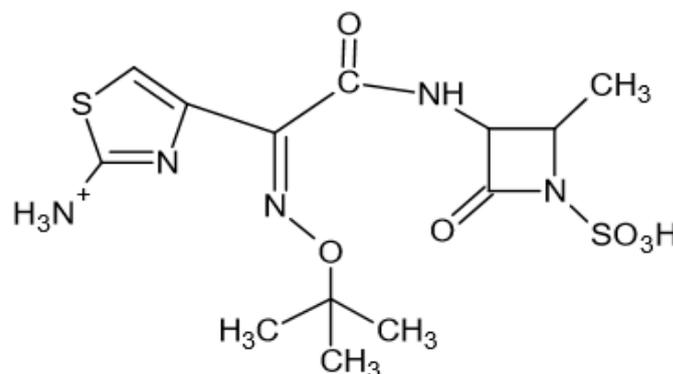


**Figura 8.** Núcleo estructural de los monobactámicos <sup>42</sup>.

Los antibióticos monobactámicos tienen una estructura monocíclica sencilla y su característica principal es que el anillo betaláctamico no está fusionado a otro secundario (**Figura 8**) <sup>42</sup>.

El primer Monobactámico fue “SQ 261180”, y fue obtenido a partir de una cepa de *Chromobacterium violaceum*, en 1978, en una muestra de tierra procedente de New Jersey. Los monobactámicos son compuestos que tienen una débil actividad bacteriana, la modificación en sus cadenas laterales mejora su espectro y estabilidad <sup>42, 46</sup>.

El único monobactámico comercializado de gran importancia clínica fue el aztreonam y fue el primero en ser obtenido por síntesis mediante la fusión del ácido sulfónico con el aminoácido treonina; esta molécula incorpora un radical metilo en la posición 4 del anillo betaláctamico que aumenta la estabilidad a las  $\beta$ -lactamasas bacterianas, así como una cadena lateral aminotiazol-carboxipropiloximino, en la posición 3 (**Figura 9**) <sup>46</sup>.



**Figura 9.** Estructura química del aztreonam <sup>46</sup>.



Son indicados para la patología infecciosa causada predominantemente por microorganismos Gram negativos (*Escherichia sp*, *Klebsiella sp*, *Serratia sp*, *Proteus sp*, *Salmonella sp*, *Haemophilus sp* y *Neisseria sp*) que pueden causar infecciones urinarias, prostatitis y pielonefritis, infecciones respiratorias como es neumonía, exacerbaciones infecciosas de la EPOC, bronquiectasias infectadas e infecciones relacionadas a fibrosis quística, infecciones intrabdominales como son peritonitis, abscesos intrabdominales e infecciones biliares, entre otras más <sup>42</sup>.

#### 7.4.11 Carbapenémicos

Los carbapenémicos son los antibióticos betalactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las  $\beta$ -lactamasas. Estas cualidades hacen que los carbapenémicos sean imprescindibles en el tratamiento empírico donde se sospecha de un patógeno multirresistente, en la monoterapia de numerosas infecciones nosocomiales graves (incluso algunas de origen comunitario) y en la terapia dirigida contra las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes o productoras de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y espectro extendido <sup>45</sup>.

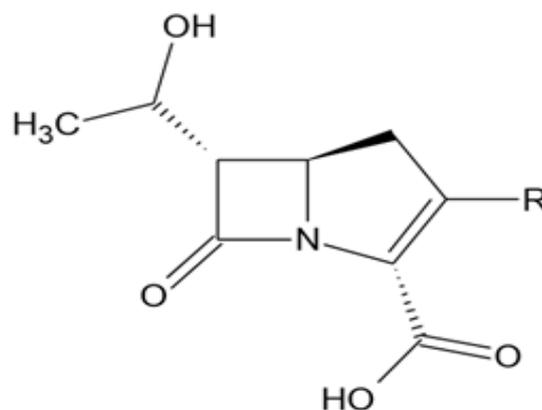
Muchas de las  $\beta$ -lactamasas de clase A son susceptibles a la inhibición por el ácido clavulánico. Por el contrario, todas las enzimas de clase C y la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas de clase D no son inhibidas por el ácido clavulánico. No obstante, las clases A, C y ciertas enzimas de la clase D son inhibidas por los carbapenémicos. Sin embargo la combinación de diferentes mecanismos de resistencia bacteriana (enzimas que hidrolizan la molécula, expulsión del antibiótico mediante bombas de eflujo, alteraciones en la permeabilidad y modificación del sitio blanco) pueden causar altos niveles de resistencia a carbapenémicos en bacterias Gram negativas tales como *Klebsiella sp*, *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter sp*. En el caso de cocos Gram positivos la resistencia se da principalmente por la adquisición o producción de nuevas PBPs resistentes a los carbapenémicos <sup>46</sup>.



La tianamicina fue el primer carbapenem que se descubrió en 1976, pero tuvieron que pasar varios años para que se comercializara el uso del imipenem en humanos que fue en 1985, en este caso la desventaja radicaba en que este compuesto era susceptible a la actividad hidrolítica de la enzima renal dehidropeptidasa 1 (DHP-1), por lo que se desarrolló una combinación con la cilastatina, cuya función es inhibir la DHP-1. Posteriormente, en 1996 la FDA (Food and Drug Administration) autoriza el uso inyectable del meropenem, un potente antimicrobiano que tenía un amplio espectro para bacterias Gram negativas y Gram positivas que fue altamente estable ante la acción de la DHP-1. Su uso clínico inicia en 2001 y se caracteriza por ser altamente efectivo contra bacterias Gram negativas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y de altos niveles de la enzima AmpC <sup>47</sup>.

La estructura básica de los carbapenémicos consistente en un anillo betaláctamico fusionado a uno pirrolínico compartiendo un nitrógeno y tienen un enlace insaturado entre C2 y C3 (**Figura 10**) <sup>46, 47</sup>.

Por otra parte esta clase de antibióticos incluyen a las tienamicinas, ácidos olivánicos, carpetimicinas, asprenomicinas, pluracidomicinas, entre otros compuestos naturales y semisintéticos, estos difieren principalmente en la configuración de las cadenas laterales en C2 y C6. Actualmente los carbapenémicos más utilizados en la práctica clínica son el ertapenem, imipenem, meropenem <sup>45, 47</sup>.



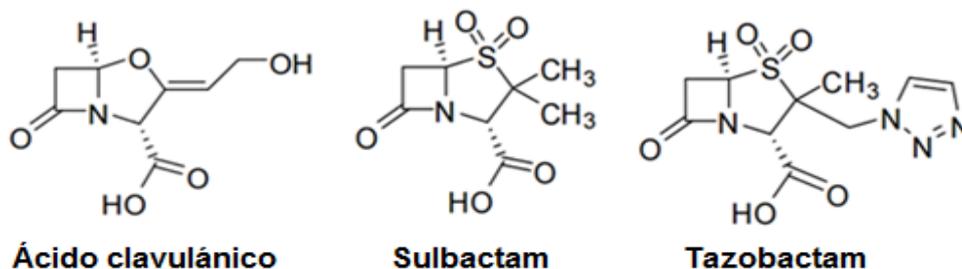
**Figura 10.** Núcleo estructural de los carbapenémicos <sup>47</sup>.



#### 7.4.12 Inhibidores de las $\beta$ -lactamasas

La existencia de los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas se conoce desde los años 50's, pero su utilidad terapéutica fue una realidad hasta 1977, cuando Reading y Cole informaron el descubrimiento del ácido clavulánico producido por *Streptomyces clavuligerus*, al ser administrado conjuntamente con un antibiótico betaláctamico se observó que tenía la capacidad de inhibir a las  $\beta$ -lactamasas y que actuaban sinérgicamente frente a bacterias resistentes. El descubrimiento del ácido clavulánico como el primer inhibidor de  $\beta$ -lactamasas clínicamente útil fue el punto de referencia de una investigación intensiva que resultó en el descubrimiento de otros compuestos, tales como sulbactam y tazobactam (**Figura 11**)<sup>48</sup>. Hasta la fecha estos compuestos se siguen utilizando en la medicina clínica y son los principales inhibidores de  $\beta$ -lactamasas que se utilizan contra las enzimas cromosómicas o plasmídicas de las bacterias Gram negativas y Gram positivas<sup>47, 48</sup>.

Las combinaciones de betalactámicos/inhibidores son diversas entre estas se pueden encontrar las siguientes amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam, estas combinaciones de antimicrobianos se utilizan para el tratamiento de infecciones causadas por una amplia variedad de bacterias patógenas potenciales en pacientes con inmunodepresión y con infecciones mixtas por bacterias Gram negativas o Gram positivas. El ácido clavulánico y el tazobactam son superiores al sulbactam en la actividad contra las  $\beta$ -lactamasas mediadas por plásmidos de bacterias Gram negativas, aunque el espectro de su actividad es diferente, algunas clases de enzimas de espectro extendido son resistentes a la actividad de los tres compuestos<sup>49, 50</sup>.



**Figura 11.** Inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas<sup>49</sup>.

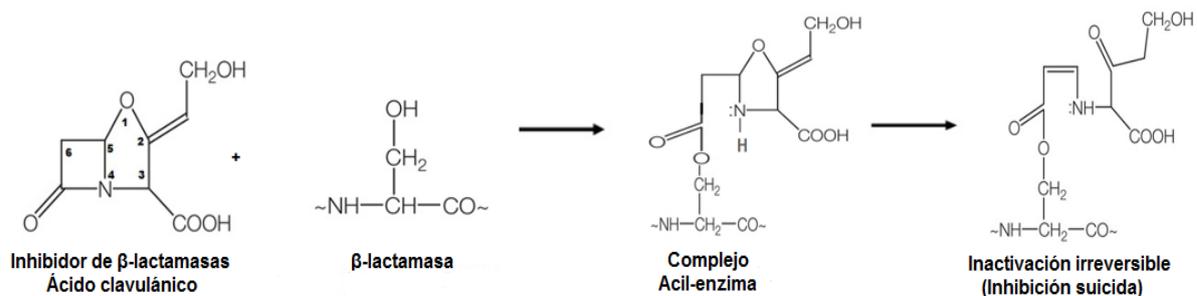


Los Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas tienen la capacidad de desactivar enzimas, esto se debe a las siguientes características:

- Tienen un protón en la posición 6- $\alpha$ .
- La acidez en 6- $\alpha$  y la estructura del anillo betaláctamico ( $\beta$ -lactama) favorecen la formación de un doble enlace, habitualmente en la posición C6-C5, que da lugar a una enzima acilada muy estable que no se hidroliza<sup>50</sup>.

Para que estos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas sean eficaces deben llegar al sitio en donde se encuentran las enzimas  $\beta$ -lactamasas con la finalidad de ser desactivadas, como primer paso los inhibidores deben atravesar primero los canales porínicos hasta llegar al espacio periplásmico en donde son excretadas las  $\beta$ -lactamasas (esto sólo ocurre en bacterias Gram negativas), el inhibidor debe llegar a concentraciones convenientes para lograr la inactivación de las  $\beta$ -lactamasas y al mismo tiempo proteger al antibiótico betaláctamico de la hidrólisis, este hecho es imprescindible para que el betaláctamico pueda llegar a las PBP's diana<sup>51</sup>.

Inicialmente los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas actúan por inhibición competitiva por analogía al sustrato de la enzima, que es seguida de una reacción química más lenta tras la unión al centro catalítico, que da lugar a una inactivación transitoria o permanente de la enzima (inhibición no competitiva). Un ejemplo es el mecanismo de acción del ácido clavulánico que al tener una interacción con la  $\beta$ -lactamasa se forma un complejo acil-enzima, en esta reacción ambos productos se inactivan dando lugar a una inhibición suicida (**Figura 12**)<sup>50, 51</sup>.



**Figura 12.** Mecanismo de inactivación del ácido clavulánico frente una enzima  $\beta$ -lactamasa en la que se genera inactivación irreversible<sup>50, 51</sup>.



## 7.5 Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia a los antibióticos constituye un problema serio de salud pública a nivel mundial, especialmente cuando no existen políticas apropiadas para la utilización de antimicrobianos, esto contribuye al uso indiscriminado y la aparición de cepas bacterianas multirresistentes, transmisibles que se diseminan rápidamente. Desde los años 90's hacia hasta la fecha se han presentado con mayor frecuencia los casos de resistencia bacteriana a múltiples antibióticos. Durante el periodo de 1991 a 1999 se reportó que los asilamientos de bacterias Gram negativas (*Salmonella sp.* y *Campylobacter sp.*), incrementaron su resistencia a ciprofloxacino de un 0% a un 13% <sup>52</sup>.

Se entiende como resistencia bacteriana a la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antimicrobiano a dosis terapéuticas. Esta resistencia puede estar mediada por genes cromosómicos o material extracromosómico (DNA plasmídico). La resistencia cromosómica aparece por mutación, por lo contrario los plásmidos y transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias <sup>50</sup>.

Las bacterias desarrollan diferentes mecanismos de resistencia que las ayudan a sobrevivir en el momento que se encuentran frente a un antimicrobiano o inclusive cuando no han tenido un previo contacto con el fármaco.

El tipo de resistencia que presentan o adquieren las bacterias se dividen en:

- a) **Resistencia mediada por factores ambientales:** Son características físicas o químicas del ambiente que alteran en forma directa a la bacteria o alteran su respuesta ante el fármaco. Por ejemplo: pH, atmósfera anaerobia, concentración de cationes ( $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ).
- b) **Resistencia mediada por microorganismos:** Se produce por rasgos de los microorganismos que son codificados genéticamente, se divide en resistencia intrínseca y resistencia adquirida <sup>51</sup>.



La resistencia intrínseca es aquella que presenta resistencia a ciertos antibióticos en forma natural (no hay exposición previa a los antibióticos), esto se debe a que algunas bacterias no tienen el sitio diana para que el antibiótico ejerza su acción o porque no permiten la entrada en el interior de ellas. De manera general las bacterias Gram negativas son resistentes a diferentes antibióticos, antisépticos y desinfectantes. Esta característica es conferida por membrana externa que es semipermeable y se encuentra conformada principalmente por lipopolisacárido, esto permite la entrada de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular y limita la entrada de compuestos hidrofóbicos, tales como los antibióticos<sup>52, 53</sup>.

En la resistencia adquirida las bacterias pueden presentar resistencia a los distintos antimicrobianos a consecuencia de mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético mediante la transferencia de genes de resistencia a través de los cuatro mecanismos siguientes:

- a) **Transducción:** Es la transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano cuando un fago atemperado (genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano) durante su fase de ensamblaje, encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina transducción generalizada; y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano pero se conserva el genoma viral, se habla de transducción especializada.
- b) **Conjugación:** Es la transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra por medio de un *pili* sexual, estos plásmidos usualmente contienen genes que codifican mecanismos de resistencia a los antibióticos.
- c) **Transformación:** Es la transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma.
- d) **Transposición:** Es una recombinación generada por los transposones que son secuencias genéticas especializadas y tienen la capacidad de moverse de un área del cromosoma bacteriano a otra o entre cromosomas y plásmidos o ADN de bacteriófagos<sup>51, 53</sup>.



Estos mecanismos de transferencia que contienen los genes de resistencia no son exclusivos de cada especie, normalmente se comparten e incluso presentan la capacidad de transferirse la resistencia de un género bacteriano a otro <sup>52</sup>.

### 7.5.1 Mecanismo de resistencia en bacilos Gram negativos en antibióticos no betalactámicos

Los mecanismos de resistencia bacteriana tienen como objetivo evitar que el antibiótico tenga efecto contra la bacteria, es por esta razón que los microorganismos tienen diversas estrategias para evadir la actividad del fármaco, en seguida se presentan los diferentes mecanismos que utilizan las bacterias Gram negativas (**Tabla 6**) <sup>54</sup>.

**Tabla 6.** Mecanismos de resistencia <sup>54, 55, 56</sup>.

Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas	Descripción de los mecanismos de resistencia
<b>Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa</b>	Las proteínas de membrana externa conocidas como porinas pueden presentar variaciones en número y tamaño, funcionan como canales acuosos, esto genera una ruta hidrofóbica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. El número de canales porinicos activos determinan el acceso de antibióticos, si el antimicrobiano no logra entrar a la bacteria no podrá llegar a su sitio diana. La resistencia intrínseca de las bacterias Gram negativas como <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Enterococcus sp</i> se relaciona con la pequeña cantidad de porinas que presentan en las membranas.
<b>Resistencia a través de la modificación enzimática</b>	Es uno de los principales mecanismos que poseen las bacterias para la inhibición de los antibióticos es la modificación enzimática, que dan como resultado la degradación de antibióticos transformándolas en sustancias inactivas. Un ejemplo de estas enzimas son O-fosforo-transferasas (OPH), O-adenil-transferasas (ANT) y N-acetil-transferasas (ACT) que modifican la estructura química de los aminoglucósidos.



<p><b>Resistencia por modificación del sitio blanco</b></p>	<p>La modificación en el sitio blanco evita el efecto bactericida/bacteriostático de los antibióticos, lo que genera la resistencia en bacterias Gram negativas.</p> <p>La resistencia a fluoroquinolonas es un ejemplo de los efectos causados por la mutación que afectan a los sitios blanco (ADN girasa y topoisomerasa) del antibiótico. Además en antimicrobianos como los betalactámicos, glucopéptidos y quinolonas, pueden disminuir su eficacia debido a cambios o producción de nuevos sitios blancos.</p>
<p><b>Sistema de bombas de expulsión</b></p>	<p>Especialmente las bacterias Gram negativas tienen un sistema de expulsión o eflujo tripartita, que les permite enviar el antimicrobiano hacia el exterior de forma relativamente inespecífica, este fenómeno está implicado en la resistencia intrínseca, debido a que expulsa de forma activa a diversos antibióticos hacia el exterior de la bacteria, con esto la cantidad de antibióticos intracelular se reduce y no se puede unir al sitio diana. Este sistema particularmente se asocia con resistencia a múltiples antimicrobianos catiónicos de importancia clínica.</p>

### 7.5.2 Mecanismo de resistencia en bacilos Gram negativos en antibióticos betalactámicos

A pesar de que los antibióticos betalactámicos fueron muy eficaces cuando se comenzaron a utilizar después de su empleo como tratamiento se presentaron los primeros casos de resistencia por medio de enzimas, modificación de sus blancos o disminución de la capacitación intracelular del fármaco <sup>57</sup>.

La resistencia que presentan los bacilos Gram negativos a los antibióticos betalactámicos es característica de cada género y especie, existen diversos factores relacionados como es la permeabilidad, afinidad por las PBPs y la presencia de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas o cromosómicas. Estos mecanismos de resistencia se pueden transferir por medio de fenómenos de intercambio



génico, especialmente por conjugación en donde se transfieren plásmidos que codifican la resistencia a los antibióticos betalactámicos<sup>58</sup>.

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos son:

a) Alteraciones en la permeabilidad

La membrana externa juega un papel importante en la resistencia hacia los antibióticos betalactámicos, en las bacterias Gram negativas las porinas son la vía de entrada de muchos antimicrobianos, no obstante algunas mutaciones o la supresión de porinas limitan el acceso de los mismos al espacio periplásmico es importante considerar el tamaño, la carga y el grado de hidrofobicidad de las moléculas del antibiótico debido a que estos repercuten en la penetración de las células bacterianas<sup>57, 58</sup>.

b) Bombas de expulsión efflux

Las bacterias Gram negativas a diferencia de otros microorganismos, se caracterizan por ser intrínsecamente más resistentes a los antibióticos, esto se debe a que tienen una menor permeabilidad a su membrana externa que actúa como una barrera física que retarda la entrada de los antibióticos.

Las bombas de expulsión son capaces de eliminar varios tipos o familias de antibióticos (incluyendo los betalactámicos), este mecanismo ocurre de forma activa debido a la energía de protones que se deriva del potencial electroquímico que está dirigido de un lado a otro de la membrana citoplasmática. Esta familia de transportadores permite expulsar a los antibióticos de forma activa hacia el exterior de la célula bacteriana con el fin de que el antibiótico betalactámico no pueda interactuar con en el medio intracelular y de esta forma evita la unión del fármaco a su diana<sup>56</sup>.

c) Modificación de la diana en las PBPs

Las diferentes alteraciones en las PBPs (mutaciones, y modificación de la afinidad) pueden dificultar la unión del betalactámico a la proteína, logrando inhibir su actividad. Este mecanismo de resistencia es exclusivo de los microorganismos Gram positivos y lo expresan algunas especies como *S. pneumoniae*, *S. aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecium*<sup>59</sup>.



#### d) Hidrolisis enzimática del antibiótico por $\beta$ -lactamasas

La resistencia que presentan las bacterias Gram negativas y Gram positivas hacia los antibióticos betalactámicos, se da por medio de la producción de  $\beta$ -lactamasas ya que éstas realizan la hidrolisis del anillo betalactámico, este mecanismo de resistencia bioquímica es de los más frecuentes dentro del área clínica<sup>57</sup>.

El modo de acción de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y BLEEs es el mismo porque pertenecen a la misma clase de enzimas que son las serina- $\beta$ -lactamasas que se caracterizan por tener en su centro activo serina. Por esta razón la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas operan a través del mecanismo éster de serina, el cual está compuesto por reacciones de acilación-desacilación, con la conversión de la  $\beta$ -lactamasa a una acil-enzima<sup>60</sup>.

La acción de las  $\beta$ -lactamasas inicia con la interacción entre estas enzimas y el anillo  $\beta$ -lactámico para producir un complejo no covalente, esto ocurre porque la  $\beta$ -lactama sufre un ataque nucleofílico por parte del hidroxilo libre en la cadena lateral de un residuo de serina que se encuentra en el sitio activo de las  $\beta$ -lactamasas, el cual ataca al carboxilo rompiendo a su vez el enlace amida involucrado, esta reacción produce un éster de acil-covalente, posteriormente la hidrólisis del éster finalmente culmina con el proceso, dándose la liberación de la enzima en forma activa, quedando el antibiótico betalactámico biológicamente inactivo debido a la ruptura irreversible del enlace amida del anillo  $\beta$ -lactama <sup>61</sup>.

Un gran número de betalactámicos son hidrolizados por este mecanismo producido por las  $\beta$ -lactamasas, un ejemplo es la penicilina cuando actúa la  $\beta$ -lactamasa hidrolizado el anillo betalactámico que es parte fundamental de su núcleo, el producto de esta interacción da como resultado la formación del ácido peniciloico que es una molécula inactiva, lo que tiene como repercusión que la unión a las PBPs ya no sea eficaz de modo que la síntesis de la pared celular puede continuar, manteniendo a la célula bacteriana en un estado vital **(Figura 13)** <sup>60, 61, 62</sup>.

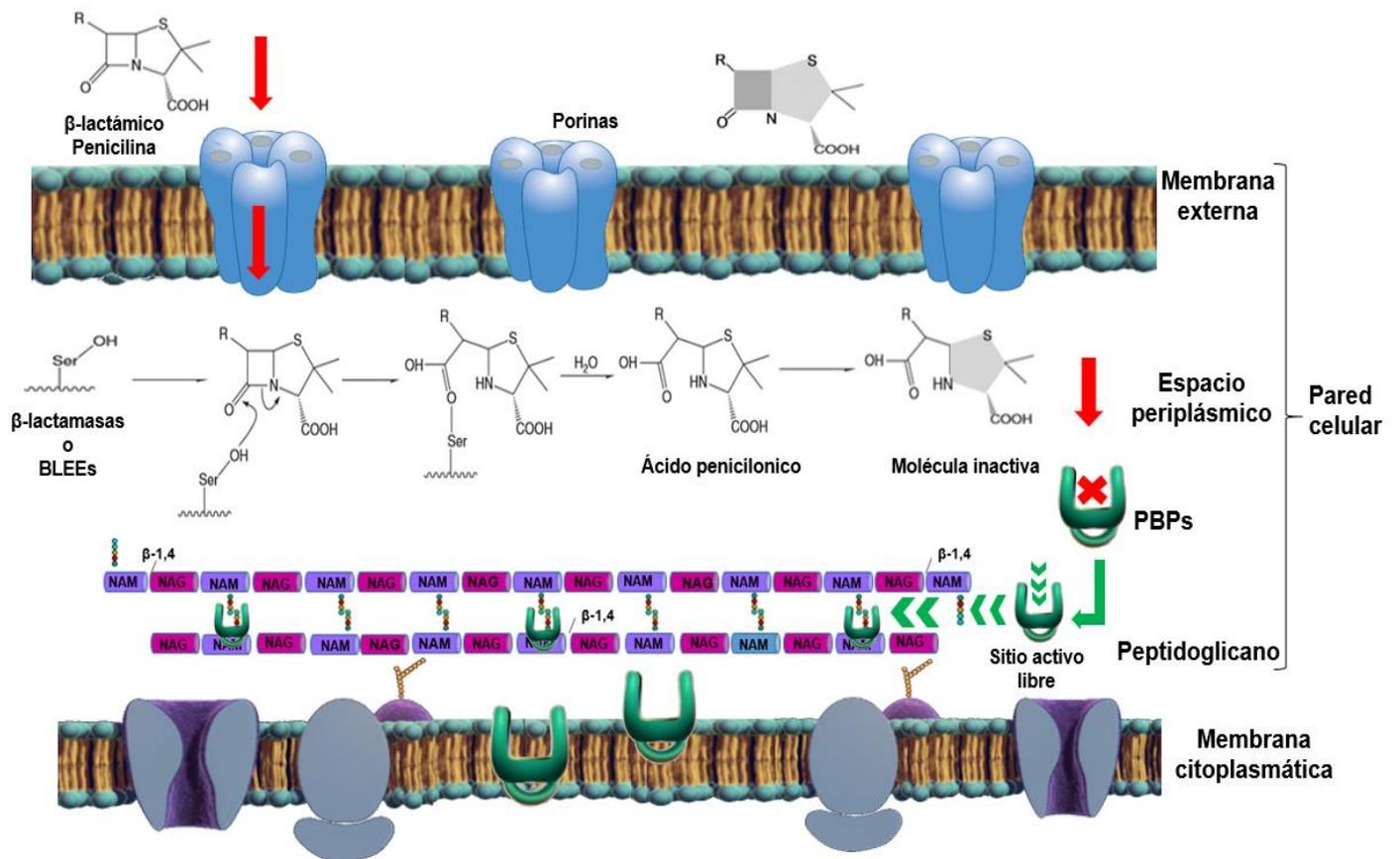


Figura 13. Mecanismo de acción por  $\beta$ -lactamasas <sup>60, 61, 62</sup>

### 7.5.3 $\beta$ -lactamasas

Pertencen a una superfamilia de serina proteasas y metalo proteasas, tienen la característica de ser enzimas catalíticas con estructura cuaternaria que contiene hojas  $\beta$ . Existen muchas variedades de estas enzimas, se pueden distinguir en base a sus propiedades catalíticas y moleculares, pero sólo la determinación de la secuencia de aminoácidos proporciona información sobre la cual se puede basar una filogenia molecular, es importante mencionar que las  $\beta$ -lactamasas se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias Gram positivas y Gram negativas <sup>60</sup>.

En la actualidad se tiene conocimiento que estas enzimas y las PBPs tienen un origen evolutivo en común, se ha presentado evidencias que apoyan el concepto del papel fisiológico que desempeñan, así como en la analogía de los aminoácidos que las conforman <sup>61</sup>.



Las  $\beta$ -lactamasas existieron mucho antes de que los antibióticos fueran utilizados clínicamente, una prueba de esto fue el aislamiento de *Bacillus licheniformis* productor de  $\beta$ -lactamasas que fue aislado del suelo unido en plantas recogidas en el siglo XVII, con este hecho se logró estimar una antigüedad de dos mil millones de años basada en la filogenia y la diversidad actual de las  $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas por su ubicuidad en diversos entornos han llevado a muchas especulaciones sobre su origen y transferencia de factores de resistencia entre el medio ambiente y los seres humanos <sup>62</sup>.

La importancia de estas enzimas no sólo radica en los grupos de antibióticos que pueden hidrolizar, sino en la diversidad de  $\beta$ -lactamasas que se han reportado en la actualidad que son más de 340 para bacterias Gram negativas y Gram positivas, algunas difieren de otras por sólo uno o varios aminoácidos. Se estima que en el número de  $\beta$ -lactamasas se irá incrementando a través de los años por la inevitable evolución de estas enzimas, esto presentara más repercusiones en la terapéutica de las enfermedades infecciosas <sup>63</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas son consideradas como una de las principales causas de resistencia clínica que particularmente expresan las bacterias y se encuentran extendidas alrededor del mundo, esto dificulta el desarrollo de nuevos antibióticos betalactámicos, debido a que son capaces de hidrolizar a varios integrantes de este grupo de fármacos. La especificidad de una  $\beta$ -lactamasa por un betaláctamico es un elemento importante que se debe considerar porque las mutaciones en uno o más aminoácidos no sólo pueden generar una hidrólisis sino también aumentar el espectro de las  $\beta$ -lactamasas <sup>61, 63</sup>.

Existe una diferencia importante en como son secretadas las  $\beta$ -lactamasas, esto depende si se trata de una bacteria Gram negativa o Gram positiva. En el caso de las Gram negativas los betalactámicos entran a la célula a través de porinas encontrando a las  $\beta$ -lactamasas en el espacio periplásmico, hidrolizando a los betalactámicos antes de que puedan llegar a su diana farmacológica. En comparación con las bacterias Gram positivas las  $\beta$ -lactamasas son liberadas extracelularmente en el medio circundante de forma que los betalactámicos son inactivados en el medio que las rodea antes de que estas tengan oportunidad de entrar a la célula <sup>64</sup>.



Las  $\beta$ -lactamasas pueden ser codificadas en cromosomas o elementos genéticos autotransferibles tales como plásmidos y transposones, los genes que codifican para estas enzimas están distribuidos en las diferentes especies bacterianas y algunas se encuentran preferentemente codificadas en el cromosoma<sup>62</sup>.

#### 7.5.4 Clasificación de $\beta$ -lactamasas

La clasificación de  $\beta$ -lactamasas es compleja, muchos esquemas se han publicado durante medio siglo, haciendo que la clasificación sea un poco confusa para quienes no están familiarizados con la misma. La primera clasificación se basó en actividades biológicas de las penicilinasas y cefalosporinasas, una de las clasificaciones más complejas fue propuesta por Richmond y Sykes en 1973, posteriormente Sykes con ayuda de otros autores completaron esta clasificación al incluir a las bacterias Gram negativas<sup>64</sup>.

Diversos investigadores han hecho aportaciones acerca de estas enzimas pero actualmente las  $\beta$ -lactamasas se clasifican más comúnmente según dos esquemas generales: El primero fue la clasificación molecular Ambler en 1980, años más tarde se presentó el sistema de clasificación funcional Brush-Jacoby-Meideros en 1995. La propuesta del esquema Ambler fue dividir a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases principales (A-D). La base de este esquema de clasificación recae en la homología de proteínas (similitud de aminoácidos). Las  $\beta$ -lactamasas de las clases A, C y D son serina- $\beta$ -lactamasas (serina enzimas) por su centro activo de serina. En contraste con las enzimas de clase B que son metalo- $\beta$ -lactamasas (metalo enzimas), debido a poseen una o más moléculas de zinc (**Tabla 6**)<sup>65</sup>.

La clasificación de Bush-Jacoby-Meideros está basada en el agrupamiento de los sustratos específicos que las enzimas hidrolizan, adicionalmente también incluye los inhibidores de estas enzimas que son ácido clavulánico y EDTA, en este sistema existen 4 grupos principales y subgrupos múltiples, esta clasificación es considerada con más relevancia para un microbiólogo debido a que facilita el reconocimiento de los sustratos e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. (**Tabla 7**)<sup>64,65, 66</sup>.



**Tabla 7.** Correspondencia entre la clasificación de Ambler y Bush<sup>64, 65, 66</sup>.

Clasificación de Ambler	Clasificación de Bush et al.
Clase A (TEM,SHV,PC, CTX-M)	Grupos 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2e, 2f
Clase B (metalo enzimas)	Grupos 3a, 3b
Clase C (Cefalosporinas)	Grupo 1
Clase D (Oxacilinasas)	Grupo 2d, 2de, 2df

La clasificación actual de las  $\beta$ -lactamasas conforme al esquema de Bush-Jacoby-Meideros es la siguiente:

a) Clase molecular A

Es una de las clases de mayor importancia, pertenecen al grupo **2** de Bush, está conformado por enzimas serina-proteasas, las dos  $\beta$ -lactamasas más representativas de esta clase son TEM-1 y SHV-1, se encuentran comúnmente en la familia *Enterobacteriaceae*, tienen la característica de ser penicilinasas con actividad relativamente pobre frente a cefalosporinas. Las enzimas TEM y SHV son altamente eficaces, su expresión confiere niveles muy altos de resistencia a la ampicilina, son codificadas en plásmidos aunque también se encuentran en otros elementos génicos móviles (transposones), reportes globales afirman que SHV es la  $\beta$ -lactamasa intrínseca cromosómica encontrada en la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae*<sup>61</sup>.

La creciente prevalencia de la resistencia mediada por TEM y SHV fue una de las inspiraciones para el desarrollo de cefalosporinas de espectro extendido, cuyas modificaciones disminuyeron la actividad de las enzimas TEM y SHV, pero el uso generalizado de estos agentes condujo a la aparición y propagación de mutantes TEM y SHV conocidas como ( $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, BLEEs)<sup>66, 67</sup>.



Dentro de la clase **A** se encuentra el grupo **2**, que a su vez está dividido en subgrupos que fueron clasificados de acuerdo Karen Bush, George Jacoby y Antone Meideros, estos son los siguientes:

El grupo funcional **2a** representa penicilinasas que hidrolizan bencilpenicilinas (penicilina G), aminopenicilinas (amoxicilina y ampicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilina (piperacilina) y son inhibidas por el ácido clavulánico <sup>61</sup>.

El grupo **2b** se compone de enzimas penicilinasas de amplio espectro que inhiben a todas las penicilinas (bencilpenicilina, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas) y a las cefalosporinas de 1<sup>a</sup> generación y cefoperazona, no tienen actividad contra cefamicinas y son inhibidas por el ácido clavulánico, algunas enzimas que conforman este subgrupo son TEM-1, TEM-2 y SHV-1 <sup>62</sup>.

Por otra parte el subgrupo **2be** pertenece a las BLEEs, la **e** indica que se trata de enzimas de espectro extendido incrementado, tienen la capacidad de hidrolizar a todas las penicilinas (bencilpenicilina, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilina), cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación (excepto cefamicinas), monobactámicos (aztreonam) y son inhibidas por el ácido clavulánico. Las enzimas más representativas de este grupo son las derivadas de TEM-3, TEM-4, TEM-5, TEM-26, SHV-2 a SHV-6 y CTX-M; menos frecuentes las BES-2, PER-1, VEB-1, TLA-1 <sup>63, 64</sup>.

El grupo funcional **2br** representa a las enzimas resistentes a penicilinas en combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, especialmente ácido clavulánico, la mayoría de estas enzimas se derivan de mutaciones puntuales en penicilinasas TEM-1 y TEM-2, son conocidas como TEMs resistentes a los inhibidores (IRTs) y tienen escasa actividad hidrolítica hacia las cefalosporinas.

Estas enzimas IRTs se han reportado en *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *Enterobacter cloacae* y *shigella sonnei* que producen enzimas como TEM-30 (IRT-2), TEM-31(IRT-1) Y TEM-37(IRT-7). Los aislamientos que contienen IRT siguen siendo susceptibles a



cefalosporinas de primera generación, cefamicinas y carbapenémicos, en los últimos años se ha registrado un aumento de enzimas tipo SHV resistentes a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, las que se han reportado son (SHV-10, SHV-49, SHV-52, SHV-52, SHV-56 y SHV-92) <sup>64</sup>.

El grupo funcional **2c** representa carbenicilinasas o enzimas PSE, se caracterizan por hidrolizar penicilina y con una mayor actividad a las carboxipenicilinas (ticarcilina), las enzimas más representativas son PSE-1, PSE-3 y PSE-4 <sup>64, 65</sup>.

El grupo **2e** representa enzimas a menudo denominadas cefuroximasas, son inhibidas por el ácido clavulánico y tienen una alta actividad hidrolítica contra las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, con la excepción de las cefamicinas, tienen la propiedad de ser enzimas cromosómicas inducibles. Un ejemplo de estas enzimas es la cefalosporinasa que produce *P. vulgaris* <sup>65</sup>.

El grupo **2f** son enzimas carbapenemasas pertenecen a la clase molecular A, son inhibidas a bajo nivel por el ácido clavulánico, tienen la capacidad de inactivar a todas las penicilinas (bencilpenicilina, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilina), cefalosporinas de (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación), monobactámicos (aztreonam) carbapenémicos (ertapenem, imipenem, meropenem), estas enzimas son KPC-1, IMI-1 que es producida por diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae y SME-1 producida por *S. marcescens* <sup>66, 67</sup>.

#### b) Clase molecular B

Las  $\beta$ -lactamasas de clase B pertenecen al grupo funcional 3, se caracterizan por ser metalo proteasas es decir metalo  $\beta$ -lactactamasas (MBL), requieren de un cofactor metálico generalmente zinc para su actividad, estas enzimas juegan un papel en la resistencia intrínseca a betalactámicos y son una fuente de resistencia adquirida a los carbapenémicos en bacterias Gram negativas. Las carbapenemasas confieren resistencia a una amplia gama de compuestos  $\beta$ -lactámicos, esto incluye a todas las penicilinas, cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación, carbapenémicos, incluyendo cefamicinas y son resistentes a la



inactivación por ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam pero son susceptibles al EDTA. Sin embargo los monobactámicos (aztreonam) es en muchos casos el único betaláctamico disponible con actividad contra cepas productoras de metaloenzimas. Por otra parte algunas  $\beta$ -lactamasas de clase B están codificadas por plásmidos que contienen genes (*bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>) generalmente se encuentran en enterobacterias y bacterias no fermentadoras (*P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*). Una de las enzimas más representativas de este grupo es IMP-1 que fue identificada por primera vez en aislados clínicos de *Serratia sp* y *Pseudomonas sp*, pero también se han encontrado en *Klebsiella sp*, *Alcaligenes sp*, *Acinetobacter sp*, y *shigella sp*. Esta enzima se encuentra con mayor frecuencia en Asia, Europa y Canadá. Por otra parte se han reportado que en los últimos años, las metaloenzimas de la variedad NDM (New Delhi MBL) se han vuelto cada vez más frecuentes, aunque se originaron en la India, ahora pueden encontrarse en hospitales de todo el mundo<sup>64, 66</sup>.

#### c) Clase molecular C

Las  $\beta$ -lactamasas de la clase C son parte del grupo 1, estas enzimas se encuentran presentes en casi todas las bacterias Gram negativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia sp*, *Salmonella sp*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp*, y *Stenotropomonas maltophilia* siendo la principal excepción). Es importante mencionar que *K. pneumoniae* es la bacteria que destaca en la producción de enzimas de clase C, las más frecuentes son (MIR-1, CMY-1, FOX-1 y MOX-1). Estas enzimas cefalosporinasas, son llamadas AmpC porque hidrolizan Ampicilina C, tienen la característica de ser constitutivas o inducibles, encuentran codificadas cromosómicamente a través del gen ampC, son particularmente importantes en aislamientos clínicos de *C. freundii*, *E. aerogenes* y *E. cloacae*, *M. morgani*, *P. aeruginosa* y *S. marcescens*<sup>67</sup>.

Estas  $\beta$ -lactamasas de clase C hidrolizan a todas las penicilinas (aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas), cefalosporinas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>, (3<sup>a</sup> generación en bajo nivel), inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y cefamicinas, particularmente son inhibidas por cloxacilina y no tienen actividad con



cefalosporinas de 4<sup>a</sup> generación (cefepima y ceftirome) ni a carbapenémicos. La mayoría de las enzimas de la clase C son resistentes a la inhibición por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero estudios recientes comprueban que son inhibidas por avibactam, que es un fármaco que forma parte de una nueva generación de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, pero no pertenecen al grupo de los antibióticos betalactámicos. Por otra parte, la producción constitutiva de alto nivel de la  $\beta$ -lactamasa AmpC es generada por una mutación en el gen ampD, estudios afirman que la pérdida de porinas en aislados clínicos con enzimas AmpC codificadas por plásmidos da como resultado la resistencia a carbapenémicos<sup>67, 68</sup>.

#### d) Clase molecular D

Las  $\beta$ -lactamasas de clase D comprenden oxacilinasas, corresponden al grupo funcional **2** de Bush, este grupo se divide a la vez en un subgrupo **2d**. Estas enzimas son llamadas OXA debido a que hidrolizan oxacilina, cloxacilina, meticilina han sido descritas con mayor frecuencia en la familia *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter sp* y *Pseudomonas sp*, datos recientes sugieren que estas enzimas pueden haberse originado en *Acinetobacter sp*. Las enzimas OXA confieren resistencia a una amplia variedad de penicilinas, incluyendo a cefoperazona, son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico e inactivadas por cefalosporinas de 4<sup>a</sup> generación<sup>68</sup>.

Su localización frecuente en plásmidos facilita la propagación, algunas enzimas mutantes de OXA hidrolizan carbapenémicos, el primer caso de una serina carbapenemasa fue reportada en *A. baumannii* fue ARI-1 (OXA-23) en 1985, aunque las carbapenemasas OXA hidrolizan ineficazmente el imipenem, su presencia en una bacteria activa una bomba efflux o una mutación de porina con esto puede conferir niveles clínicamente significativos de resistencia<sup>67, 68</sup>.

La clasificación de las  $\beta$ -lactamasas conforme al esquema de Bush-Jacoby-Meideros se presenta en resumen en la tabla (**Tabla 8**).



**Tabla 8.** Grupos funcionales de las  $\beta$ -lactamasas basados en el esquema de Bush, Jacoby y Medeiros <sup>65, 66, 67, 68</sup>.

Grupo Funcional	Clase molecular	Substratos preferidos	Inhibidos por Ácido Clavulánico	Inhibidos por EDTA	Enzimas representativas
1	C	<b>Penicilinas</b> (Bencilpenicilina, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilina), <b>Cefalosporinas</b> de 1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> y 3 <sup>a</sup> generación, (3 <sup>a</sup> generación en bajo nivel), <b>Inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas</b> y <b>Cefamicinas</b> . No tienen actividad contra carbapenémicos (Inhibidas por Cloxacilina).	No	No	<b>Cefalosporinasas</b> AmpC, ( <i>E. cloacae</i> P99 MRI-1), ACT-1, CMY-2, FOX-1
2a	A	<b>Bencilpenicilina</b> (Penicilina G), <b>Aminopenicilinas</b> (Amoxicilina y Ampicilina), <b>Carboxipenicilinas</b> (Carbenicilina, Ticarcilina), <b>Ureidopenicilina</b> (Piperacilina).	Si	No	<b>Penicilinasas de espectro reducido</b> PC1
2b	A	<b>Penicilinas</b> (Bencilpenicilina, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilina), <b>Cefalosporinas</b> 1 <sup>a</sup> generación y Cefoperazona. (No tienen actividad en Cefamicinas).	Si	No	<b>Penicilinasas de amplio espectro</b> TEM-1, SHV-1
2be	A	<b>Penicilinas</b> (Bencilpenicilina, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilina), <b>Cefalosporinas</b> de (1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> y 4 <sup>a</sup> generación), <b>Monobactámicos</b> (Aztreonam). <b>Excepto Cefamicinas</b> (Cefoxitina, Cefotetan).	Si	No	<b><math>\beta</math>-lactamasas de espectro extendido (BLEEs)</b> TEM-BLEEs, SHV-BLEEs, CTX-M, PER-1, VEB-1
2br	A	<b>Penicilinas en combinación con inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas</b> (Ampicilina/Sulbactam, Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina/Ácido Clavulánico)	No	No	<b>Enzimas resistentes a inhibidores</b> TEM-IRTs, SHV-10
2c	A	<b>Penicilinas</b> (Bencilpenicilina, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilinas).	Si	No	<b>Carbenicilinasas</b> PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	<b>Penicilinas</b> (Bencilpenicilina, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilina), <b>Cloxacilina</b> y Cefoperazona	Variable	No	<b>Oxacilinasas</b> OXA-1, OXA-10
2e	A	<b>Cefalosporinas</b> 1 <sup>a</sup> y 2 <sup>a</sup> generación, <b>Aminopenicilinas</b> (No tienen actividad contra Cefamicinas)	Si	No	<b>Cefuroximasas</b> Cefalosporinasas de <i>P. vulgaris</i>
2f	A	<b>Penicilinas</b> (Bencilpenicilina, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilina), <b>Cefalosporinas</b> de 1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> y 4 <sup>a</sup> generación, <b>Monobactámicos</b> (Aztreonam) <b>Carbapenémicos</b> (Ertapenem, Imipenem, Meropenem).	Si	No	<b>Carbapenemasas</b> KPC-1, NMCA, SME-1
3	B	<b>Penicilinas</b> (Bencilpenicilina, Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilina), <b>Cefalosporinas</b> de 1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> y 4 <sup>a</sup> generación, <b>Carbapenémicos</b> , <b>Cefamicinas</b> e <b>Inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas</b> . (Inhibidas por EDTA), No tienen actividad contra Monobactámicos (Aztreonam)	No	Si	<b>Carbapenemasas Metalo <math>\beta</math>-lactamasas (MBL)</b> L1, CcrA, VIM-1, IMP-1



### 7.5.5 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)

Son enzimas de gran relevancia en el área clínica debido a que este grupo de enzimas se encuentran en continua expansión. Las BLEEs han surgido por consecuencia de distintas mutaciones en los genes que codifican los aminoácidos que conforman a las  $\beta$ -lactamasas clásicas de amplio espectro (grupo **2b**: TEM-1 y SHV1). En la mayoría de los casos, las mutaciones de estas enzimas hacen que las BLEEs sean más susceptibles a la inactivación por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas <sup>69</sup>.

Las BLEEs se definen como enzimas capaces de hidrolizar todas las penicilinas, cefalosporinas (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación) y monobactámicos (aztreonam). Es importante destacar que no pueden hidrolizar cefamicinas y carbapenémicos debido a su estructura molecular que les confiere estabilidad, además son inhibidas por el ácido clavulánico. La gran mayoría de estas enzimas se encuentran codificadas por plásmidos <sup>69, 70</sup>.

### 7.6 Tipos de BLEEs

En los últimos años se han identificado más de 200 tipos de BLEEs que se han clasificado de acuerdo a los criterios siguientes: afinidad de hidrolisis a sustratos específicos, punto isoeléctrico, tamaño de la molécula y homología de la secuencia de aminoácidos. Habitualmente las BLEEs derivan de las enzimas TEM o SHV y puede haber mutaciones puntuales en el gen *bla* que las codifica lo que incrementa el espectro fenotípico<sup>70</sup>.

A continuación se describen los diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

#### 7.6.1 TEM

Las BLEEs tipo TEM, junto con las SHV, habían sido hasta hace unos años las más frecuentemente encontradas en los EUA y el resto del mundo. TEM-1 fue la primera  $\beta$ -lactamasa de la clase A reportada por primera vez en 1965, aislada de *E. coli* proveniente de un paciente en Atenas, Grecia, llamado Temoneira (por ello la designación de TEM), esta enzima hidroliza la ampicilina a una tasa mayor que cefalotina, posee una actividad contra cefalosporinas de amplio espectro y es inhibida por el ácido clavulánico. La



sustitución de un único aminoácido en las posiciones 104, 164, 238 y 240 produce el fenotipo de BLEEs, se ha reportado que las BLEEs con mayor espectro usualmente tienen más de una sustitución diferente en la posición de sus aminoácidos. Por otra parte hasta la fecha se conocen más de 160 variantes de TEM, en gran parte BLEEs, no obstante esta familia integra a las enzimas IRT (*inhibitor resistant TEM*) y CMT (*complex mutant TEM*)<sup>68</sup>.

### 7.6.2 SHV

Las BLEEs tipo SHV (su nombre está en relación al término de una variable sulfhidrido), proceden de las  $\beta$ -lactamasas SHV-1 que se codifica en el cromosoma de más del 90% de las cepas de *K. pneumoniae*, esta enzima se puede encontrar también en plásmidos con un porcentaje considerable en cepas de enterobacterias resistentes a ampicilina. Se conocen más 115 variantes de SHV con una distribución a nivel mundial en diferentes especies de enterobacterias entre estas se encuentra *Salmonella sp*, siendo las más comunes SHV-5 y SHV-12. Las mutaciones en determinados aminoácidos de la enzima SHV han dado lugar al aumento de su espectro de modo que ya han sido consideradas dentro de la BLEEs<sup>66, 67</sup>.

### 7.6.3 CTX-M

Las cefotaximasas (CTX-M) se han convertido en las  $\beta$ -lactamasas más prevalentes por su potente actividad hidrolítica contra las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) por esta razón adquieren su nombre y también son conocidas por su resistencia hacia cefepima. Estas enzimas además confieren a las bacterias que las producen altos niveles de resistencia a monobactámicos. Las CTX-M son las BLEEs que se encuentran en diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* y son la principal causa de resistencia en aislamientos provenientes de infecciones nosocomiales, especialmente han sido encontradas en los últimos 5 años entre bacterias productoras de BLEEs aisladas en países sudamericanos<sup>67</sup>.

En la actualidad se conocen más de 50 Tipos de enzimas CTX-M, se pueden dividir en cinco grupos basados en sus identidades de aminoácidos en CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 y CTX-M25<sup>70</sup>.



Estas enzimas a diferencia de otras BLEEs, no surgieron por mutaciones de otras enzimas, su origen proviene de los genes transferidos mediante plásmidos que pertenecen a los miembros del género *Kluyvera*., este microorganismo tiene la característica de ser comensal y produce este tipo de enzima de forma innata. Se ha reportado que el número de BLEEs tipo CTX-M se está expandiendo rápidamente, durante algunos años se encontraban predominante en tres áreas geográficas: Sudamérica, Oriente y Europa oriental, sin embargo, en años recientes se ha reportado la llegada de Europa occidental y América del Norte<sup>66</sup>.

#### 7.6.4 OXA

Las enzimas tipo OXA son otro tipo grupo de BLEEs, que se incluyen dentro de la clase (2d), confieren resistencia ampicilina, cefalotina, cefotaxima y ceftazidima, se caracteriza por su alta actividad contra oxacilina y cloxacilina, además de ser pobremente inhibida por ácido clavulánico.

Se manifiestan predominantemente en *P. aeruginosa*, pero se han detectado en muchas otras bacterias Gram negativas. La enzima más común se considera OXA-1 detectada en *E. coli* en un 10% de los aislamientos, la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA no hidrolizan las cefalosporinas de amplio espectro a un grado significativo y no se consideran BLEEs. No obstante OXA-10 hidroliza debidamente a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, dándole a la mayoría de los microorganismos una sensibilidad reducida a estos antibióticos, cabe mencionar que si presenta de manera simultánea la producción de una metaloenzima que hidroliza carbapenem y una enzima OXA que hidroliza aztreonam pueden generar fácilmente resistencia a todos los antibióticos betalactámicos. Actualmente existen muy pocos datos epidemiológicos sobre la diseminación geográfica de las BLEEs tipo OXA<sup>69</sup>.

#### 7.6.5 PER

Las BLEEs tipo PER sólo comparten alrededor de 25% a 27% de homología con TEM y SHV. La  $\beta$ -lactamasa PER-1 hidroliza eficazmente penicilinas y cefalosporinas, es sensible a la inhibición de ácido clavulánico. Adicionalmente PER-2 comparte en un 86% de homología con PER-1, ha sido detectada en



*E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *V. cholerae* O1, es encontrada solamente en Sudamérica<sup>70</sup>.

### 7.7 Resistencia múltiple a los antibióticos en bacilos Gram negativos

Se ha descrito un grupo de proteínas MarR (Represores de resistencia a múltiples antibióticos) que se han encontrado en bacterias de importancia clínica, así como en bacterias del medio ambiente y también distribuidas a través de Archaea, Eucariotas y bacteriófagos su principal función es la transcripción de represores y activadores para regular una serie de fenotipos bacterianos. Recientemente se han descrito proteínas de la familia MarR y su importancia en la sobrevivencia de bacterias patógenas durante la infección en *Y. enterocolitica*, *Salmonella enterica* serovar *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* y *S. aureus*.

En Enterobacterias, en *E. coli* se ha descrito que la regulación del fenotipo de resistencia a múltiples antibióticos (Mar) depende de dos factores de transcripción, estos son MarR que regula negativamente y MarA (Activador de resistencia a múltiples antibióticos). MarR puede hacerse inactivo ya sea a través de una mutación genética o a través de su interacción directa con moléculas pequeñas que funcionen como un inductor, una vez que MarR se inactiva la expresión de MarA aumenta y MarA entonces funciona para activar el fenotipo Mar, esto se consigue a través de la regulación de los genes AcrAB que codifican para sistema "efflux" (eflujo) a múltiples fármacos. *E. coli* contiene un paralogo (gen relacionado por duplicación dentro de un genoma) gen adicional de MarR, MprA (también llamado EmrR), que regula la resistencia a múltiples fármacos (MDR) en el huésped. A diferencia de MarR, MprA (EmrR) regula directamente la expresión de un sistema de eflujo de múltiples fármacos llamado EmAB. EmrAB confiere resistencia a Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), ácido nalidíxico y una serie de agentes tóxicos<sup>71</sup>.



## 7.8 Epidemiología de las BLEEs

La primera  $\beta$ -lactamasa mediada por plásmidos en bacterias Gram negativas fue nombrada como TEM esta enzima se descubrió en 1960, posteriormente se identificó una segunda enzima que al analizarla se determinó que era muy similar a TEM, por esta razón fue nombrada TEM-2 debido a que sólo difería por un aminoácido respecto a la primera, este cambio fue reflejado en el punto isoeléctrico de cada enzima, años más tarde fue identificada la enzima TEM-1 en un aislamiento de *E. coli* resistente a ampicilina en 1965 y se comenzó a diseminar en todas las enterobacterias, este hecho dio lugar a que en 1969 se detectaran enzimas TEM-1 en *P. aeruginosa* y años más tarde en 1975 se encontraron en *H. influenza*, *S. marcescens* y *V. cholerae*<sup>72</sup>.

El surgimiento de las  $\beta$ -lactamasas se dio como consecuencia de la presión selectiva ejercida por la introducción de la ampicilina, carbenicilinas y las cefalosporinas de primera generación, debido a que se presume que su aparición fue a la par del uso de antibióticos betalactámicos que fueron desarrollados con la finalidad de que fueran eficaces contra los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* cuya resistencia a los betalactámicos se atribuye a la producción de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas TEM-1 y SHV-1. Después de varios años el análisis exhaustivo del uso de estos antibióticos, demostró que la resistencia se debía la producción de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica transferible que fue SHV-2<sup>72, 73</sup>.

Durante las décadas de 80s y 90s la gran mayoría de las  $\beta$ -lactamasas encontradas eran en un inicio de tipo TEM y SHV, debido a su gran diversidad hasta la fecha se han descrito diferentes variedades de  $\beta$ -lactamasas que derivaban de las iniciales que fueron TEM-1, TEM-2 y SHV-1. No obstante aunque en décadas pasadas se observó que la mayoría de los aislamientos bacterianos eran productores de este tipo de  $\beta$ -lactamasas, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países son las CTX-M que aun causado diversos brotes epidemiológicos en Europa<sup>73</sup>. Las primeras  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro fueron descritas por primera vez en Alemania en el año 1983 y fue identificada como TEM-3 es una variante de TEM-2, esta enzima se aisló de diferentes enterobacterias que



presentaron resistencia a cefotaxima y ceftazidima. Posteriormente se reportaron brotes de infección causados por estas cepas que producían TEM-3 en Europa, Francia en el año de 1984 y años más tarde en Estados Unidos en 1988 <sup>72</sup>.

Diversos autores comparten la idea de que el surgimiento de las BLEEs está asociada a la introducción y uso masivo de las cefalosporinas de amplio espectro (ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima) y los monobactámicos (aztreonam) <sup>74</sup>.

Por otra parte en 1989 se detectó un aislado clínico de *E. coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, la cual fue denominada CTX-M. Entre 1986 y 1992 aparecieron simultáneamente las primeras CTX-M en Alemania, Argentina, Francia, Italia y Japón, mientras que en los hospitales de Rusia fueron identificadas las  $\beta$ -lactamasas CTX-M-3 y CTX-M-15, posteriormente en Europa y Etiopia se descubrió la producción de BLEEs tipo CTX-M-15 en *S. entérica* procedentes de humanos y animales que habían sido codificadas en cromosomas bacterianos y en plásmidos conjugativos portadores del gen *bla* <sup>75</sup>. En Europa, en el informe del Sistema Europeo de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (EARSS), se analizaron cepas de origen invasivo, se observó un aumento significativo en la resistencia a cefalosporinas de tercera generación provocando por el aumento de las BLEEs que tuvo una frecuencia del 2.8% en el año 2006 y para el 2007 presentó una mayor frecuencia del 4.3%, esta tendencia continuó en el año 2008 debido a que los datos proporcionados por (EARSS) informaron un incremento en la frecuencia del 8.6% de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs que causaron bacteriemias <sup>75, 76</sup>.

En general se ha reportado que la prevalencia de BLEEs en Europa es mayor que Estados Unidos, pero menor que en América Latina. Sin embargo en Europa se ha reportado recientemente en el 2008, la prevalencia de BLEEs con una frecuencia del 5% en *E. coli* y 22% para *K. pneumoniae*. Esto da razón al postulado de diversos autores que afirman que algunos microorganismos que expresan ciertas enzimas como las BLEEs están mejor adaptados en algunas áreas geográficas <sup>76</sup>.



En América Latina, específicamente en el país de Argentina en 1992 se detectó una prevalencia de BLEEs tipo SHV-1, PER-2 y CTX-M-2 de cepas procedentes de un hospital pediátrico en el que 60% de las cepas de *K. pneumoniae* eran productoras de BLEEs, en ese mismo país, pero en el año de 1999 se reportó que las BLEEs más prevalentes en *K. pneumoniae* fueron las de tipo CTX-M-2, con un 62% de aislamientos productores, seguidas de SHV-2 (11%) y SHV-5 (10%). En otro estudio reportado en Venezuela en el año 2003, en cepas de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de infección nosocomial, se encontró que las cepas en un 76% eran productoras de BLEEs<sup>77</sup>.

En México son escasos los estudios que han reportado las características epidemiológicas de las BLEEs, sin embargo se han realizado investigaciones en diversas zonas del país, una de éstas fue realizada por la Red de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en el año de 1999 donde se reportó una prevalencia del 29.5% en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación<sup>78, 79</sup>.

El Hospital de Pediatría del centro Médico Nacional siglo XXI reportó en el 2004 un 76% de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de hemocultivos resistentes a Ceftazidima y el 78% a Cefotaxima. En México durante las dos últimas décadas las bacterias Gram negativas como (*Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* y *Pseudomonas sp.*), se ha reportado a estas bacterias como las más frecuentes en infecciones nosocomiales asociadas a una alta mortalidad<sup>79</sup>.

El estudio de la epidemiología de las BLEEs es muy importante debido a que se puede seguir la evolución, transmisión y el desarrollo de estas enzimas, además contribuye a la prevención para que en dado caso se pueda contrarrestar un impacto epidemiológico y económico a causa de la resistencia bacteriana. Por este motivo es fundamental que existan programas de control de infecciones nosocomiales y sistemas de vigilancia que ayuden a monitorear la resistencia o multirresistencia que presentan los microorganismos a diferentes antimicrobianos<sup>77, 79</sup>.



## 7.9 Factores de riesgo

El uso excesivo de antibióticos es el principal factor de riesgo para que las bacterias puedan desarrollar mecanismos de resistencia, esto genera que se transmitan los genes de una bacteria a otra por medio de elementos genéticos transferibles, uno de los principales elementos son los plásmidos que son adquiridos por medio de la conjugación <sup>76</sup>.

Como se mencionó con anterioridad, los plásmidos son el mecanismo más frecuente en la transmisión de resistencia, estos contienen genes que codifican la resistencia para diversos grupos de antibióticos, generando una diseminación de los genes que codifican la resistencia entre diferentes géneros y especies bacterianas, de esta forma los microorganismos pueden volverse multirresistentes. Por otra parte estudios de cohorte han demostrado que cuando el hospedero es tratado con antibióticos dos veces por año, la probabilidad de aislar bacterias con el fenotipo BLEEs es cercana al 2% y cuando el tratamiento se duplica, la frecuencia de la resistencia incrementa un 60% <sup>77</sup>.

Existen diferentes investigaciones que han encontrado que las bacterias productoras de BLEEs con frecuencia son resistentes a otras clases de antibióticos entre los que se encuentran los siguientes aminoglucósidos, fluoroquinolonas, quinolonas, tetraciclinas, trimetopim/sulfametoxazol <sup>72</sup>.

Las infecciones causadas por bacterias que presentan resistencia por medio de BLEEs a menudo son adquiridas por pacientes gravemente enfermos, con estancia de hospitalización prolongada, y en quienes se encontraron dispositivos médicos invasivos durante un tiempo prolongado por ejemplo (colocación de catéteres, intervenciones quirúrgicas, terapia de reemplazo renal, ventilación mecánica, bajo peso al nacer). Es importante mencionar que las bacterias que adquieren genes de multirresistencia por medio de plásmidos y transposones, se diseminan a través de infecciones nosocomiales desde los pacientes enfermos a personal que labora en los hospitales, existe evidencia que indica que el estado de portador transitorio en las manos de los trabajadores es el medio de transferencia más importante de paciente a paciente <sup>79, 80</sup>.



## 7.10 Características genéticas de las BLEEs

En general el genoma bacteriano está constituido de DNA cromosómico, en donde se encuentra la información genética responsable de las características celulares. Este genoma también tiene la característica de encontrarse en pequeños elementos circulares o lineales extracromosomales de DNA denominados plásmidos, que tienen la capacidad de replicarse autónomamente, es decir el control de su replicación es independiente de la maquina enzimática, siendo dependiente de las secuencias en el propio plásmido. Estos nuevos genes que adquiere la bacteria sirven para codificar factores de virulencia, producción de toxinas, degradación de compuestos tóxicos u orgánicos, luz ultravioleta y resistencia a antibióticos, por esta razón las bacterias pueden desarrollar características específicas a partir de obtención de genes a través de los plásmidos <sup>81</sup>.

Una característica importante de muchos plásmidos es la habilidad de transferir una copia de sí mismo de una bacteria a otra, mediante contacto célula a célula, lo que se conoce como conjugación en donde se realiza el proceso de transferencia génica, para que se lleve a cabo los plásmidos poseen la información necesaria para tener contacto entre la célula donadora y receptora, por medio del *pili sexual*, de esta manera se realiza la unión de ambas células. Existen plásmidos que son incapaces de transferirse autónomamente, no obstante, estos pueden transferirse en cuanto estén en la presencia de otro plásmido movilizable. Es así como la interacción de estos elementos permiten que los genes se transmitan a una familia clonal, así como por la conjugación entre las especies, lo que permite la diseminación de información genética<sup>81, 82</sup>.

Es importante mencionar que los genes *bla*, que codifican BLEEs se encuentran en las secuencias de inserción ISECp1 o IS26, junto con otros genes que codifican la resistencia a otros antibióticos no betalactámicos, como se señaló anteriormente, estos pueden residir en los mismos plásmidos o transposones, transfiriéndose conjuntamente con el gen *bla* responsable de la producción de BLEEs por medio del mecanismo conjuntivo, transmitiéndose de un microorganismo a otro, confiriendo el perfil de resistencia antibiótica <sup>82</sup>.



## 8. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE BLEEs

La detección de las BLEEs se basa en la capacidad que tienen estas enzimas de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas incluyendo a las de cuarta generación y monobactámicos (aztreonam); es decir tienen preferencia hacia estos sustratos, es por esta razón que los bacilos Gram negativos que producen las enzimas generan resistencia hacia los antibióticos betalactámicos y se pueden detectar a través de este fenotipo, una característica fenotípica adicional que sirve para identificar a las BLEEs es la observación del efecto potencializado para ceftazidima y cefotaxima en presencia del ácido clavulánico<sup>83</sup>.

Realizar una adecuada identificación de BLEEs es de gran importancia debido a que son producidas por diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, por este motivo los laboratorios de bacteriología que se encuentren trabajando con esta familia de bacilos Gram negativos deben estar preparados para reconocer de forma oportuna la presencia de las BLEEs. La detección de las BLEEs no es sencillo en un laboratorio, porque depende de su expresión fenotípica, además se encuentra condicionada por la cantidad de enzima que expresa y de otros mecanismos de resistencia que pueda presentar la bacteria<sup>83, 84</sup>.

Los laboratorios de bacteriología confrontan principalmente dos dificultades, la primera es el elevado número de BLEEs que se ha generado en la actualidad, añadiendo la posibilidad de que una misma cepa origine diferentes tipos de estas enzimas, por lo que los fenotipos pueden variar respecto a los esperados complicando la interpretación, por otra parte existe la posibilidad de encontrar cepas que producen enzimas que no se consideran estrictamente como BLEEs, por esta razón es necesario que se realice la elección de un método de confirmación de BLEEs eficaz para cada laboratorio. Es primordial emitir un aviso o alarma cuando se detecte una cepa productora de BLEEs para que rápidamente se pueda efectuar un plan de control de la infección causada por la bacteria, asimismo contribuir con la selección del tratamiento de los pacientes con el fin de evitar fracasos en la terapia antimicrobiana<sup>85</sup>.



Es importante señalar que existen diversos métodos estandarizados de acuerdo a la CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute), para la detección de BLEEs producidas por enterobacterias (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *P. mirabilis*), de esta manera se logra que los resultados sean reproducibles y comparables, la realización de estos procedimientos requiere la utilización de cepas de control que sirven para garantizar la calidad, esto se realiza a través de resultados conocidos, de esta manera se puede saber si la metodología empleada se realizó de forma correcta, sin embargo para el resto de *Enterobacteriaceae* y no fermentadores aún no existen métodos estandarizados para la detección de enzimas BLEEs, esto representa un problema que aún sigue en investigación <sup>84, 85</sup>.

Para fines del presente trabajo se describirán diferentes métodos para la detección de BLEEs, es primordial realizar una correcta interpretación de los perfiles de sensibilidad aplicando los criterios habituales de lectura del antibiograma conforme a lo establecido por la CLSI, no obstante tiene excepciones porque algunas bacterias no son sensibles a las técnicas de difusión convencionales o por no ser lo suficientemente sensibles, más adelante se describen las metodologías y las pruebas que se emplean en los laboratorios de bacteriología, así como las diversas pruebas para la detección y confirmación de cepas productoras de BLEEs.

En un laboratorio de tercer nivel uno de los principales desafíos es reconocer los marcadores incorporados a las pruebas de laboratorio de diagnóstico microbiológico, para que rápidamente conduzcan a la identificación del agente causal de la infección y por otra parte detectar los mecanismos de resistencia que se están expresando en la bacteria patógena, de tal forma que se pueda suministrar una terapia antibiótica precisa y oportuna <sup>84</sup>.



## 8.1 Métodos fenotípicos para la detección de BLEEs

### 8.1.1 Sensibilidad bacteriana por difusión en agar

Para realizar los diferentes métodos fenotípicos que ayudan a la detección de BLEEs, se debe iniciar a partir de una muestra clínica para el aislamiento e identificación de las bacterias patógenas, la identificación se puede llevar a cabo por métodos manuales (medios de cultivo, pruebas bioquímicas) o por sistemas automatizados (Phoenix, Vitek y MicroScan). Por otro lado el tamizaje inicial incluye la aplicación de pruebas de sensibilidad rutinarias que están basadas en el método de Kirby-Bauer y colaboradores, ya que es uno de los métodos que recomienda la CLSI para hacer la determinación de la sensibilidad bacteriana que se puede efectuar con diferentes antibióticos <sup>86</sup>.

Como siguiente paso la cepa o cepas identificadas deben ser reconstituidas, para hacerlo se deben sembrar en caldo agar nutritivo durante 12 horas para obtener bacterias en fase de crecimiento logarítmico. De ese aislamiento se toman colonias suficientes para preparar un inóculo en solución salina hasta igualar la turbidez con el estándar 0.5 de McFarland ( $10^8$  unidades formadoras de colonias UFC/ml) con el cual se siembra en forma masiva en un medio sólido (placa de agar Mueller Hilton), posteriormente se coloca la combinación de los sensidiscos (impregnados de antibiótico). Es importante mencionar que los discos no deben quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros, además no se deben poner más de 12 discos por placa de 150 mm o más de 5 discos por placa de 100 mm <sup>87</sup>. Los discos que se pueden utilizar para esta prueba son los siguientes: cefpodoxima (10  $\mu$ g/disco), ceftazidima (30  $\mu$ g/disco), cefotaxima (30  $\mu$ g/disco), cefepima (30  $\mu$ g/disco), ceftriaxona (30  $\mu$ g/disco), imipenem (10  $\mu$ g/disco), meropenem (10  $\mu$ g/disco), ceftioxitina (30  $\mu$ g/disco) y aztreonam (30  $\mu$ g/disco). También se pueden incluir discos de otros antibióticos como: ampicilina (10  $\mu$ g/disco), amoxicilina (10  $\mu$ g/disco), gentamicina (10  $\mu$ g/disco), cefalotina (10  $\mu$ g/disco), trimetoprim/sulfametoxazol (23.75/1.25  $\mu$ g/disco), piperacilina/tazobactam (110  $\mu$ g/disco), amikacina (30  $\mu$ g/disco) y ciprofloxacino (5  $\mu$ g/disco). Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar Müller-Hilton, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un



gradiente de concentración, posteriormente los medios se incuban de 18 a 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. Para hacer la interpretación se requiere de los criterios establecidos por la CLSI, comparando la medida de los diámetros de los halos de inhibición con tablas establecidas por la CLSI <sup>88</sup>.

Se considera una cepa es sospechosa de producción de BLEEs, si los resultados obtenidos de los diámetros de inhibición para el método de difusión en agar con discos se encuentran dentro de los siguientes criterios: aztreonam  $\leq 27$  mm, cefotaxima  $\leq 27$  mm, ceftriaxona  $\leq 25$  mm ceftazidima,  $\leq 22$  mm y cefpodoxima  $\leq 17$  mm para las enterobacterias *K. pneumoniae*, *E. coli* y *K. oxytoca*. Adicionalmente la CLSI recomienda para *P. mirabilis* los siguientes puntos de corte: cefotaxima  $\leq 27$  mm, ceftazidima  $\leq 22$  mm y cefpodoxima  $\leq 22$ mm. Se recomienda verificar que los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano de los discos se encuentren entre los rangos establecidos y actualizados por la CLSI. Para el control de calidad de esta prueba se utilizan las cepas de *K. pneumoniae* ATCC 7000603 y *E. coli* ATCC 35218 productoras de BLEEs y *E. coli* ATCC 25922 no productora de BLEEs <sup>89</sup>.

### 8.1.2 Prueba de combinación de disco

Es un método que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable, para llevar a cabo la prueba de CDT (Disk combination test) se debe realizar en el agar Hilton Mueller, con una previa inoculación de una suspensión bacteriana preparada de acuerdo a las normas establecidas por CLSI. En el medio Hilton Mueller se coloca un disco que contenga alguna de las cefalosporinas siguientes: cefotaxima (30  $\mu\text{g}$ ), ceftazidima (30  $\mu\text{g}$ ) o cefepima (30  $\mu\text{g}$ ), y otro que contenga una de las cefalosporinas anteriores en combinación con ácido clavulánico (10  $\mu\text{g}$ ). Posteriormente se deja incubar a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas. Para realizar la interpretación de los resultados la zona de inhibición alrededor del disco de cefalosporina combinada con ácido clavulánico se compara con la zona alrededor del disco con la cefalosporina sola <sup>90</sup>.

La prueba es positiva para BLEEs, si el diámetro de la zona de inhibición que contiene la cefalosporina en combinación con el ácido clavulánico es  $\geq 5$  mm mayor en comparación con la que la no tiene ácido clavulánico. Las ventajas



de este método son las siguientes: es sencillo, barato y de fácil control, además de una práctica estandarización, una ventaja adicional del método y específicamente del medio, es que se le pueden realizar algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo el antibiograma con bacterias exigentes que necesitan más nutrientes que los que este medio les puede ofrecer <sup>89, 90</sup>.

### **8.1.3 Prueba de sinergia de disco doble**

La prueba de sinergia de doble disco, conocido como DDST (Double Disc Synergy Test), es también un método propuesto para la detección de las BLEEs. Esta prueba se lleva a cabo en medio sólido (placa de agar Mueller Hilton) inoculando con una suspensión bacteriana preparada de acuerdo a las normas establecidas por CLSI, sobre la cual se sitúa un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20  $\mu$ g/10  $\mu$ g) y en torno a éste, separados a una distancia de 30 mm (aproximadamente de 2.5 cm a 3 cm de centro a centro), se disponen discos de cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam, con una carga estándar de 30  $\mu$ g/ disco. Esta placa se incuba a una temperatura de 35 °C  $\pm$  2 °C por un periodo de 18 a 24 horas en atmósfera aeróbica, posteriormente se realiza la lectura de las zonas de inhibición dando paso a la interpretación de producción de BLEEs <sup>91</sup>.

La prueba es positiva si existe un aumento o distorsión del halo de inhibición alrededor del disco de amoxicilina/ácido clavulánico con respecto a los discos de los antibióticos colocados alrededor indica sinergia entre el ácido clavulánico y cualquiera de los antibióticos colocados, esto pone en evidencia la producción de BLEEs. Si el resultado de la DDST es negativo, pero si la sospecha de producción de BLEEs es alta, es necesario repetir la prueba ajustando la distancia entre los disco, generalmente disminuyendo la distancia entre ellos a 20 mm. Las limitaciones de doble difusión con discos dependen de la pericia en la realización de la prueba (disposición de los discos) y en la interpretación adecuada de la sinergia que puede ser errónea el caso de personal no capacitado. En cepas con problemas de permeabilidad o con resistencia simultánea a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas puede verse mermada la capacidad de detección de producción de BLEEs <sup>89, 91</sup>.



#### 8.1.4 Microdilución en caldo

Esta técnica es la variante del método de difusión en agar, pero en este caso se estudian y analizan las CMI de las cefalosporinas solas y en presencia de inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, para lo cual se emplean diferentes disoluciones seriadas de diferentes antibióticos. Para esta técnica es necesario probar concentraciones de cefotaxima 0.25-64  $\mu\text{g/ml}$  y ceftazidima de 0.25-128  $\mu\text{g/ml}$  y concentraciones de ceftazidima /ácido clavulánico de 0.25/4-128/4  $\mu\text{g/ml}$  y de cefotaxima/ ácido clavulánico de 0.25 /4-64/ 4  $\mu\text{g/ml}$ . Se confirma la presencia de una BLEEs cuando se produce una reducción de 3 diluciones o más de la CMI de los antibióticos en presencia de ácido clavulánico, respecto a cefotaxima o ceftazidima sola, además puede emplearse el método de macrodilución en agar utilizando un replicador de Steer de acuerdo a las recomendaciones que establece CLSI. Otra opción es emplear disoluciones seriadas dobles que son de 256  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0.125  $\mu\text{g/ml}$  de cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima <sup>89, 92</sup>.

#### 8.1.5 Tiras E- test

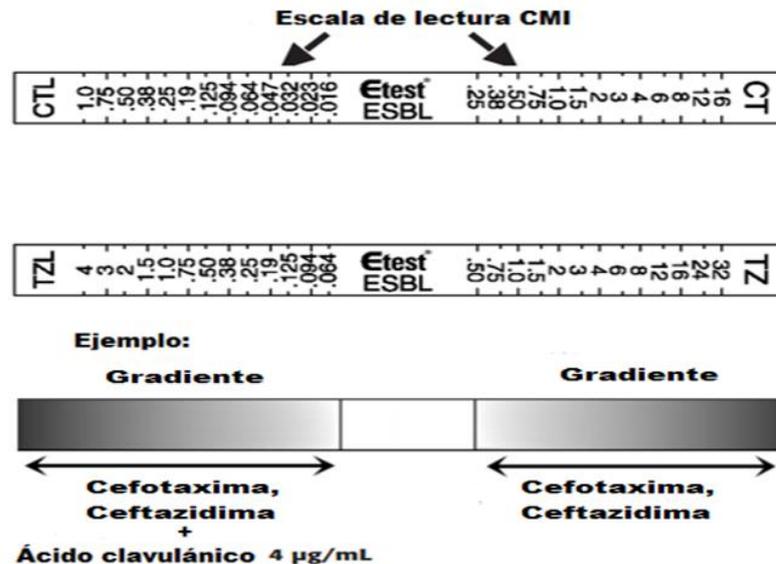
El método conocido como E-test, también llamado Epsilon test o específicamente E-test ESBL, combina las técnicas de difusión en gradiente y los de dilución para determinar CMI, realizando una lectura directa, mediante las tiras que contienen cefalosporinas con y sin inhibidor de BLEEs. Este método es el más sencillo para la detección de cepas que producen este tipo de enzimas, incluso se puede sustituir en la práctica por la prueba de microdilución en caldo debido a que las tiras E-test, que son en general es un método más sensible, específico y más cómodo, aunque su costo es más elevando <sup>93</sup>.

Para detectar BLEEs por esta técnica se utilizan un conjunto de tiras de material no poroso del que están constituidas comercialmente las tiras de E-test-ESBL, estas tiras contienen en una mitad una concentración creciente de la cefalosporina a probar (cefotaxima, ceftazidima), y por otro lado una concentración creciente de la misma Cefalosporina asociada a una concentración constante de ácido clavulánico (4  $\mu\text{g/ml}$ ) : ceftazidima/ácido clavulánico con rangos de CMI que pueden ir de 32 a 0.50  $\mu\text{g/ml}$  y de 4 a



0.064  $\mu\text{g/ml}$ , cefotaxima/ ácido clavulánico con rango de CIM de 16 a 0.25  $\mu\text{g/ml}$  y 1 a 0.016  $\mu\text{g/ml}$ . La cantidad de antibiótico es fija y la zona de inhibición es elíptica, por esta razón se puede determinar la CMI visualmente (**Figura 14**)

93, 94.

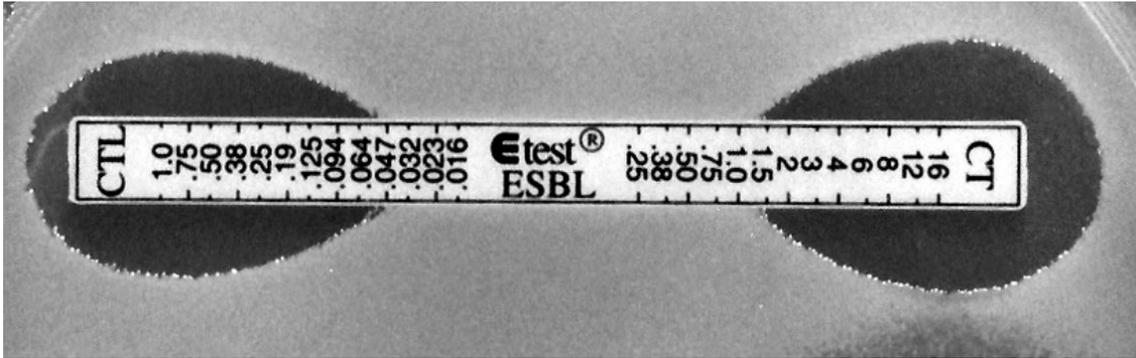


**Figura 14.** Tiras E-test ESBL<sup>® 94</sup>.

Esta prueba se lleva a cabo en medio sólido (placa de agar Mueller- Hinton) usando un inóculo estandarizado de acuerdo a los lineamientos CLSI, sobre la cual se sitúan las tiras correspondientes de E- test ESBL.

La CMI se determina en el punto donde la elipse de inhibición del crecimiento intercepta la escala de la tira, se considera la prueba como positiva para la producción de BLEEs, si se observa que la sinergia con el ácido clavulánico cuando la CMI disminuye en  $\geq 3$  o más diluciones; es decir cuando hay diferencia en la CMI obtenida por el lado de la tira con el antibiótico solo, en comparación con el otro lado de la tira que contiene el antibiótico en combinación con ácido clavulánico<sup>89</sup>.

Para poder confirmar la producción de BLEEs se obtiene la razón de dividir la CIM del antimicrobiano solo entre la CIM del antimicrobiano combinado con el ácido clavulánico; si esta razón es mayor o igual a 8 se confirma la producción de BLEEs (**Figura 15**). Se deben seguir las reglas para que la sensibilidad del método no disminuya y no se tengan diferencias en los resultados<sup>95</sup>.



**Figura 15.** Tira E-test ESBL<sup>®</sup>. Prueba positiva para BLEEs: CMI CT (cefotaxima) / CTL (cefotaxima/ ácido clavulánico) = 1.5 / 0.047 = 32<sup>95</sup>.

En ocasiones al realizar esta prueba se pueden tener los siguientes problemas: dificultad para interpretar los resultados de la CMI por la baja producción de enzimas, formación de una zona fantasma que se produce en el centro de la tira que es producto de la sinergia entre el antibiótico y el ácido clavulánico, la deformación de elipses de inhibición debido a que el clavulanato difunde en el agar interfiriendo con la mitad de la tira que contiene ceftazidima sola<sup>94</sup>.

Se sugieren las siguientes cepas para el control de calidad de esta prueba a *K. pneumoniae* ATCC 7000603 y *E. coli* ATCC 35218 productoras de BLEEs y *E. coli* ATCC 25922 no productora de BLEEs. La capacidad de detección de esta prueba ha sido evaluada en diversas cepas de microorganismos productores de BLEEs obteniéndose en algunos casos una sensibilidad y especificidad superior al 99%<sup>94, 95</sup>.

### 8.1.6 Confirmación fenotípica de las BLEEs

La CLSI recomienda realizar la confirmación fenotípica de las posibles cepas productoras de BLEEs, en especial de las enterobacterias (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*) mediante la prueba de cefotaxima, ceftazidima solos y en combinación con ácido clavulánico debido a que estos antimicrobianos presentan una mayor sensibilidad para la detección de BLEEs, estas pruebas de confirmación se pueden realizar mediante el método de microdilución en caldo o por difusión en disco. Para la prueba fenotípica confirmatoria para la detectar la producción de BLEEs es una observación del efecto antibiótico potenciado para cefotaxima y ceftazidima en presencia de ácido clavulánico<sup>96</sup>.



## 8.2 Métodos complementarios para la detección de BLEEs

### 8.2.1 Métodos Genotípicos

Este método sirve para rastrear brotes epidemiológicos, que se derivan de la proliferación clonal de una cepa única productora de BLEEs, además permite el estudio de la diseminación de diversas BLEEs en el mismo brote, logrando descubrir las diversas proliferaciones clonales de varias cepas con distintas BLEEs o la existencia de diferentes plásmidos entre los miembros de una misma cepa, además se pueden realizar diferentes investigaciones acerca de bacterias no relacionadas genotípicamente. Es frecuente que exista una propagación de cepas productoras de BLEEs, estudios han demostrado que la transmisión se puede dar dentro de los hospitales, en ciudades e incluso entre países. Por esta razón es importante conocer las características genéticas de cada clona para generar alternativas y medidas de control más específicas que sean eficaces <sup>97, 98</sup>.

Los métodos genotípicos más utilizados son: electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), perfiles plasmídicos, ribotipificación entre otros métodos, basados en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las técnicas de amplificación son las que más éxito han tenido debido a su fácil realización permiten la secuenciación del producto de PCR siendo muy útiles para la caracterización de la enzima <sup>99</sup>.

La técnica denominada oligotyping fue diseñada para las BLEEs de tipo SHV y TEM, actualmente se encuentra limitada debido a un alto número de variantes y el aumento del número de mutaciones en las nuevas BLEEs que pertenecen a estas familias. Sin embargo el uso de cebadores específicos diseñados para detectar mutaciones puntuales y el desarrollo de la reacción de amplificación en condiciones estrictas permite la caracterización de algunas de las BLEEs ya que permite detectar los genes *bla* (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* *bla<sub>CTX-M</sub>*) que codifican a estas enzimas <sup>100, 101</sup>.

Con la técnica de PCR se ha logrado identificar la amplia diseminación de BLEEs de tipo TEM y SHV alrededor del mundo, esto permite conocer el diverso número de mutaciones que presentan las nuevas BLEEs, además de



otros tipos de BLEEs. Con ayuda de estas técnicas se descubrió que *K. pneumoniae*, está asociada con la movilidad de plásmidos conjugativos. A partir de este descubrimiento se han realizado protocolos donde se demostró la transferencia de plásmidos por medio de la conjugación que se promueve entre las diferentes especies <sup>101</sup>.

Como alternativa a la secuenciación posterior del producto de PCR se han diseñado diferentes variantes de PCR que pueden orientar sobre el tipo de BLEEs. Se ha introducido la PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), esta técnica radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR y la amplificación de los polimorfismos del DNA. El análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencillas de DNA ha sido utilizada con éxito para la identificación de variantes de  $\beta$ -lactamasas de las familias: TEM, SHV, CTX y OXA. Otra opción para la secuenciación del producto de PCR son las técnicas de RSI-PCR (Restriction site insertion) o amplificación con cebadores que crean lugares de restricción próximos al extremo 3' o la técnica PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphisms) en la que una vez amplificado el producto de PCR se somete a restricción con endonucleasas para la apertura de las hebras de DNA y posteriormente la electroforesis de los fragmentos generados. Más recientemente se ha propuesto la utilización de la PCR en tiempo real para la detección y caracterización de las BLEEs de tipo SHV. En esta técnica se utilizan sondas marcadas con diferentes fluorocromos según el tipo de mutación <sup>101, 102</sup>.

Dado al alto número de mutaciones descritas, ninguna de estas técnicas asegura la caracterización final de la enzima por lo que la secuenciación del fragmento de PCR continúa siendo el método de referencia <sup>102</sup>.



### 8.3 Métodos cromogénicos para la detección de BLEEs

Los análisis que se realizan en los laboratorios microbiológicos se utilizan medios de cultivo bacteriano selectivos y diferenciales que ayudan al análisis de las muestras, sin embargo en los últimos años se han desarrollado medios cromogénicos suplementados para el aislamiento selectivo y la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEEs.

Estos medios que se comercializan son eficaces debido a que dentro de sus componentes principales se encuentran Oximino-cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima, ceftazidima y cefpodoxima). Existen diversos medios cromogénicos comerciales que se encuentran disponibles, como por ejemplo: ChromID ESBL bioMérieux<sup>®</sup>, Brilliance ESBL agar Oxoid<sup>®</sup> y el CHROMagar ESBL<sup>®</sup> 103.

#### 8.3.1 ChromID ESBLs

Es un medio de cultivo que contiene una mezcla de antibióticos que incluye Cefpodoxima, además de sustratos cromogénicos que permiten la identificación directa de las enterobacterias productoras de BLEEs. Se identifica a *E. coli* porque esta bacteria produce la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, por esta razón sus colonias tienen la característica de presentar una coloración que va del rosa a borgoña, mientras que las bacterias *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp* y *Citrobacter sp*, producen  $\beta$ -glucosidasa lo que genera un coloración verde/azul o marrón/verde en sus colonias y finalmente los géneros *Proteus sp*, *Providencia sp* y *Morganella sp* que producen una desamina sus colonias presentan una coloración marrón que va desde el oscuro hasta claro, cabe señalar que mientras la identificación de especie es directa, la producción de BLEEs debe confirmarse con una o más pruebas adicionales recomendadas por la CLSI 103, 104. La identificación de cepas productoras de BLEEs a partir de hemocultivos es de gran ayuda dado que la sensibilidad y la especificidad de este medio para la detección de enterobacterias productoras de BLEEs utilizando este tipo de muestras es del 95 % y del 69% respectivamente. Para el control de calidad de este medio el fabricante sugiere utilizar la cepa *E. coli* ATCC 2592, no productor de BLEEs y *K. pneumoniae* ATCC 70063 productor de BLEEs<sup>104</sup>.



## 9. METODOLOGÍA

Se procesaron un total de 6,589 hemocultivos en el laboratorio de bacteriología del INP en el periodo de 01 agosto del 2015 al 31 agosto del 2016. De estos hemocultivos el 89% (5,874) fueron negativos y el 11% (715 cepas) resultó positivo para algún microorganismo. Del total de aislamientos se obtuvieron para Gram positivos 427 cepas (60%) seguido de los Gram negativos con un total de 264 cepas (37%) y finalmente las Levaduras con un total de 24 cepas (3%). De las 264 cepas de bacilos Gram negativos 87 (33%) de cepas presentaron BLEEs, *K. pneumoniae* 45 cepas, *E. coli* 41 cepas y *K. oxytoca* 1 cepa; mientras que 177 (67%) cepas fueron negativas, es decir no presentaron producción de BLEEs.

La extracción de las muestras sanguíneas y la inoculación en los frascos de cultivo **BD BACTEC Peds Plus/ F<sup>®</sup>** para hemocultivos, lo realizó el personal médico, en seguida fueron trasladados al laboratorio de bacteriología en donde se hizo el registro de cada hemocultivo con los datos del paciente.

Para el análisis microbiológico de los hemocultivos se utilizó el equipo automatizado **BD BACTEC FX<sup>®</sup>**. En este equipo se metieron los frascos de cultivo y se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con lecturas periódicas realizadas por el sistema cada 10 minutos durante 7 días.

El frasco de cultivo contiene caldo digerido de Caseína-Soya con pequeñas cantidades de  $\text{CO}_2$  y otros componentes (**Anexo I**), en el fondo tiene un sensor de fluorescencia que es susceptible a los aumentos de  $\text{CO}_2$ , estos incrementos son producidos por el crecimiento de microorganismos que metabolizan los sustratos presentes en el cultivo, cuando existe la presencia de microorganismos viables la cantidad de  $\text{CO}_2$  aumenta, éste, al ser detectado por el equipo, emite una alarma e inmediatamente se prende una luz roja para indicar que existe la presencia de una o más especies de microorganismos.

Después de que el equipo **BD BACTEC FX<sup>®</sup>** detecta un hemocultivo positivo, se hizo un subcultivo en los medios (Agar sangre, Mac Conkey, Agar Fenil etanol y Agar chocolate), estos fueron incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con la finalidad de aislar a las cepas presentes en el hemocultivo, y posteriormente se realizó



una tinción de Gram para observar en el microscopio la morfología de las bacterias, también se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas en agar Kligler (agar doble azúcar) y medio de SIM (Sulfuro Indol Motilidad).

La identificación y sensibilidad antimicrobiana se realizó en el equipo **BD Phoenix 100<sup>®</sup> (Diagnostics Sparks, MD)** y la determinación de las enzimas BLEEs la hizo en el mismo equipo. Todas las cepas estudiadas fueron reportadas con la regla 1505 “El aislado se confirma como positivo para  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido”. Se utilizó el panel **BD Phoenix<sup>®</sup> NMIC/ID-406** para identificación y sensibilidad antimicrobiana de Gram negativos. Las pruebas bioquímicas que realiza este panel, así como los antibióticos que contienen se describen en el **(Anexo I)**.

La identificación de las bacterias en el sistema **BD Phoenix 100<sup>®</sup>** está basada en reacciones colorimétricas y fluorométricas de los sustratos que utilizan las bacterias, adicionalmente el sistema BD Phoenix<sup>®</sup> emplea el método de microdilución en caldo para realizar una detección del crecimiento de los microorganismos en presencia de un antibiótico, esto tiene la finalidad de analizar las MICs, el sistema al detectar los cambios del indicador redox (azul alamar) mide la turbidez del medio. Es importante mencionar que el ensayo de viabilidad celular por azul de alamar se basa en el principio de reducción del reactivo no fluorescente (resazurina) a un compuesto fluorescente (resarufin), en este sentido las células bacterianas viables mantienen un estado reductor dentro de su citosol, es por esta razón que el indicador azul alamar es reducido por NADH, NADPH, FMNH, FADH y también por otros citocromos, esto trae como resultado que el indicador redox acepte electrones generando un cambio en su estado oxidado (azul) que no tiene fluorescencia, a su estado reducido (rosa) que presenta un producto fluorescente detectable (o absorbente) con esto el sistema BD Phoenix<sup>®</sup> puede detectar el cambio.

Se preparó una suspensión bacteriana en el caldo Phoenix ID ajustándola al 0.5-0.6 del estándar de McFarland, utilizando el nefelómetro **Phoenix Spec<sup>®</sup> (BD)**, posteriormente se toman 25  $\mu$ L de ésta y se adicionan al caldo Phoenix AST<sup>®</sup>, suplementándolo con un agota del indicador AST Phoenix<sup>®</sup> (indicador de óxido reducción basado en azul de Alamar). Se inoculan los paneles,



posteriormente se colocan en el equipo para su incubación y lectura hasta la obtención de los resultados (**Ver Diagrama 1**). El procedimiento se realizó de acuerdo a lo indicado en el manual del usuario.

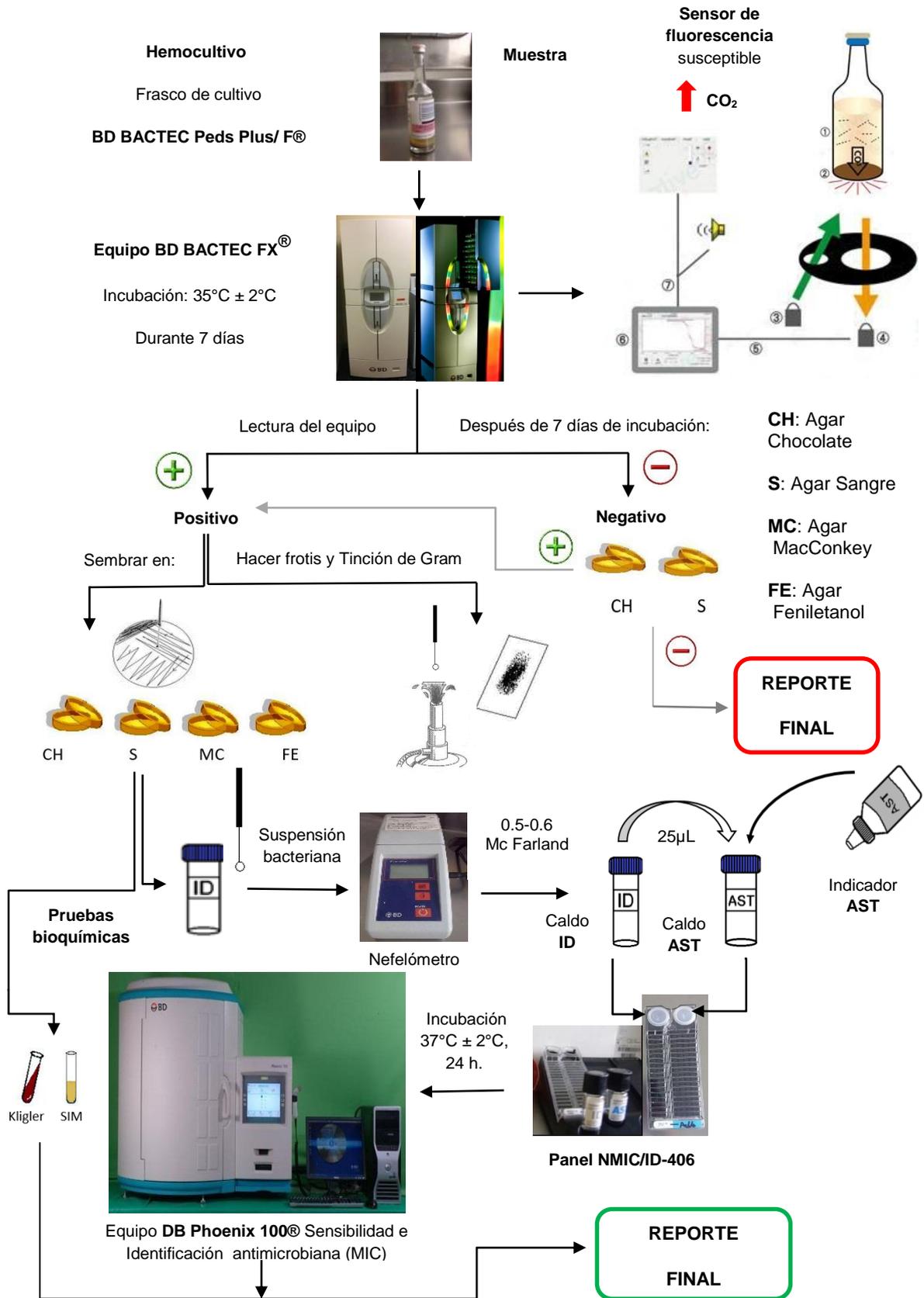
Los antibióticos evaluados y sus intervalos de concentración en ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fueron: ampicilina (4-16), amoxicilina/clavulanato (4/2-16/8), ticarcilina (4-64), ticarcilina/clavulanato (2/2-64/2), cefalotina (2-16), cefuroxima sódica (4-16), cefotaxima (2-32), ceftazidima (0.5-16), ceftriaxona (2-32), aztreonam (1-16), ceftaxima (4-16), imipenem (1-8), amikacina (8-32), gentamicina (2-8), tobramicina (2-8), ciprofloxacino (0.5-2), levofloxacino (1-4), ácido nalidixico (8-32), nitrofurantoina (16-64) y trimetoprim/ sulfametoxazol (0.5/9.5-2/38).

Para la prueba de confirmación de BLEEs el panel NMIC/ID-406 utiliza ceftazidima, ceftazidima/clavulanato, ceftriaxona, ceftriaxona/clavulanato, cefotaxima, cefotaxima/clavulanato, cefpodoxima, cefpodoxima/clavulanato y cefepime cefepime/clavulanato, a concentraciones establecidas por el fabricante.

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria, tanto de los antibióticos utilizados para realizar el antibiograma, como los empleados para la confirmación de las BLEEs, fueron interpretados por el sistema experto de **Phoenix (BDXpert<sup>®</sup>)**, consiste en una serie de reglas que analizan los patrones de sensibilidad para cada uno de los microorganismos identificados, aplica las reglas indicadas por el manual M100 27<sup>th</sup> 2017 del CLSI y con base a ellas, se realiza cambios en el reporte final de los aislamientos. El software empleado fue V 6.21<sup>a</sup> Phoenix y V.60A Epicenter. El control de calidad para la identificación y sensibilidad de las bacterias Gram negativas en los paneles se utilizaron las cepas de *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y para las pruebas de BLEEs se empleó como control positivo la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603, y como control negativo *E. coli* ATCC 25922.



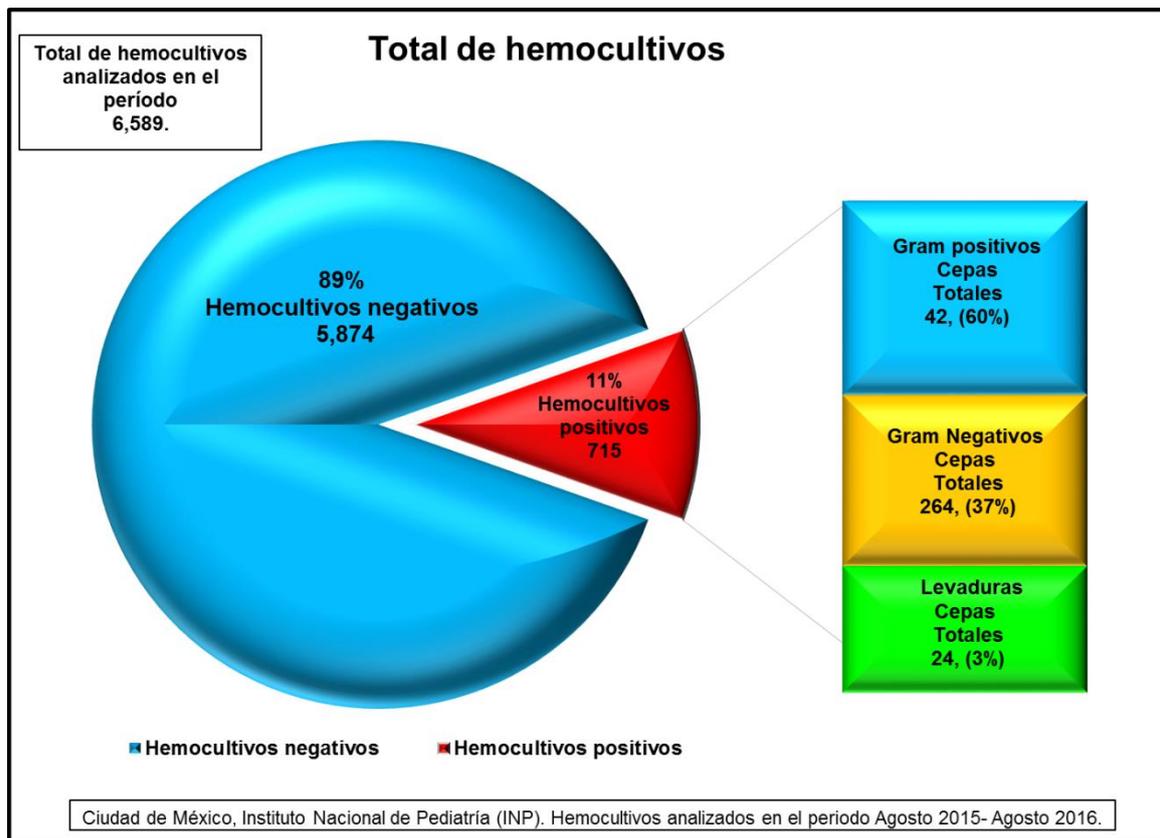
### Diagrama 1. Metodología para el proceso de hemocultivo





## 10. RESULTADOS

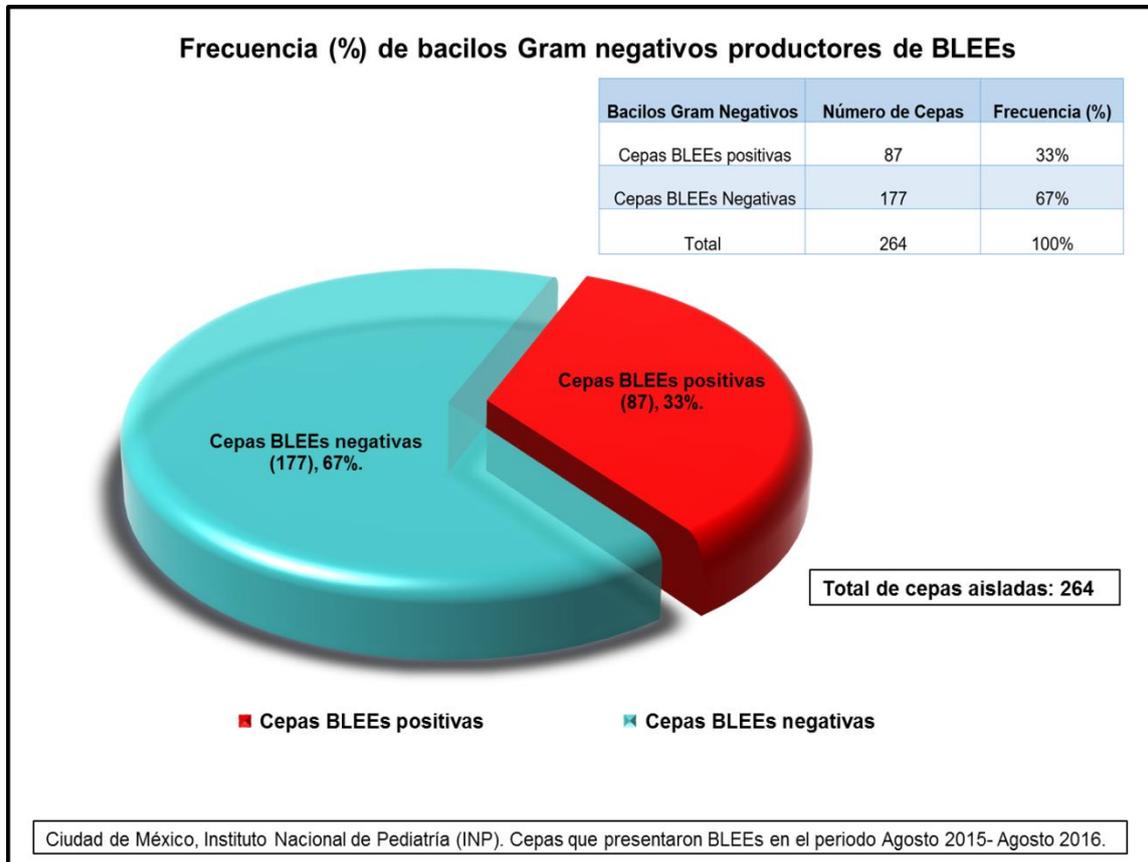
El total de hemocultivos procesados fue de 6,589 (Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría durante el periodo del 01 agosto 2015 al 31 agosto 2016), de estos se obtuvieron 5,874 (89%) hemocultivos negativos, mientras que los hemocultivos positivos fueron 715 (11%), en los cuales hubo crecimiento de diferentes especies de microorganismos que corresponden para Gram positivos un total de 427 (60%) cepas, seguido de los Gram negativos con un total de 264 (37%) cepas y finalmente las Levaduras con un total de 24 (3%) cepas. Los datos obtenidos de cada microorganismo aislado a partir de un hemocultivo se muestran en la gráfica 1.



**Gráfica 1.** Total de hemocultivos. En esta grafica se muestran los hemocultivos totales que fueron positivos y negativos, además de la cantidad de microorganismos aislados de cada hemocultivo que fue positivo.



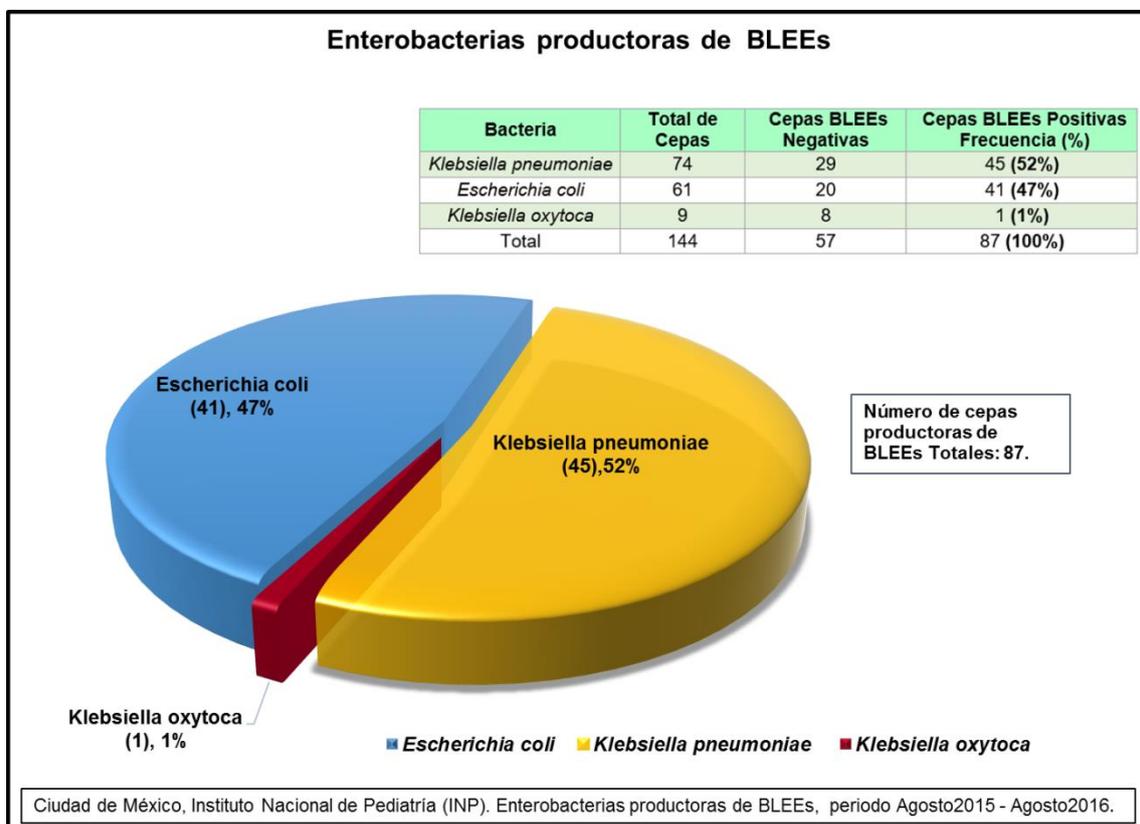
De acuerdo a los datos que se muestran en la gráfica 2, se obtuvieron un total de 264 cepas de bacilos Gram negativos de las cuales se registraron 87 (33%) cepas productoras de BLEEs, mientras que 177 (67%) cepas fueron negativas. Estos datos se muestran en la gráfica 2.



**Gráfica 2.** Frecuencia (%) de bacilos Gram negativos productores de BLEEs. En la gráfica se observa un total de 264 cepas de bacilos Gram negativos a partir de esta cantidad se dividieron en dos grupos que fueron cepas productoras de BLEEs y cepas que no presentaron producción de BLEEs, el resultado fue el siguiente: 87 (33%) cepas fueron BLEEs positivas y 177 (67%) cepas fueron BLEEs negativas.



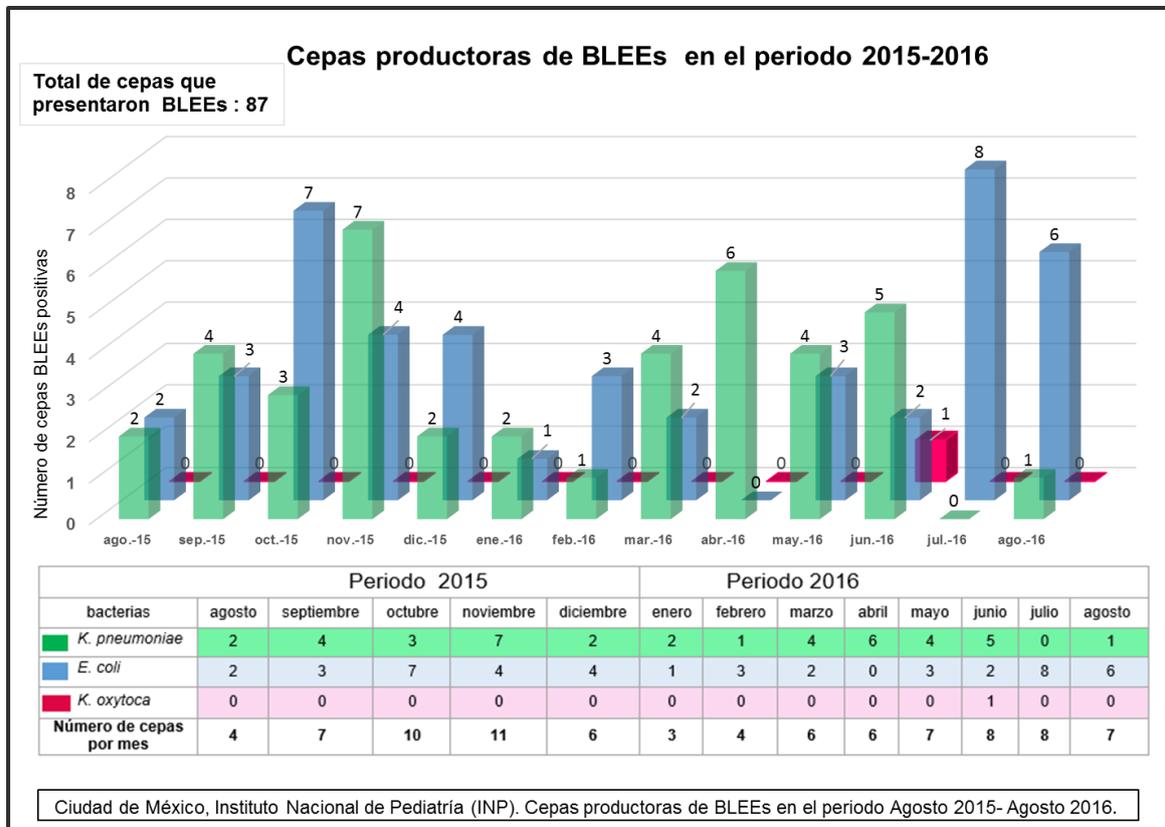
Continuando con el análisis estadístico a partir de las 264 cepas de bacilos Gram negativos, se analizaron 144 cepas de enterobacterias aisladas en el estudio que podrían presentar BLEEs, las 120 restantes pertenecieron a otros géneros o especies. Finalmente se analizaron 144 cepas de enterobacterias, y sólo 87 cepas fueron productoras de BLEEs de las cuales *Klebsiella pneumoniae* presentó la mayor frecuencia 52%, seguida de *Escherichia coli* 47%, mientras que *Klebsiella oxytoca* presentó una menor frecuencia de producción de BLEEs con el (1%), las 57 restantes fueron negativas, estos datos se observan en la gráfica 3.



**Gráfica 3.** Enterobacterias productoras de BLEEs. En la gráfica se presentan a las bacterias que tienen una mayor incidencia en la producción de BLEEs obtenidas en el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP).



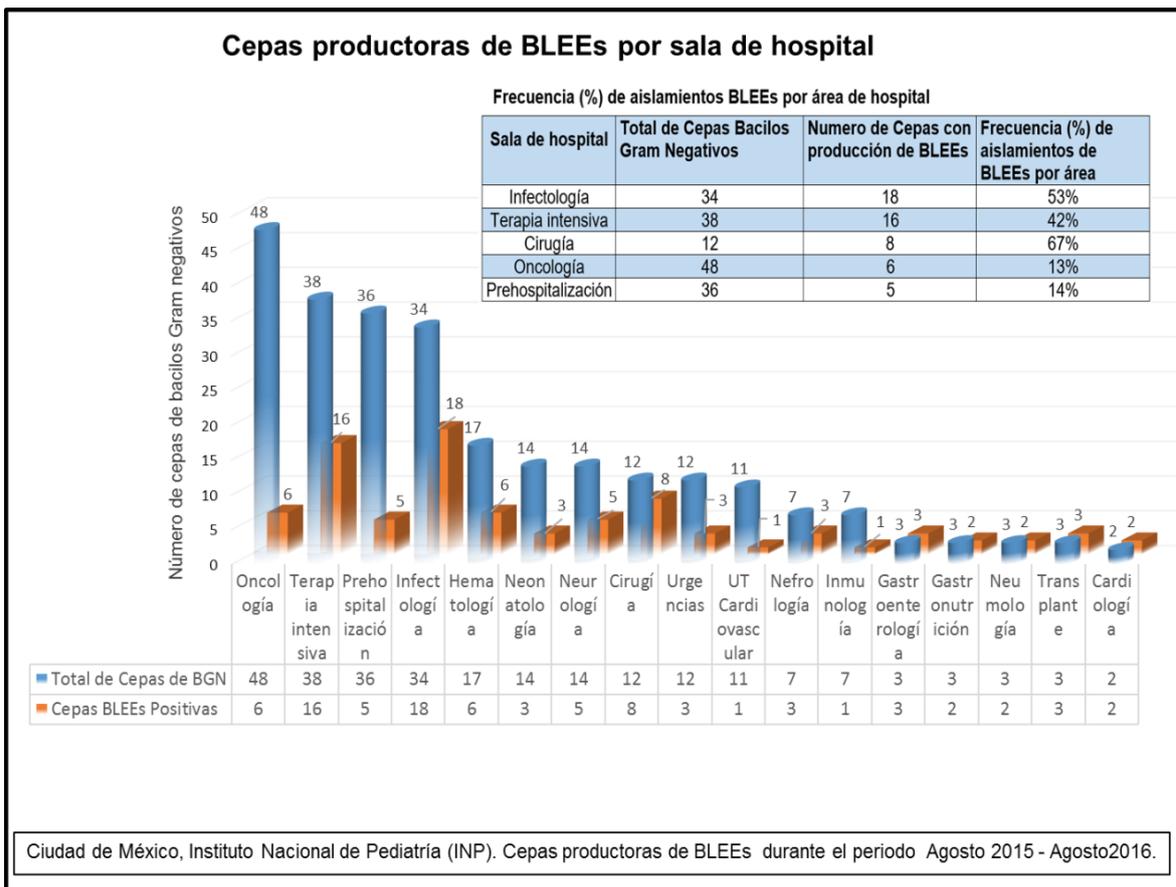
En la gráfica 4, se puede observar que en el mes de noviembre del 2015 para *E. coli* se registró una alta incidencia 7 (8%) de cepas productoras de BLEEs, sin embargo en el mes de julio del año 2016 para *E. coli* no se registró ninguna de estas cepas, mientras que *K. pneumoniae* presentó la frecuencia más alta en julio de 2016 con 8 (9%) cepas. En tanto que *K. oxytoca* presentó una baja producción de BLEEs con una frecuencia del 1% para el mes de junio. Los datos obtenidos en la gráfica 4 muestran que la producción de BLEEs de cada especie bacteriana es muy variable en cada mes y año. Las bacterias que presentaron una mayor producción de BLEEs fueron *K. pneumoniae* y *E. coli*, mientras que *K. pneumoniae* presentó una escasa producción de BLEEs.



**Gráfica 4.** Cepas productoras de BLEEs durante el periodo que comprende agosto 2015 a agosto 2016. Estas cepas fueron aisladas en el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP).



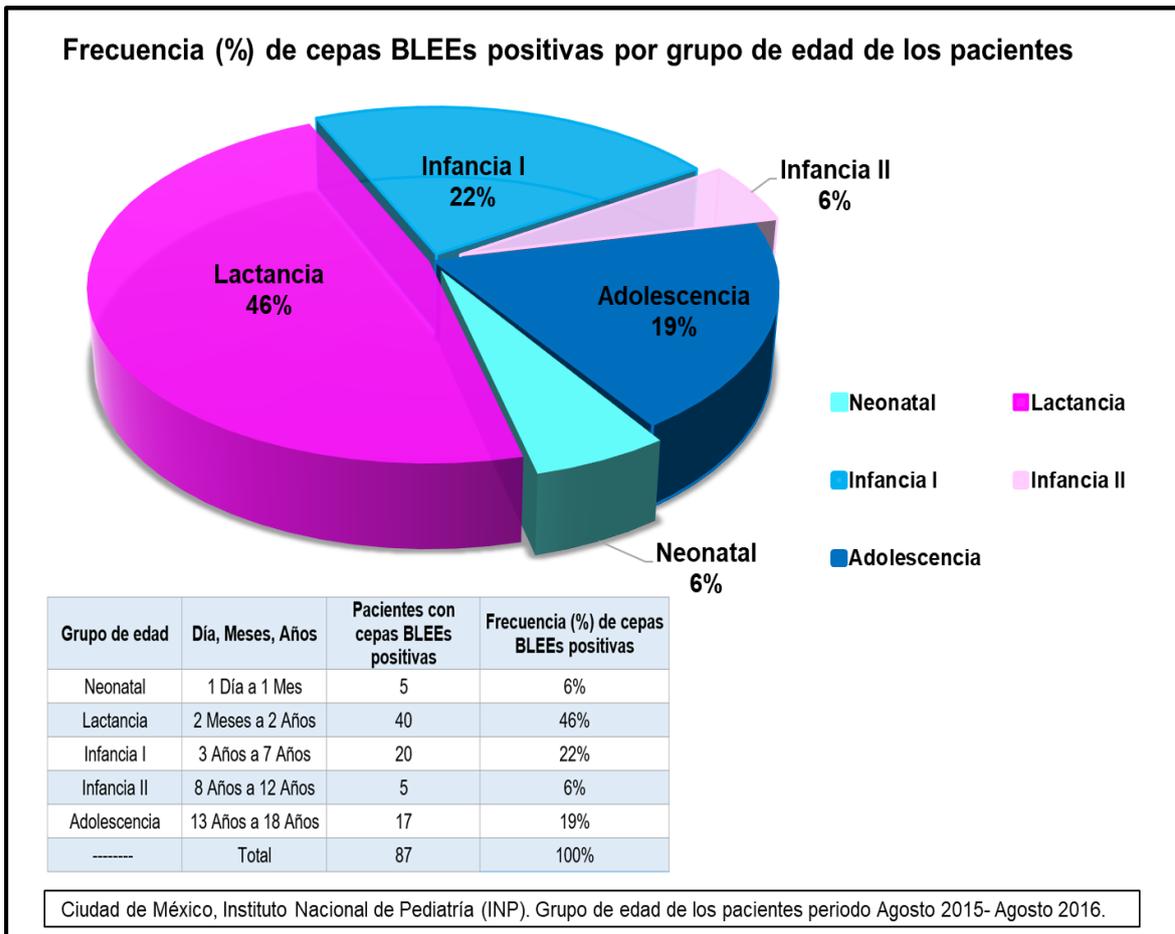
En la gráfica 5 se representan las 264 cepas procedentes de diferentes las salas del INP, estas fueron las siguientes: oncología, terapia intensiva, prehospitalización, infectología, hematología, neumología, cirugía, urgencia, UT cardiovascular, nefrología, inmunología, gastroenterología, gastronomía, neumología trasplante y cardiología. La sala con mayor aislamiento de bacilos Gram negativos fue oncología con 48 cepas, pero sólo 6 (13%) cepas fueron BLEEs positivas, sin embargo, las salas que presentaron una mayor frecuencia de cepas productoras de BLEEs fueron terapia intensiva con 38 aislamientos de bacilos Gram negativos de estas 16 cepas fueron BLEEs positivas (42%), infectología con 34 aislamientos de bacilos Gram negativos, de estos 18 cepas fueron BLEEs positivas (53%), y finalmente cirugía con 12 aislamientos de bacilos Gram negativos con 8 cepas BLEEs positivas (67%).



**Gráfica 5.** Cepas productoras de BLEEs por sala del hospital aisladas en el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) durante el periodo de agosto 2015 a agosto 2016.



La edad de los pacientes fue desde el primer día de nacimiento hasta los 18 años de edad, con base a estos datos se organizaron 5 grupos de diferentes etapas de acuerdo a su edad que se muestran en la gráfica 6. Las etapas fueron las siguientes: Neonatal (1 Día a 1 Mes), Lactancia (2 Meses a 2 Años), Infancia I (3 Años a 7 Años), infancia II (8 Años a 12 Años) y adolescencia (13 Años a 18 Años). Durante el tiempo establecido se registraron 5 (6%) de los pacientes neonatales con cepas productoras de BLEEs, la mayor incidencia se presentó en los lactantes con 40 (46%) aislamientos de estas cepas. Los pacientes del grupo de Infancia I se registraron 20 (22%), mientras que en el grupo de la adolescencia se obtuvieron 17 (19%) y en grupo de la infancia II resultaron sólo 5 (6%) pacientes con este tipo de cepas (grafica 6).

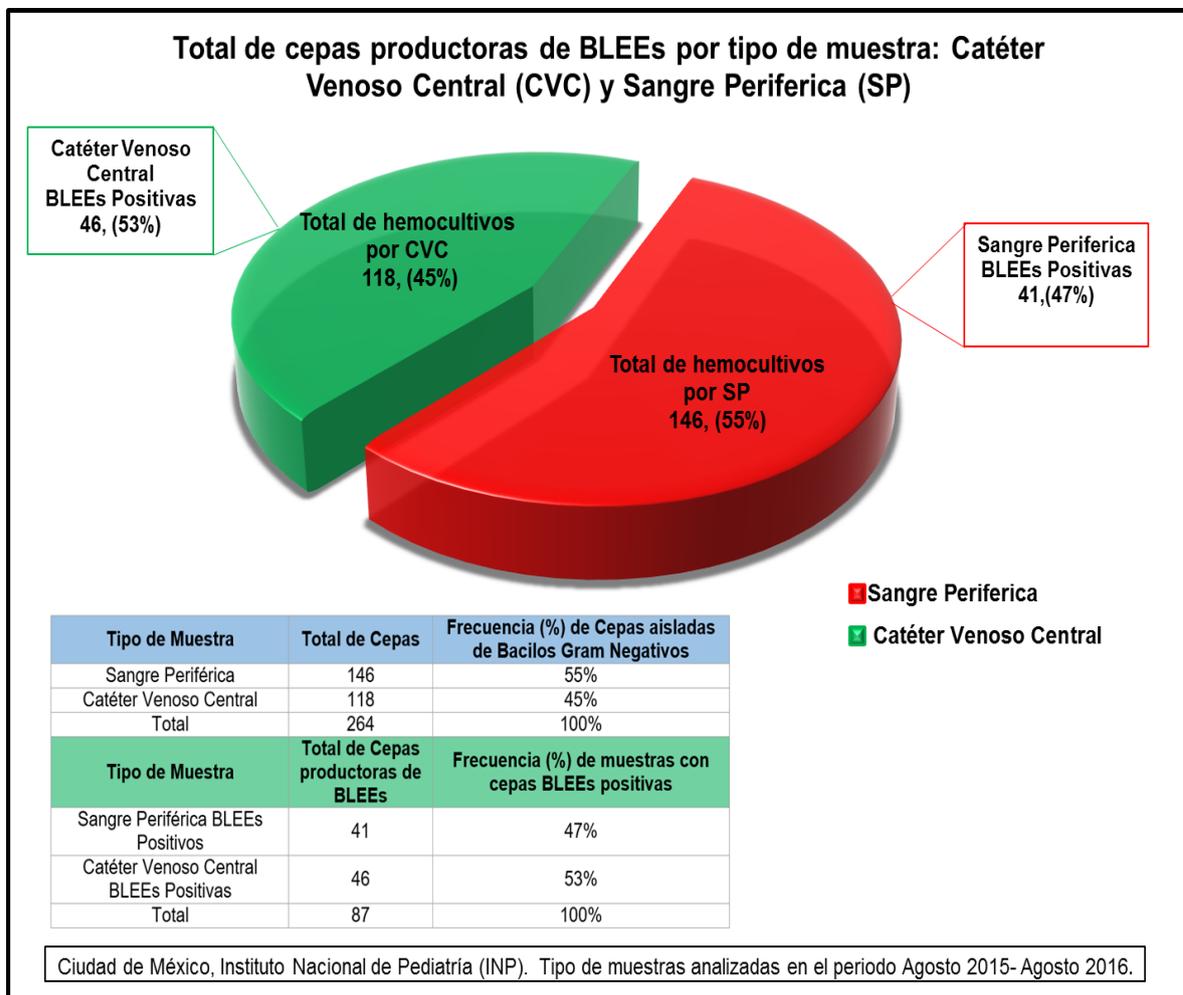


**Gráfica 6.** Frecuencia (%) de cepas BLEEs positivas por grupo de edad de los pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP).



Durante el periodo establecido se realizó la extracción de sangre a cada paciente del INP por dos métodos que fueron Catéter Venoso Central (CVC) y Sangre Periférica (SP) para posteriormente inocular la muestra en un frasco de hemocultivo.

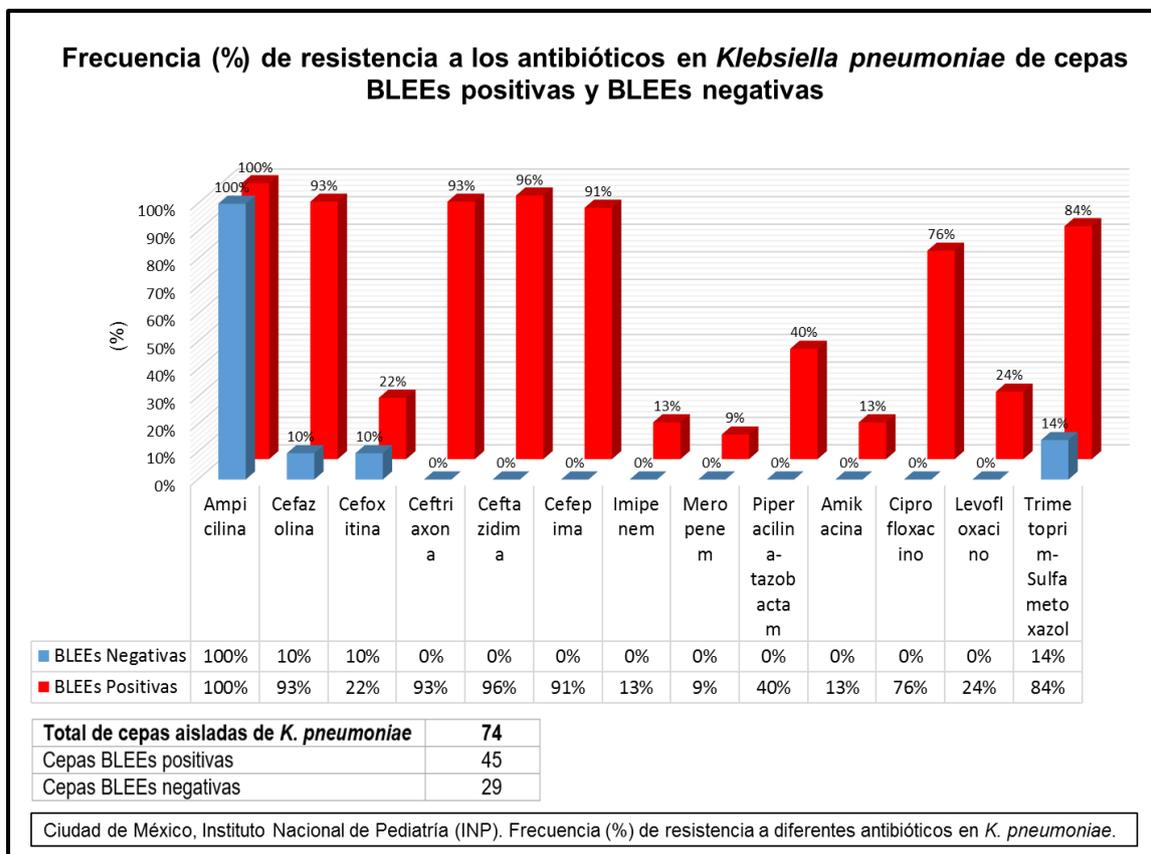
En el análisis estadístico que se presenta en la gráfica 7. Se observan las cepas que producen BLEEs obtenidas por diferentes vías (CVC y SP). De los 264 aislamientos, 118 hemocultivos fueron obtenidos de CVC y con el 53% se aislaron cepas productoras de BLEEs. Por otra parte de 146 hemocultivos obtenidos de SP, se obtuvieron 47% de aislamientos de BLEEs positivas.



**Gráfica 7.** Total de cepas productoras de BLEEs por tipo de muestra: Catéter Venoso Central (CVC) y Sangre Periférica (SP). Las cepas fueron aisladas a partir de hemocultivos en el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP).



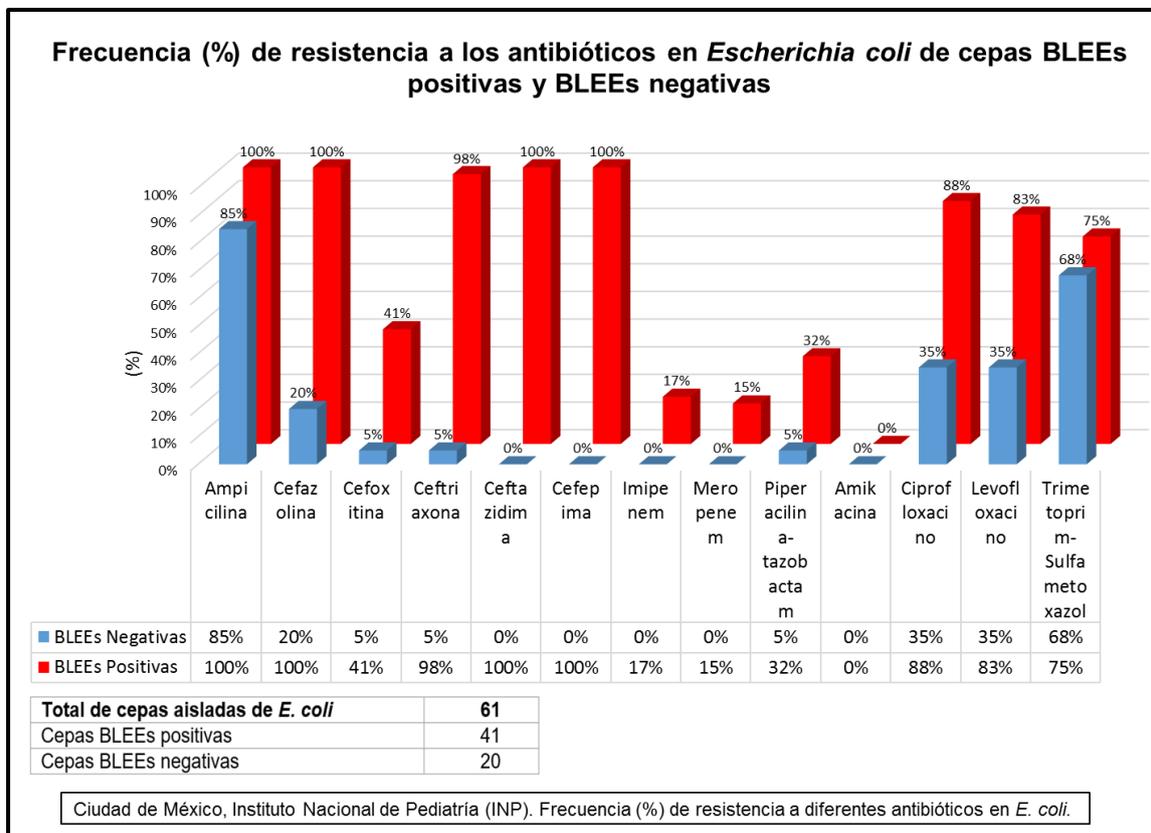
El total de cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* a partir de hemocultivos fue de 74 cepas, pero de esta cantidad sólo 45 cepas fueron productoras de BLEEs, mientras que 29 cepas no tuvieron producción de BLEEs. El antibiograma se realizó mediante el equipo automatizado **Phoenix 100®** que lo analiza por el método de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* que fueron BLEEs positivas presentaron resistencia a los siguientes antibióticos Ampicilina (100%), Cefazolina (93%), Cefoxitina (22%), Ceftriaxona (93%), Ceftazidima (96%), Cefepima (91%), Imipenem (13%), Meropenem (9%), Piperacilina-Tazobactam (40%), Amikacina (13%), Ciprofloxacino (76%), Levofloxacino (24%), Trimetoprim/Sulfametoxazol (84%). El resultado del antibiograma de *K. pneumoniae* se muestra en la gráfica 8.



**Gráfica 8.** Frecuencia (%) de resistencia a los antibióticos en *Klebsiella pneumoniae* de cepas BLEEs positivas y BLEEs negativas. Las cepas fueron aisladas del laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) durante el periodo de agosto 2015 a agosto 2016.



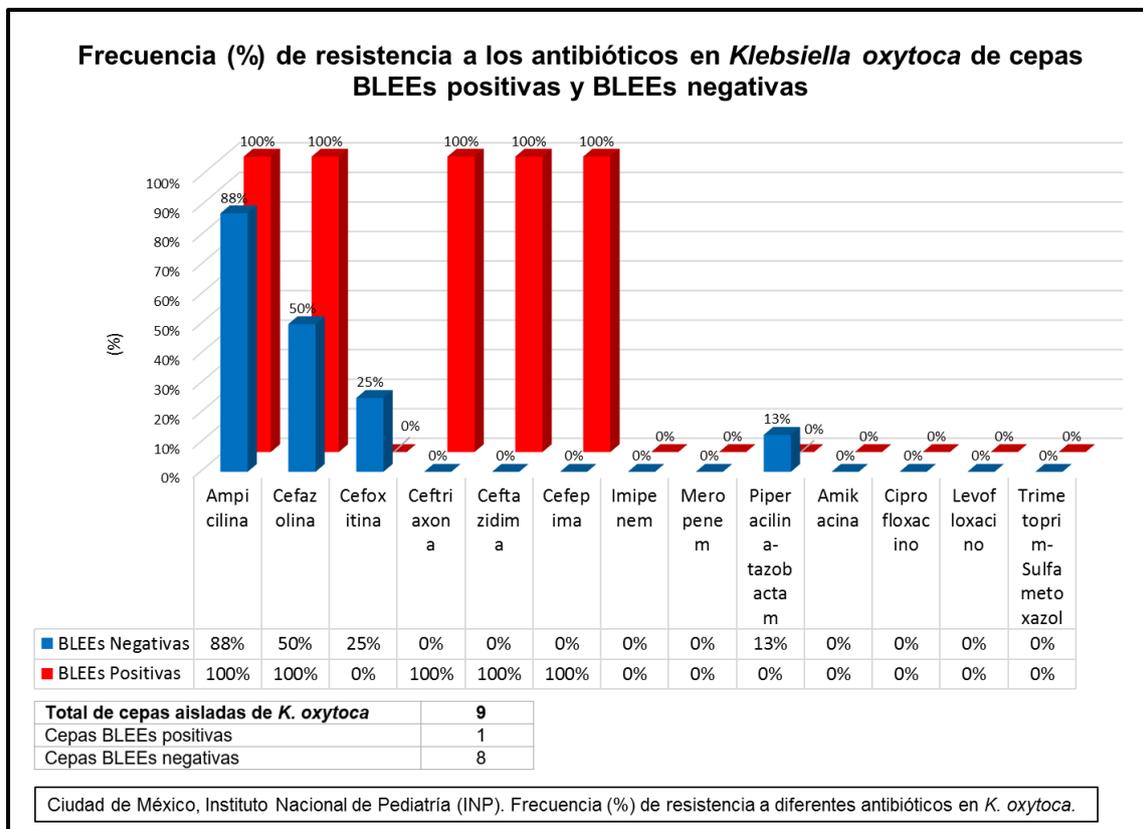
Para *Escherichia coli* el total de cepas aisladas a partir de hemocultivos fue de 61 cepas pero de esta cantidad sólo 41 cepas fueron productoras de BLEEs, mientras que 20 cepas no tuvieron producción de BLEEs. Las cepas de *Escherichia coli* que fueron BLEEs positivas presentaron resistencia a los siguientes antibióticos Ampicilina (100%), Cefazolina (100%), Cefoxitina (41%), Ceftriaxona (98%), Ceftazidima (100%), Cefepima (100%), Imipenem (17%), Meropenem (15%), Piperacilina-Tazobactam (32%), Amikacina (0%), Ciprofloxacino (88%), Levofloxacino (83%), Trimetoprim/Sulfametoxazol (75%). El resultado del antibiograma de *E. coli* se muestra en la gráfica 8.1.



**Gráfica 8.1** Frecuencia (%) de resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* de cepas BLEEs positivas y BLEEs negativas. Las cepas fueron aisladas del laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) durante el periodo de agosto 2015 a agosto 2016.



Finalmente para *Klebsiella oxytoca* el total de cepas aisladas a partir de hemocultivos fue de 9 cepas pero de éstas, sólo una cepa fue productora de BLEEs, mientras que 8 cepas no tuvieron producción de BLEE. Las cepas de *Klebsiella oxytoca* que fueron BLEEs positivas presentaron resistencia a los siguientes antibióticos: Ampicilina (100%), Cefazolina (100%), Cefoxitina (0%), Ceftriaxona (100%), Ceftazidima (100%), Cefepima (100%), Imipenem (0%), Meropenem (0%), Piperacilina-Tazobactam (0%), Amikacina (0%), Ciprofloxacino (0%), Levofloxacino (0%), Trimetoprim/Sulfametoxazol (0%). El resultado del antibiograma de *K. oxytoca* se muestra en la gráfica 8.2.



**Gráfica 8.2** Frecuencia (%) de resistencia a los antibióticos en *Klebsiella oxytoca* de cepas BLEEs positivas y BLEEs negativas. Las cepas fueron aisladas del laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) durante el periodo de agosto 2015 a agosto 2016.



## 11. DISCUSIÓN

La presencia de enzimas BLEEs producidas por enterobacterias, actualmente constituye un problema epidemiológico debido a que se detectan frecuentemente en los laboratorios de tercer nivel, además han ido aumentando su prevalencia en el ambiente hospitalario y en la comunidad en los últimos años, lo que ha generado una propagación en México y a nivel mundial.

El presente estudio tuvo como primordial enfoque conocer la frecuencia (%) de bacilos Gram negativos productores de BLEEs aislados a partir de hemocultivos en el INP durante el periodo establecido.

Se determinó una mayor frecuencia de aislamientos en bacilos Gram positivos a comparación con Gram negativos, esto se atribuye a que en los últimos años se han reportado un mayor número de aislamientos de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), asociados a infecciones en el torrente sanguíneo<sup>105</sup>. No obstante los bacilos Gram negativos son patógenos importantes que también se asocian a infecciones nosocomiales, mientras que las levaduras son poco frecuentes.

De los bacilos Gram negativos detectados el 33% corresponden a los que presentan resistencia a antibióticos por medio de las enzimas BLEEs. Este hecho se debe a que las cepas productoras de BLEEs en las últimas décadas en México han sido más frecuentes en medio hospitalario a causa del uso excesivo de antibióticos betalactámicos. Dentro de los múltiples factores predisponentes para adquirir una infección de bacterias multirresistentes, destaca el uso excesivo de antibióticos, por largo tiempo y cuando se usan combinaciones de dos o más antimicrobianos, también se puede atribuir a la prolongada estancia hospitalaria. Otros factores predisponentes pueden ser inmunosupresión causada por enfermedades, alguna cirugía, bajo peso al nacer o edad avanzada<sup>106</sup>.

En los resultados de este estudio, se observa que las enterobacterias que presentaron BLEEs fueron *K. pneumoniae* 52%, *E. coli* 47%, estas bacterias son las que se reportan con mayor frecuencia en el ámbito intrahospitalario,



con una diferencia del 5% respecto a *E. coli*, se puede confirmar que *K. pneumoniae* fue enterobacteria con mayor producción de BLEEs el en periodo de este estudio que fue de agosto 2015 a agosto 2016. En estudios realizados en diferentes hospitales en México se han reportado resultados similares. En el Hospital Infantil del Estado de Sonora se reportó a *K. pneumoniae* 44% y *E. coli* 30% como productoras de BLEEs, (tomado de la tesis de Pérez, M. G., 2010)<sup>107</sup>. Mientras que en el Hospital Infantil de México Federico Gómez se le atribuyo a *K. pneumoniae* como a una de las principales enterobacterias productoras de BLEEs, con una frecuencia del 45.3%, mientras que para *E. coli* en ese mismo hospital fue de 32.3%, (Tomado de la tesis de Cordero, 2009)<sup>108</sup>.

Una investigación más que reafirma la prevalencia de estas enterobacterias en la producción de BLEEs fue realizado también en México por (M. Navarro y Col., en el 2011) en el que participaron diferentes hospitales de Sonora entre los que fueron incluidos los siguientes (Centro Médico Dr. Ignacio Chávez del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (CMIC), Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y Hospital San José de Hermosillo (HSJH), este proyecto de investigación reporto un mayor predominio en *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEEs con una frecuencia del 35.3% y 31.8% respectivamente<sup>109</sup>.

Las investigaciones anteriores realizadas en México manifiestan que *K. pneumoniae* es una de las principales enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en el ámbito hospitalario en México, además se puede confirmar que en los últimos años se han incrementado las infecciones nosocomiales a causa de esta enterobacteria a nivel nacional<sup>107, 108, 109</sup>.

Por otra parte existen diversos estudios a nivel mundial que reportan a *K. pneumoniae* como uno de los principales bacilos Gram negativos que tienen una frecuencia elevada de resistencia antibiótica por la producción de enzimas BLEEs, los datos proporcionados por el proyecto SENTRY, procedentes de aislamientos en pacientes hospitalizados desde 1997 hasta 1999, han demostrado que *K. pneumoniae* tiene una amplia distribución a nivel mundial, aunque con algunas diferencias según las áreas geográficas. En América



Latina se ha registrado el mayor número de aislamientos de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs con el 45%, seguido de la región del Pacífico y de Europa, con el 25 y el 20%, respectivamente, siendo la incidencia mucho menor en Estados Unidos y Canadá con cifras del 8 y 5%. Aunque en el estudio el número de aislamientos de *E. coli* fue superior al de *K. pneumoniae*, el porcentaje de *E. coli* productor de BLEEs fue mucho menor, en América Latina fue alrededor del 8% en y Pacífico este, del 5% en Europa y entre el 3 y el 4% en Estados Unidos y Canadá<sup>110</sup>.

Otro estudio que afirma la prevalencia de bacilos Gram negativos especialmente de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEEs en América Latina fue reportado por (Mendes C., Et al. 1999) en donde reafirman que la resistencia mediada por BLEEs es mayor en Latinoamérica por el uso imprudente de los antibióticos, en particular de las cefalosporinas de tercera generación a causa de que en esta región el 50% de las infecciones hospitalarias y el 70% de las extrahospitalarias son tratadas con este tipo de antimicrobianos, lo que sugiere una fuerte presión selectiva en esta zona de América Latina donde la prevalencia presenta variaciones marcadas de un país a otro, en *E. coli* se reportó 5% en Argentina, hasta 63% en Perú y para *K. pneumoniae* se reportaron rangos entre 26% en Ecuador y 73% en Chile, finalmente es importante destacar que la prevalencia en México fue alta (56% en *K. pneumoniae* y 28% en *E. coli*)<sup>111</sup>.

Estas publicaciones no son las únicas que se refieren a *K. pneumoniae* y a *E. coli* como las principales bacterias productoras de BLEEs, se han reportado investigaciones más recientes que lo confirman, una de estas es el Estudio de Monitoreo de las Tendencias de Seguimiento de Resistencia a los Antimicrobianos (SMART) que reporta diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae* con elevadas tasas de producción de BLEEs, siguiendo la misma tendencia epidemiológica descrita por diferentes autores en América Latina. El estudio SMART que se realizó en el 2003 en el que incluyó a diferentes países latinoamericanos como (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, Panamá, Perú y México), se registró una frecuencia del 14% para *K. pneumoniae* y 10% para *E. coli* productores de BLEEs; Un año más tarde el



mismo estudio SMART 2004 se registró una frecuencia de BLEEs positivos del 18% para *K. pneumoniae* y 12% para *E. coli*; Años más tarde en otro estudio SMART realizado en el año 2008, se corrobora una prevalencia en la producción de las enzimas BLEEs para *K. pneumoniae* con una frecuencia del 37.7% que fue mayor a la de *E. coli* 26.8% y finalmente a la de *K. oxytoca* 20%. Por lo cual la frecuencia de producción de BLEEs en este continente Latinoamericano ha ido en aumento en especial para *K. pneumoniae* <sup>112, 113</sup>.

En el laboratorio bacteriología del INP la enterobacteria que presentó una menor frecuencia en la producción de BLEEs fue *K. oxytoca* 1%, y sólo fueron aisladas 9 cepas, esto se atribuye a que *K. oxytoca* es aislada con poca frecuencia en los laboratorios de microbiología, además esta reportada con una menor producción de BLEEs en comparación con *K. pneumoniae* y *E. coli*.

Particularmente se ha reportado que las cepas de *K. oxytoca* presentan una disminución significativa en cuanto a la producción de BLEEs. Un estudio publicado por (Strenger y colaboradores., 2011), reportaron una frecuencia del 2% en aislamientos de *K. oxytoca* productores de BLEEs de pacientes neonatos hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario de Graz (Austria) <sup>114</sup>.

Los niños en etapa de lactancia fueron los que presentaron un mayor número de aislamientos de bacilos Gram negativos productores de BLEEs, y con un mayor número de estas cepas fueron los grupos de infancia I, adolescencia, infancia II y neonatal. La lactancia es una etapa en la que existe un mayor riesgo, puesto que existen diversos reportes de infecciones por cepas productoras de BLEEs en pacientes en edad pediátrica. En el Instituto Nacional de Salud del Niño en Perú se reportó a pacientes pediátricos infectados por enterobacterias productoras de BLEEs diagnosticados en la etapa de lactancia hasta la adolescencia. En la etapa de lactancia se presentó una mayor incidencia de bacterias productoras de BLEEs con una frecuencia de 68.7% para los niños menores de 2 años de edad (etapa de lactancia) procedentes principalmente de la sala de terapia intensiva, este rango de edad reportado coincide con lo reportado en este trabajo ya que la lactancia y la infancia son los grupos mayoritariamente afectados por enterobacterias



productoras de BLEEs<sup>115</sup>. Con estos resultados se evidencia una alta frecuencia de enterobacterias productoras de BLEEs, se ha demostrado que las infecciones nosocomiales causadas por enterobacterias resistentes es un factor clave en la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEEs. La presencia de enterobacterias resistentes en los aislamientos indica que los niños pueden servir como un reservorio de cepas con genes de resistencia que se encuentran localizados en plásmidos altamente transmisibles; se han hecho reportes que esta condición se asocia con casi el doble de la mortalidad en comparación con las no productoras de BLEEs<sup>116</sup>.

Teniendo en cuenta la resistencia antibiótica de las diferentes bacterias productoras de BLEEs, siempre que se sospeche su presencia o esté documentada, los antibióticos a emplear como principal opción terapéutica son los carbapenémicos, existen diversos reportes que afirman la actividad de este antimicrobiano frente a cepas productoras de BLEEs. Los carbapenémicos son los antibióticos que presentan una mayor estabilidad frente a las BLEEs debido a su grupo químico 6-hidroxietil en posición *trans*, por esta razón se usan en el tratamiento de infecciones graves causadas por las cepas de enterobacterias productoras de BLEEs. No obstante el uso de los carbapenémicos en la práctica debe ser juicioso, primero porque constituye casi la única terapia eficaz frente a las BLEEs y segundo porque su uso indiscriminado puede inducir la aparición de otros bacilos Gram negativos no fermentadores como son (*Acinetobacter sp.*, *S. matophilia* y *Pseudomonas sp*), por tal motivo es importante que el tratamiento del paciente sea monitoreado, para llevar a cabo un buen uso racional de los antibióticos<sup>117</sup>.

En la actualidad las investigaciones confirman que la conjugación es el método más común de propagación unilateral de material genético en donde se transfieren los plásmidos que contienen genes que codifican la resistencia a diferentes grupos de antibióticos. Los plásmidos son fragmentos circundantes de ADN no contenidos en los cromosomas que pueden replicarse por sí mismos y promover su propia transmisión entre bacterias del mismo género o en diferentes especies <sup>118</sup>.



La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia genética que requiere contacto célula a célula. Para que se lleve a cabo la transferencia génica los plásmidos conjugativos contienen la información necesaria para ponerse en contacto con la otra célula a través del *pili* sexual desde la célula  $F^+$  donadora (posee un factor de fertilidad y puede donar material genético) hacia la receptora célula  $F^-$  (son células que puede recibir DNA y por recombinación lo integran a su genoma). De esta forma las bacterias adquieren los genes que codifican la resistencia a diversos antibióticos. Por otra parte los mecanismos de resistencia que adquieren las bacterias se realiza por medio de la transferencia génica mediante plásmidos y transposones, esto genera que las bacterias propaguen sus genes de resistencia entre diferentes especies<sup>119, 120</sup>.

Las bacterias Gram negativas productoras de BLEEs, además de otros microorganismos como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) y MDR-TB (*Mycobacterium tuberculosis* multirresistente), se han convertido en un importante problema de salud a nivel mundial, debido a la resistencia que pueden desarrollar, a pesar que se encuentran disponibles nuevas generaciones de antibióticos, se puede anticipar que la resistencia a los antimicrobianos continuará, por esta razón es necesario comprender los mecanismos moleculares, evolutivos que dan origen a la diseminación de la multirresistencia, entre las repercusiones que se generan en el área clínica son el aumento de la morbilidad, mortalidad y la estancia prolongada de la hospitalización de los pacientes, lo que genera elevados costos sanitarios<sup>121</sup>.

La única forma de frenar la actual crisis de resistencia antimicrobiana será desarrollar estrategias completamente nuevas para combatir estos patógenos, como la combinación de fármacos antimicrobianos con otros agentes que contrarresten y obstruyan los mecanismos de resistencia a los antibióticos expresados por el patógeno. Otra alternativa es evitar que los antibióticos se prescriban de manera inapropiada, haciendo un enfoque más personalizado basado en herramientas precisas para el diagnóstico garantizará que los tratamientos sean adecuados generando terapias más específicas y efectivas<sup>122</sup>.



El presente trabajo tiene como finalidad prevenir brotes intrahospitalarios causados por cepas productoras de BLEEs, diseminadas por medio de las infecciones nosocomiales, cuando se detecte una bacteria productora de BLEEs se debe avisar inmediatamente al médico y al comité de infecciones nosocomiales ahora llamado Comité de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (CIAAS) para que se tomen las medidas necesarias, debido a que representan un riesgo latente para los pacientes que se encuentran hospitalizados durante un periodo prolongado.

En México la prevalencia de cepas productoras de BLEEs es alta (aproximadamente 30%) en comparación con la de EUA, la frecuencia de es más baja de acuerdo al programa MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) que se realizó durante 1999 al 2004, para *E. coli* se registró 1.5% de cepas productoras de BLEEs, un nivel similarmente bajo se registró para *Klebsiella sp* 2.4 - 4.5% productora de BLEEs. Estos datos fueron corroborados por la CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) que reporta en los EUA una frecuencia de 0.5 -1% de infecciones causadas por enterobacterias productoras de estas enzimas. La frecuencia de enterobacterias productoras de BLEEs en EUA es menor debido a que se tiene un estricto control en el uso de antibióticos, dado que cuentan con la supervisión y estadísticas de la CDC, además se cuentan con distintos comités que ayudan a disminuir la incidencia de infecciones nosocomiales<sup>123</sup>.

Para prevenir que una bacteria genere resistencia o multiresistencia el personal médico de todas las áreas del hospital debe tener un estricto control en el uso racional de antibióticos, además de mantener una estrecha vigilancia y comunicación con el laboratorio de bacteriología. En el caso de la detección de una bacteria que presente producción de BLEEs o sea multiresistente se debe informar inmediatamente al CIAAS.



## 12. CONCLUSIONES

1. A partir de hemocultivos se aislaron un total de 87 cepas (33%) de bacilos Gram negativos productores de BLEEs, en el periodo de agosto 2015 a agosto 2016 en el INP.
2. La bacteria con una mayor frecuencia en la producción de BLEEs fue *K. pneumoniae* de esta bacteria se aislaron 74 cepas en total, 45 cepas presentaron producción de BLEEs con una frecuencia del (52%) de positividad.
3. Los pacientes del INP con mayor incidencia de BLEEs fueron los que están en etapa de lactancia (2 meses a 2 años) con 40 casos lo que representa una frecuencia del (46%).
4. Los servicios del INP que presentaron una mayor incidencia de cepas productoras de BLEEs fueron infectología con 18 cepas (53%) y terapia intensiva con 16 cepas (42%).
5. El mes de Noviembre del año 2015, fue el que registro la mayor incidencia de cepas con BLEEs con 11 casos lo que representa una frecuencia de (13%), este porcentaje representa a las bacterias, *K. pneumoniae* con 7 cepas (8%) y *E. coli* con 4 cepas (5%).
6. Como se observó en este estudio las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEEs presentaron una alta resistencia a betalactámicos (90%) y también a otros antimicrobianos que pertenecen a diferentes grupos, estos fueron ciprofloxacino, levofloxacino y trimetoprim/sulfametoxazol.



7. Cuando se detecte una bacteria BLEEs positiva se debe reportar resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, aún cuando la metodología usada para el antibiograma dé como resultado sensible para alguno de estos antibióticos. La detección oportuna de una cepa productora de BLEEs facilita la selección del tratamiento antimicrobiano, evitando así la morbilidad y mortalidad asociadas a fracaso terapéutico, disminuyendo la estancia hospitalaria de los pacientes, así como los costos de hospitalización y tratamiento.



## ANEXO I

**Tabla 9.** Componentes de los frascos de cultivo BD BACTEC Peds Plus/F®

Componentes	Cantidad/Unidades
Agua procesada	40 mL
Caldo digerido caseína-soya	2.75% p/v
Extracto de levadura	0.25% p/v
Caldo digerido de animales	0.10% p/v
Piruvato de sodio	0.10% p/v
Dextrosa	0.06% p/v
Sacarosa	0.08% p/v
Hemina	0.0005% p/v
Menadiona	0.00005% p/v
Polianetolsulfonato sódico (SPS)	0.020% p/v
Piridoxal HCl (Vitamina B <sub>6</sub> )	0.001% p/v
Resina adsorbente no iónica	10.0% p/v
Resina de intercambio catiónico	0.6% p/v
Dióxido de carbono CO <sub>2</sub>	En pequeñas cantidades

**Tabla 10.** Pruebas bioquímicas que contiene el panel NMIC/ID-406 del sistema BD Phoenix100® para la identificación de Gram negativos.

Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato
Acetato	$\beta$ -gentobiosa	Glicina-prolina	L-triptófano
Acido $\alpha$ -cetoglutarico	Citrato	Glutaril-glicina-arginina	Malonato
Acido D-gluconico	Dextrosa	L-arabinosa	Maltulosa
Acido galacturonico	D-fructuosa	L-arginina	N-acetil galactosamina
Acido L-glutámico	D-galactosa	L-fenilalanina	N-acetil-glicosanimida
Acido L-piroglutámico	D-manitol	Lisina-alanina	Ornitina
Ácido tiglico	D-melobiosa	L-leucina	Sorbitol
Adonitol	Esculina	L-prolina	Sucrosa
$\beta$ -alosa	Glicina	L-rammnosa	Urea



**Tabla 11.** Los diferentes antibióticos que contiene el panel NMIC/ID-406 del sistema BD Phoenix100® para la identificación de Gram negativos.

Antibiótico	Antibiótico	Antibiótico	Antibiótico
Acido nalidíxico	Cefotaxima	Colistina	Norfloxacino
Amikacina	Cefotetan	Gatifloxacina	Ofloxacino
Amoxicilina/Clavunato	Cefoxitina	Gentamicina	Pefloxacino
Ampicilina	Cefpiroma	Grapafloxacino	Piperacilina
Ampicilina/Sulbactam	Cefpodoxima	Imipenem	Piperacilina/Tazobactam
Aztreonam	Cefsulónida	Isepamicina	Tetraciclina
Cefalotina	Ceftazidima	kanamicina	Ticarcilina
Cefalexina	Cefibuten	Levofloxacino	Ticarcilina/Clavulanato
Cefazolina	Ceftizoxima	Lomefloxacino	Tobramacina
Cefdinir	Ceftriaxona	Meropenem	Trimetoprim/Sulfametoxazol
Cefepime	Cefuroxima	Moxifloxacino	Trimetoprima
Cefetamet	Ciproxacino	Netilmicina	Trovafloxacino
Cefmetazol	Cloranfenicol	Nitrofurantoina	-----



### 13. REFERENCIAS

1. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller, MD. Microbiología médica, 6<sup>a</sup>, 2009, Edit. El Servier Mosby. España, Barcelona. Páginas: 179-180; 33; 301-302; 303- 306; 307:309; 310-312.
2. Albert Balowns, William J. Hausler, Jr, Kenneth L., Herrmann, Henry D. Isenberg, H. Jean Shadomy. Manual of Clinical Microbiology. 5<sup>a</sup> edit. Edit American society microbiology. 1991. Páginas: 360; 364.
3. Garza Velasco R., Et al. Manual de Bacteriología Experimental. 1<sup>a</sup> Edit. Universidad autónoma de México Facultad de Química.2011. Páginas 69-75.
4. Wolfgang K. Joklink, D.Phil, Hilda P. Willett, D. Bernard Amos, Catherine M Wilfert, M.D. Zinsser Microbiología, 20<sup>a</sup> edit, editorial medica panamericana, 1992. Páginas 736-737; 739-742.
5. Paul Singleton, Bacterias en Biología, biotecnología y Medicina, 5<sup>a</sup> edición, 2004. Edit. Acrabia, S.A. Zaragoza (España). Páginas 22-24; 29-30.
6. Geo. F Brooks, MD, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, PhD, Stephen A. Morse, Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg, Decimonovena edición, 2008, Edit. Manual moderno, Colombia, Bogotá. Páginas 157-159; 167-168.
7. Puerta-García, A., and F. Mateos-Rodríguez. "Enterobacterias." Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado 10.51 (2010): 3426-3431.
8. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, Microbiology an introduction, 9<sup>a</sup> edition, editorial Pearson Benjamin Cummings 2007 páginas: 506-508.
9. Martha T. Nester, Eugene W. Nester, Denise G. Anderson, C. Evans Roberts, Jr. Microbiología humana ed. 5<sup>a</sup> 2007, editorial Manual moderno Colombia Bogotá. 438-440.
10. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, David A. Stahl. Brock Biology of Microorganisms, 14<sup>a</sup> edit, edición Pearson 2015. Páginas 48-49.



11. Clermont, Olivier, Stéphane Bonacorsi, and Edouard Bingen. "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group." *Applied and environmental microbiology* 66.10 (2000): 4555-4558.
12. Rodríguez-Angeles, Guadalupe. "Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups." *Salud Pública de México* 44.5 (2002): 464-475.
13. Logue, Catherine M., et al. "Comparative Analysis of Phylogenetic Assignment of Human and Avian ExPEC and Fecal Commensal *Escherichia coli* Using the (Previous and Revised) Clermont Phylogenetic Typing Methods and its Impact on Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Classification." *Frontiers in microbiology* 8 (2017).
14. Duriez, Patrick, et al. "Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations." *Microbiology* 147.6 (2001): 1671-1676.
15. Clermont, Olivier, et al. "The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups." *Environmental microbiology reports* 5.1 (2013): 58-65.
16. Croxen, Matthew A., et al. "Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*." *Clinical microbiology reviews* 26.4 (2013): 822-880.
17. Evans Jr, Doyle J., and Dolores G. Evans. "Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factors, with special reference to colonization-factor antigens." *Reviews of infectious diseases* 5.Supplement\_4 (1983): S692-S701.
18. Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry LT Mobley. "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nature Reviews Microbiology* 2.2 (2004): 123-140.
19. Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., & Faruque, A. S. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*, 382(9888), 209-222.



20. Torres, Alfredo G., ed. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science Publishers, 2010.
21. Nataro, James P., and James B. Kaper. "Diarrheogenic escherichia coli." *Clinical microbiology reviews* 11.1 (1998): 142-201.
22. N. Cary Engleberg. Victor J. Dirita, Terence S. Dermody, Schaechter's mechanisms of microbial disease 5ª Edit, Editorial Wolters Kluwer, 2013 páginas: 195-197;198-205; 206-210; 211-215; 216-219.
23. Tarkkanen A, Virkola R, Clegg S, Korhonen T. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect Immun* 1997; 65: 1546-1549.
24. C. López Ibáñez, E. Vidal Verdú, A. Rivero y J. Torre-Cisneros. Infecciones por bacilos Gram negativos no fermentadores (I): *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter sp.*, *Serratia marcescens* y otros Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España Volumen 10 (51), 2010, Páginas 3426-81.
25. Rodríguez C, Radice M, Perazzi B, Castro S, Juárez J, Santini P et al. Resistencia enzimática a betalactámicos en el género *Proteus* y evaluación de los fenotipos y genotipos de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *Proteus mirabilis*. *Enf Inf Microbiol Clin* 2005; 23: 1226.
26. Archer G., Polk R. Tratamiento y profilaxis de las Infecciones Bacterianas Kasper D., Fauci A. Longo D., Braunwald E., Hauser S., Jameson J. Harrison Principios de Medicina Interna 16ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2006.p. 884-902.
27. J. I. Ahumada Vázquez, Ma. L. Santana Falcón, J. S. Serrano Molina. Farmacología práctica para las diplomaturas en Ciencias de la Salud, 1ª edición, Edit. Díaz de Santos, Madrid (2002) págs. 244-253.
28. Peach, Kelly C., et al. "Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis." *Molecular BioSystems* 9.7 (2013): 1837-1848.
29. Dr. Ernesto Calderon Jaimes, Dr. Jose Luis Arredondo Garcia, Dr, Eduardo Nasrallah Rada, Dr. Carlos Jesús Conde Gonzalez. Dr. Carlos



- Amabile cuevas. Aplicación de antibióticos y quimioterápeuticos 11<sup>a</sup>, 2008. Méndez editores. Páginas 175-185.
30. P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, J.C. Leza, M.A. Moro, A. Portolés. Velázquez Farmacología Básica y Clínica 18<sup>a</sup> ed. Buenos aires, Médica Panamericana (2008). págs. 825-827.
31. Korzybski, Tadeusz, Zuzanna Kowszyk-Gindifer, and Wlodzimierz Kurylowicz. *Antibiotics: origin, nature and properties*. Elsevier, 2013.
32. Dover LG, Alderwick LJ, Brown AK, Futterer K, Besra GS. Regulation of cell wall synthesis and growth. *Curr Mol Med*. 2007;7:247–76
33. Suarez, Cristina, and Francesc Gudiol. "Antibióticos betalactámicos." *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 27.2 (2009): 116-129.
34. Koneman E, Allen S. *Diagnostico microbiológico Texto y atlas a color*. 5<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana; 1995 págs. 765-767.
35. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32:234–58 Fe de errores en: *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32:556.
36. Elander, R. P. "Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics." *Applied microbiology and biotechnology* 61.5-6 (2003): 385-392.
37. Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Geo. F. Brooks, Stephen A. Morse, Timothy A Mietzner. Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología Médica*. 25<sup>a</sup>. Edit. Mc Graw Hill (2010) págs. 342-345.
38. O'Callaghan, Cynthia H. "Classification of cephalosporins by their antibacterial activity and pharmacokinetic properties." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1.suppl\_3 (1975): 1-12.
39. Cruz Cruz, Elso, and Grettel Díaz Ramón. "Modelación molecular de antibióticos betalactámicos: una preocupación de todos." *Medisur* 8.1 (2010): págs. 13-19.
40. Williams, J. D., et al. "Classification of oral cephalosporins. A matter for debate." *International journal of antimicrobial agents* 17.6 (2001): 443-450.



41. Kerry L. LaPlante, Cheston B. Cunha, Haley J. Morrill, Louis B. Rice, Eleftherios Mylonakis. Antimicrobial Stewardship: Principles and Practice 1<sup>a</sup> Edition, edit. CABI 2017 Págs.201-207.
42. Peter Davey, Mark Wilcox, Willian Irving & Guy Thwaites. Antimicrobial Chemotherapy 7<sup>a</sup> Edition, edit University press Oxford 2015. Págs.39-43.
43. Andraca Perera, José Raúl, Enrique Rodríguez Gil, and Alexander Fundora Santana. "Cefalosporinas." Revista Cubana de Farmacia 35.3 (2001): 219-222.
44. Edward O. Stapley, Jerome Birnbaum, A. Kathrine Miller, Hyman Wallick, David Hendlin, H. Boyd Woodruff; Cefoxitina y Cefamicinas: Estudios Microbiológicos. Rev Infect Dis 1979; 1 (1): 73 - 87.
45. Jackson, L. Cordiés, L. A. Machado, and María Lilliam Hamilton. "Principios generales de la terapéutica antimicrobiana." Acta médica 8.1 (1998): 13-27.
46. Thompson, Rodney L. Cephalosporin, carbapenem, and monobactam antibiotics. En Mayo Clinic Proceedings. Elsevier, 1987. p. 821-834.
47. Ochoa, Sara A., et al. "Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas." *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 70.2 (2013): 136-150.
48. Barcelona, Laura, Marcelo Marin, and Daniel Stamboulian. "Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas: amoxicilina-sulbactam." Medicina (Buenos Aires) 68.1 (2008): 65-74.
49. Williams, J. D. " $\beta$ -lactamasas and  $\beta$ -lactamase inhibitors." International journal of antimicrobial agents 12 (1999): S3-S7.
50. Pratt, R. F.  $\beta$ -Lactamase: inhibition. En The chemistry of  $\beta$ -lactams. Springer Netherlands, 1992. p. 229-271.
51. Miller, Linda A., Kapila Ratnam, and David J. Payne. " $\beta$ -lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments." Current opinion in pharmacology 1.5 (2001): 451-458.
52. Reyes, H. Navarro P., Reyes H. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Antib Inf.1998; 2:12-19.



53. Kaye K, Fraimow H, Abrutyn E. pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and Clinical management. Infectious Diseases Clinics of North America. 2000; Vol. 14, págs. 293-319.
54. Kapil A. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. Indian J Med Res. 2005; 121:83-91.
55. Hooper DC. Mechanism of action and resistance of older and new fluoroquinolones. Clin Infect Dis 2000; 31: (1) 24-28.
56. Moreira MAS, DeSouza EC, De Moraes CA. Multidrug efflux systems in Gram negative bacteria. Braz J Microbiol. 2004; 35:19-28.
57. Tafur, José David, Julián Andrés Torres, and María Virginia Villegas. "Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria." Infectio 12.3 (2008): 227-232.
58. Alós, J. I., and M. Carnicero Bujarrabal. "Consumo de antibióticos y resistencia bacteriana a los antibióticos:" algo que te concierne". *Medicina clínica* 109.7 (1997): 264-270.
59. Navarro, Ferran, et al. "Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos." *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica* 29.7 (2011): 524-534.
60. Dexheimer, G. M., Prediger, J., Weidlich, L., & Pozzobon, A. (2015). Prevalence of resistance and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated in a hospital in Southern Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 9(5), 294-300.
61. Fernandes, Rúben, Paula Amador, and Cristina Prudêncio. " $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance." *Reviews in Medical Microbiology* 24.1 (2013): 7-17.
62. Lautenbach, Ebbing, et al. "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes." *Clinical Infectious Diseases* 32.8 (2001): 1162-1171.



63. Ghafourian, Sobhan, et al. "Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology." *Extended Spectrum Beta-lactamases* (2014).
64. André Bryskier, Catherine Couther, and John Lowther. Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals. André Bryskier, 1ª edición. Ed. ASM Press, Washington, USA, 2005. Págs. 410-420.
65. Bush, Karen, George A. Jacoby, and Antone A. Medeiros. "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39.6 (1995): 1211.
66. Patrice Courvalin, Roland Leclereq, Louis B. Rice. *Antibiogram Publishing*, 1ª edición. Ed. ASM Press USA 2010 págs. 136-153.
67. Bush, K. "The impact of beta-lactamases on the development of novel antimicrobial agents." *Current opinion in investigational drugs* (London, England: 2000) 3.9 (2002): 1284-1290.
68. Bradford. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21 st Century: Characterización epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14(4): 933-951.
69. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum betalactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14(1): p.154-158.
70. Salim Martínez P. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. Montería Colombia: Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico: 2005. P. 23-25.
71. David G. White, Michael N. Alekshun, and Patrick F. Mc Dermott. *Frontiers in Antimicrobial Resistance: a Tribute to Stuart B. Levy*. ASM Press. Washington DC. USA 2005 págs. 247-248.
72. Jacoby, George A., and Luisa Silvia Munoz-Price. "The new  $\beta$ -lactamases." *New England Journal of Medicine* 352.4 (2005): 380-391.
73. Gobernado, M. "Betalactamasas de espectro extendido en aumento." *Rev Esp Quimioterap* 18.2 (2005): 115-17.



74. Jacoby, George A. "Editorial response: epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases." *Clinical Infectious Diseases* (1998): 81-83.
75. Rossolini, G. M., M. M. D'andrea, and C. Mugnaioli. "The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases." *Clinical Microbiology and Infection* 14.s1 (2008): 33-41.
76. De Kraker, M. E. A., et al. "The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System." *Clinical Microbiology and Infection* 19.9 (2013): 860-868.
77. Gniadkowski, M. "Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms." *Clinical Microbiology and Infection* 7.11 (2001): 597-608.
78. Silva, J., et al. "Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of enterobacteria in Mexico." *Microbial Drug Resistance* 5.3 (1999): 189-193.
79. Aranda, Celia M. Alpuche, and Carlos A. Daza Timaná. "Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 22.4 (2002): 192-199.
80. Jiménez, Adriana, and Germán Alonso Carrero Forero. "Factores de riesgo en infección y colonización por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido." *Repert. med. cir* 22.1 (2013): 10-20.
81. Rodríguez-Martínez J M. Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:25-31.
82. Willetts, N., and B. Wilkins. "Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation." *Microbiological reviews* 48.1 (1984): 24.
83. Taroco, R., V. Seija, and R. Vignoli. "Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica." Chapter 36 (2006): 663-671.
84. Gavin, Patrick J., et al. "Clinical correlation of the CLSI susceptibility breakpoint for piperacillin-tazobactam against extended-spectrum- $\beta$ -



- lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50.6 (2006): 2244-2247.
85. Drieux L, Brossier F, Sougakoff, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(Suppl.1) 90-103.
86. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48 Suppl 1:59-64.
87. Sacaquispe Contreras, Rosa, and Jorge Velásquez Pomar. "Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión." (2008).
88. Cona, T. "Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar." *Revista chilena de infectología* 19 (2002): 77-81.
89. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty seventh edition informational supplement. M100-S27. Wayne (PA), USA: 2017.
90. Carter, Michael W., et al. "Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method." *Journal of Clinical Microbiology* 38.11 (2000): 4228-4232.
91. Gupta, Varsha, Nidhi Singla, and Jagdish Chander. "Detection of ESBLs using third & fourth generation cephalosporins in double disc synergy test." *Indian Journal of Medical Research* 126.5 (2007): 486.
92. Schreckenberger, P.C. Conundrums in the Laboratory Detection of Antimicrobial Resistant Gram-negative Bacteria. *Reviews in Medical Microbiology.* 2004; 15:45-49.
93. Drieux, L., et al. "Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide." *Clinical Microbiology and Infection* 14.s1 (2008): 90-103
94. Sanders, Christine C., et al. "Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test." *Journal of clinical microbiology* 34.12 (1996): 2997-3001.



95. Ho, Pak-Leung, et al. "Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes." *Scandinavian journal of infectious diseases* 34.8 (2002): 567-573.
96. Bell, Jan M., et al. "Prevalence and significance of a negative extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific surveillance program." *Journal of clinical microbiology* 45.5 (2007): 1478-1482.
97. Grover, S. S., et al. "Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin." *Journal of Infection* 53.4 (2006): 279-288.
98. Cattoir, Vincent, et al. "Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates." *Journal of antimicrobial chemotherapy* 60.2 (2007): 394-397.
99. Linscott, Andrea J., and William J. Brown. "Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests." *Journal of clinical microbiology* 43.3 (2005): 1081-1085.
100. Eckert, C., V. Gautier, and G. Arlet. "DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla CTX-M genes." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57.1 (2005): 14-23.
101. Feizabadi, Mohammad Mehdi, et al. "Distribution of bla TEM, bla SHV, bla CTX-M genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran." *Microbial drug resistance* 16.1 (2010): 49-53.
102. Chanawong, Aroonwadee, et al. "Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)." *FEMS microbiology letters* 184.1 (2000): 85-89.



103. Huang, Te-Din, et al. "Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae." *Journal of clinical microbiology* 48.6 (2010): 2091-2096.
104. Reglier-Poupet, Helene, et al. "Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases." *Journal of medical microbiology* 57.3 (2008): 310-315.
105. Weinstein, Robert A., et al. "Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli." *Clinical Infectious Diseases* 41.6 (2005): 848-854.
106. Martínez-Martínez, Luis, and Jorge Calvo. "El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual." *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 28 (2010): 25-31.
107. Pérez M.G.D. Identificación de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* sospechosas de producción de betalactamasas de espectro extendido en el hospital infantil del estado de sonora 2009. Tesis médico especialista en pediatría. UNAM.2010.52 págs.
108. Cordero, L.J.A. Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de hemocultivos de pacientes pediátricos con sepsis. Tesis médico especialista en Infectología. UNAM.2009.49 págs.
109. Navarro M, Robles E, Garibay E, Ruiz E. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de betalactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Salud Pública México*. 2011; 53:341-4.
110. Diekema, D. J., et al. "Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997." *Clinical Infectious Diseases* 29.3 (1999): 595-607.
111. Mendes C, Rossi A, Prado V, Zurita J, Robledo J, Guzmán M, et al. Comparative evaluation of the susceptibility to the antimicrobials of



- Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Shigella* isolates from clinical specimens in Latin-America. The Resistent Group summaries of the Infectious Diseases Society of America (IDSA) 37 Annual Meeting Philadelphia, PA; 1999.p.57.
112. Baquero, F., et al. "Patrones de sensibilidad a antimicrobianos de Enterobacteriaceae causantes de infecciones intraabdominales en España: resultados del estudio SMART 2003." Rev Esp Quimioter 19 (2006): 51-59.
113. Villegas M., Guzmán B., Sifuentes-Osorio J., et al." Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America-2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). (2010), Braz J. Infect Dis 2011; 15(1):34-39.
114. Strenger, Volker, et al. "Orally administered colistin leads to colistin-resistant intestinal flora and fails to prevent faecal colonisation with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteria in hospitalised newborns." International journal of antimicrobial agents 37.1 (2011): 67-69.
115. Colquechagua Aliaga, Fabiola, Carlos Sevilla Andrade, and Edgar Gonzales Escalante. "Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú." Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 32.1 (2015): 26-32.
116. Schwaber, Mitchell J., and Yehuda Carmeli. "Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60.5 (2007): 913-920.
117. Gaité, F. Barcenilla, et al. "Nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de las bacterias multirresistentes en Unidades de Cuidados Intensivos." Rev Esp Quimioter 21.1 (2008): 9-13.
118. Willetts, N., and B. Wilkins. "Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation." Microbiological reviews 48.1 (1984): 24.



119. Lanka, Erich, and Brian M. Wilkins. "DNA processing reactions in bacterial conjugation." *Annual review of biochemistry* 64.1 (1995): 141-169.
120. Guzmán, Militza, and Guillermina Alonso. "Integrones clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*." *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 28.2 (2008).
121. Maisch, Tim, et al. "Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) a new approach to treat superficial infections in the 21st century." *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 9.5 (2011): 360-366.
122. García-Sánchez, José Elías, et al. "Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro?" *Revista Española de Quimioterapia* 25.2 (2012).
123. Dhillon, Rishi H-P., and John Clark. "ESBLs: A Clear and Present Danger?." *Critical Care Research and Practice* 2012 (2012).