



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Prevalencia de cepas de enterobacterias productoras de β -
lactamasas de espectro extendido (BLEE) en pacientes
pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ANA ROSA MENDEZ CRUZ

Asesor: Q. F. B. Dulce María Ruvalcaba Sil

Coasesor: Dra. Briceida López Martínez

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la:

Prevalencia de cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

Que presenta la pasante: **Ana Rosa Méndez Cruz**

Con número de cuenta: **30403163-6** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de febrero de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	QFB. Dulce María Ruvalcaba Sil	
VOCAL	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	
SECRETARIO	QFB. Verónica Ruiz Solorio	
1er SUPLENTE	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
2do SUPLENTE	M. en C. Jazmín Flores Monroy	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Agradecimientos

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez, principalmente a mis asesoras la Dra. Briceida López Martínez, Jefa del laboratorio clínico central y mi profesora de Bacteriología Q. F. B. Dulce María Ruvalcaba Sil de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por su incalculable ayuda y orientación en el desarrollo de esta tesis.

A mi honorable jurado por la revisión por la enorme contribución en el mejoramiento del presente trabajo.

A todo el personal del Laboratorio de Bacteriología del Laboratorio Clínico Central del Hospital Infantil Federico Gómez, por ser parte importante de mi formación profesional y porque con su convivencia hicieron agradables los días de trabajo. A la Q. F. B. Ma. Carmen Castellanos Cruz por su apoyo, interés y ayuda profesional, a Q. Ma. Lucia Tapia Madrigal, Q.F.B. Yolanda Jiménez Tapia, Q.F.B. Araceli de León Ham, Q.F.B. Virginia Alcázar López, Q. F. B. María Elena Mejía Albarran, Q. F. B. María Isabel Franco Hernández y Q. F. B. Lilia Pichardo Villalón, donde buscando asesoría y conocimientos encontré una maravillosa amistad en cada una de ellas: gracias por su gran apoyo en el proceso de mi formación profesional.

A la *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán* y la *Universidad Nacional Autónoma de México*, que me abrieron sus puertas de sabiduría y conocimiento a una estudiante más que no sabía química y microbiología, pero que ocupara siempre los conocimientos recabados a los largo de estos años 5 en servicio del ser humano, con profesionalismo, integridad, justicia, ética, honradez y seguridad.

A *mis profesores*, cuyas enseñanzas me guiaron en toda la carrera y contribuyeron a mi formación: gracias por todos sus conocimientos y apoyo incondicional en estos años, los mejores de mi vida. Gracias a ustedes he aprendido ha ser mejor ser humano, fue un honor y total privilegio ser su alumna.

A *mis compañeros y amigos*, los cuales por razones de espacio no puedo nombrarlos a todos, sin embargo: gracias por su apoyo en los momentos difíciles, por las palabras de aliento cuando no existía la luz al final del túnel, gracias por escucharme y apoyarme siempre.

Dedicatoria

A las personas más importantes de mi vida:

A *mis padres* (Cirila Cruz Gutiérrez y Eulalio Méndez Sánchez “Lala”), por su inmenso apoyo, comprensión, sabias palabras y amor, por creer en mi, por cuidarme siempre en mi camino, que ahora comienzo como profesional... les estaré eternamente agradecida.

A *mi hermana* (Lic. en Historia María Isabel Méndez Cruz), que ha estado a mi lado en todo momento, brindándome su apoyo, comprensión y grandes consejos: gracias por los miles de momentos felices, esperando estar juntas siempre.

Este es un tributo a ustedes, no hay mejor ejemplo de fuerza, tenacidad, sabiduría, amor y ganas de salir adelante, siempre me he sentido orgullosa de ser parte de esta familia. Por los mejores momentos, por hacerme feliz. Los amo.

Hospital Infantil Federico Gómez



El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de Q. F. B. Dulce María Ruvalcaba Sil y la Dr. Briceida López Martínez en el Laboratorio de Bacteriología del Laboratorio Clínico Central del Hospital Infantil Federico Gómez. Secretaria de Salud. México.

Índice

1. Abreviaturas.....	7
2. Resumen estructurado del protocolo de tesis.....	10
3. Marco Teórico	
a) Introducción.....	12
b) Antecedentes.....	13
4. Planteamiento del Problema.....	86
5. Justificación.....	87
6. Objetivos	
a) Objetivo General.....	89
b) Objetivos Particulares.....	89
7. Metodología	
a) Aislamiento.....	90
b) Identificación de enterobacterias.....	90
c) Procedimiento para la obtención del perfil de susceptibilidad a antibióticos y la detección de producción de BLEE.....	91
d) Diseño del estudio.....	93
e) Criterios de selección.....	93
f) Variables.....	94
8. Resultados	
a) En el 2010.....	96
b) En el 2011.....	105
c) Comparativo (2010-2011).....	114
9. Discusión de resultados.....	117
10. Conclusiones.....	140
11. Sugerencias de acuerdo a los resultados del estudio.....	141
12. Gráficas.....	144
13. Anexo I.- Métodos fenotípicos iniciales.....	163
14. Anexo II.- Métodos bioquímicos.....	169
15. Anexo III.- Métodos genotípicos.....	171

16. Anexo IV.- Bioensayos.....	173
17. Anexo V.- Otros sistemas automatizados para la detección de BLEE.....	177
18. Anexo VI.- Detección de BLEE en microorganismos productores de AmpC..	179
19. Anexo VII.- Consideraciones generales en la interpretación de resultados de producción de BLEE.....	187
20. Bibliografía.....	189

Abreviaturas

AFB	Ácido Fenil Borónico
AMC	Amoxicilina-Ácido Clavulánico
AMP ó AM	Ampicilina
AMS	Amoxicilina/Sulbactam
AMX	Amoxicilina
AN	Amikacina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZT	Aztreonam
BLEE ó ESBL	(Betalactamasa de Espectro Extendido ó <i>Extended Spectrum Betalactamase</i>)
CASFM	Comité de Antibiogramas de la Sociedad Francesa de Microbiología ó <i>Comite De L'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie</i>
CAZ	Ceftazidima
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades ó <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CF	Cefalotina
CIM ó MIC	Concentración Mínima Inhibitoria ó <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	(Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico ó <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CMN	Centro Médico Nacional
CMT	Complejo de Betalactamasas TEM ó <i>Complex Mutant TEM</i>
CPD	Cefpodoxima
CRO	Ceftriaxona
CT/CTL	Tira de Etest de Cefotaxima/Cefotaxima-Ácido Clavulánico
CTX ó FOT	Cefotaxima
DDST	Prueba de Sinergia de Doble Disco ó <i>Double Disc Synergy Test</i>
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

EARSS	Sistema de Vigilancia Europea de Resistencia a los Antimicrobianos ó <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance System</i>
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraácetico
EMA	Enzimas Modificadores de Aminoglucósidos
EUCAST	Comite Europeo de Pruebas de Suceptibilidad a Antimicrobianos ó <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FEP	Cefepima
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FOX	Cefoxitina
FT ó NIT	Nitrofurantoína
GEN ó GM	Gentamicina
HIES	Hospital Infantil del Estado de Sonora
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
IEF	Isoelectroenfoque
IMP	Imipenem
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IRT	Betalactamasas Resistentes a los Inhibidores de TEM ó <i>Inhibitor Resistant TEM</i>
Km	Constante de Afinidad
MBL	Metalobetalactamasas
MER	Meropenem
MHA ó MH	Agar Müeller-Hinton
MH-cla	Agar Müeller-Hinton suplementado con clavulanato de litio
MYSTIC	Prueba de Recolección de Información Anual de Susceptibilidad al Meropenem ó <i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
NCCLS	(Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos ó <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>)
PBP	Proteínas de Unión a la Penicilina ó <i>Penicillin Binding Proteins</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ó <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	Reacción en cadena de la Polimerasa-polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción ó <i>Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment</i>

Length Polymorphism

PG	Peptidoglucano
pl	Punto isoeléctrico
PIP/TZ	Piperacilina/Tazobactam
PM/PML	Tira de Etest de Cefepima/Cefepima-Ácido Clavulánico
RNA	Ácido Ribonucleico
SENTRY	Programa de Vigilancia Antimicrobiana ó <i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SMART	Estudio de Monitoreo de las Tendencias de Seguimiento de Resistencia a los antimicrobianos ó <i>Study Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i>
SSA	Secretaria de Salud
SSF	Solución Salina Fisiológica
TMS	Trimetoprim/Sulfamemtoxazol
TZ/TZL	Tira de Etest de Ceftazidima/Ceftazidima -Ácido Clavulánico
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
UDP	Difosfato de Uridina
UTI	Unidad de Terapia Intensiva
UTIN	Unidad de Terapia Intensiva Neonatal
UTP	Trifosfato de Uracilo
UTIP	Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica
V_{máx}	Velocidad Máxima de Hidrolisis

Resumen Estructurado Del Protocolo

Prevalencia de cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Objetivo General: Determinar la prevalencia de las cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez de 2010 al 2011.

Introducción: La alta incidencia de las enfermedades infecciosas y el surgimiento de Enterobacterias resistentes a los antibióticos representan un problema epidemiológico para el sector salud, esto se debe a las elevadas tasas de resistencia a los antibióticos que se han presentado en los últimos años. Las cepas de enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) son un claro ejemplo de este fenómeno, debido a que son enzimas codificadas como mecanismo de resistencia. En el presente estudio se analizaron los resultados de los pacientes pediátricos que forman parte de una población de este hospital que se evaluaron por pruebas de laboratorio por posible infección con cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* productoras de BLEE, por lo cual se realizó un estudio retrospectivo de prevalencia con la finalidad de determinar ciertas características epidemiológicas y la presencia de resistencia a antibióticos betalactámicos, estos resultados permitirán instaurar medidas preventivas y de control de este tipo de infecciones para así brindar un mejor control y tratamiento al paciente, contribuyendo con alternativas terapéuticas al personal médico que labora en la presente institución de salud.

Metodología: -*Diseño del estudio:* estudio retrospectivo y prospectivo, observacional y transversal con seguimiento en un periodo de dos años, de Enero del 2010 a Diciembre del 2011. -*Descripción de la población:* Pacientes pediátricos de los diferentes servicios, de la comunidad intra y extra hospitalaria, en intervalos de edades de recién nacidos hasta 18 años y con un diagnóstico de ingreso previo. -*Descripción general:* realizar la tabulación de las frecuencias en base a la revisión de registros hospitalarios del laboratorio de bacteriología del HIMFG, conforme los criterios de inclusión exclusión y eliminación. -*Análisis Estadístico:* emplear estadística básica descriptiva a base de la

obtención de frecuencias absolutas y relativas, por medio de Excel 2007, para el análisis de información, además de un análisis de variables aleatorias continuas nominales a base de *Ji cuadrada*. Realizar análisis de los datos obtenidos del 2010 y 2011 desglosando las características generales de las variables de estudio (pacientes, sala, edad, muestra, área, microorganismo), así como el análisis de estas variables en cuanto a producción de BLEE por enterobacterias, y un análisis específico de salas o servicios que contaban con un porcentaje mayor del 50% de producción de BLEE. Efectuar posteriormente un análisis comparativo de las variables de estudio en cepas productoras de BLEE además de la comparación de prevalencias correspondiente a cada año de estudio.

Resultados esperados: De acuerdo a los reportes de prevalencia de producción de BLEE por cepas de enterobacterias, se espera observar cambios en la prevalencia, y en la producción de BLEE en relación a las variables estudiadas.

Marco teórico

a) Introducción

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas y el surgimiento de Enterobacterias resistentes a los antibióticos representan un problema para el sector salud, esto se debe básicamente a las elevadas tasas de resistencia a los antibióticos que han sido descritas para estos microorganismos en los últimos años. Las cepas productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) son un ejemplo de este fenómeno, debido a que al presentar resistencia las bacterias asociadas a la mayoría de las infecciones involucradas, se presentan diversas implicaciones clínicas y terapéuticas que traen consigo la disminución de la calidad de vida de los pacientes.

Las Betalactamasa de Espectro Extendido ó *Extended Spectrum Betalactamase* (BLEE ó ESBL de sus siglas en ingles) son enzimas producidas por diferentes microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente *E. coli* y *K. pneumoniae*. Las BLEE son biomoléculas capaces de inactivar por hidrolisis a las penicilinas, Cefalosporinas de amplio espectro (tercera y cuarta generación) y los monobactámicos, las bacterias antes mencionadas permanecen sensibles a los efectos bactericidas de cefamicinas y carbapenémicos. Además presentan diversos elementos cromosomales y extracromosomales, que aunado a la presencia de un elevado número de enzimas en continuo descubrimiento han contribuido a su éxito epidemiológico, el cual favorece el deterioro de la calidad de vida del paciente infectado y que afectan de una forma impactante a los servicios de salud.

Las combinaciones enzimas-microorganismos han sido determinadas en diferentes países y continentes, en base a una infinidad de investigaciones realizadas acerca de sus perfiles de sensibilidad, tendencia epidemiológica de las cepas e información de índole genético que ha permitido instaurar en diversos centros de salud, medidas que han ayudado al control de este tipo de infecciones a nivel comunitario y nosocomial. La alta incidencia de las enfermedades infecciosas causadas por enterobacterias productoras de BLEE, así como de cepas que poseen además de este mecanismo un alto grado de multirresistencia a los antibióticos, son elementos que constituyen uno de los mayores problemas de la medicina actual.

En México, en particular en el Hospital Infantil de México Federico Gómez se desconoce el impacto epidemiológico y económico que genera este tipo de infecciones a si como su diseminación hospitalaria y comunitaria, lo que es importante ya que se asocia a diversos factores como son el uso inadecuado de antibióticos, diferencias terapéuticas, y biológicamente, se relaciona con los elementos genéticos que poseen dichos microorganismos, que en conjunto constituyen la base de su éxito epidemiológico.

La prevalencia en la población pediátrica de este centro hospitalario es desconocida, ya que no se han generado reportes o registros de los brotes infecciosos o la frecuencia de estos microorganismos en las diferentes áreas del hospital, por lo que se desconoce la diseminación de este tipo de bacterias en el ambiente comunitario y nosocomial.

En el presente estudio se examina a los pacientes que forman parte de una población de este hospital y que son evaluados por pruebas de laboratorio por posible infección con cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* productoras de BLEE, así como la fracción o proporción de la población intra y extra hospitalaria, por lo cual se pretende realizar un estudio retrospectivo de prevalencia con la finalidad de determinar ciertas características epidemiológicas y de resistencia a antibióticos betalactámicos, que permitan instaurar medidas para el uso adecuado de antibióticos para el control de este tipo de infecciones y proporcionar un mejor tratamiento para el control al paciente, contribuyendo con el personal médico que labora en la presente institución de salud.

b) Antecedentes

1. Aspectos Generales

La intervención médica en una infección consiste en primer término en intentar la erradicación del agente patógeno mediante sustancias que inhiben su crecimiento, su proliferación o que promueven su eliminación con la finalidad de que el paciente recupere la salud. La función básica de quienes trabajan en el laboratorio de microbiología clínica es proporcionar información con la cual los médicos puedan diagnosticar y proporcionar el tratamiento más adecuado a las diferentes

enfermedades infecciosas no solo en base a las condiciones del paciente sino además basada en: 1) el agente infeccioso y en 2) cuál es el antibiótico óptimo (Koneman, 2008). Esto beneficia al paciente, ya que con dicha información puede ser tratado con una de la terapia antimicrobiana apropiada, mejorando el pronóstico de la enfermedad y por lo tanto su calidad de vida. En este sentido los microbiólogos evalúan las interacciones *in vitro* entre un microorganismo aislado y los antimicrobianos que serían apropiados para el tratamiento de una infección *in vivo*, estas pruebas proporcionan datos para decidir si las dosis seleccionadas de un antibiótico son suficientes (Koneman, 2008). Igualmente, ante una enfermedad infecciosa transmisible, con la identificación del patógeno específico, se proporciona información de suma importancia para el epidemiólogo de un hospital y el trabajador de salud pública.

El conjunto de sustancias naturales o sintéticas se denominan agentes antimicrobianos, y de acuerdo al tipo de microorganismo contra los que se dirigen, estas sustancias también se conocen como agentes antibacterianos, antimicóticos, antiparasitarios o antivirales. Los agentes antimicrobianos tienen un papel fundamental en el control y el manejo de las enfermedades infecciosas, por lo cual es importante conocer el modo de acción y los mecanismos que despliegan los microorganismos para eludir la actividad antimicrobiana (Koneman, 2008; Morfin, 1999).

Para que un agente antimicrobiano inhiba o elimine el microorganismo infectante deben cumplirse algunos pasos importantes, primero, el agente debe hallarse en forma activa, esto se asegura por medio de su diseño farmacodinámico, que tiene en cuenta la vía a través del cual el paciente recibirá el fármaco (por ejemplo vía oral, intramuscular, intravenosa); después el antibiótico debe alcanzar niveles o concentraciones suficientes en el sitio de la infección para que tenga la oportunidad de ejercer su efecto, es decir, este debe tener una apropiada proximidad anatómica con los microorganismos infectantes. La capacidad de alcanzar dichos niveles depende de las propiedades farmacocinéticas del agente, por consiguiente, el sitio o los sitios de infección son un aspecto importante a considerar debido a la cantidad de

antimicrobiano disponible y por consiguiente afectan la selección y su respectivo uso terapéutico (Forbes, 2004).

Un antibiótico es un agente antimicrobiano que se utiliza para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias. Las bacterias en general emplean enzimas, toxinas, elementos genéticos y diversas estructuras celulares que les permiten invadir, adherirse o colonizar, manteniéndose viables por la asimilación de nutrientes, logrando una perfecta adaptación que conlleva a su multiplicación y el establecimiento de una infección evitando la respuesta inmune del hospedero. Estos procesos incluyen la síntesis de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, así como la renovación y conservación de la integridad de la membrana citoplasmática y la síntesis de pared celular, por lo que estos sitios que se convierten en los blancos de los antibacterianos (Nester, 2007).

2. Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos que son ampliamente utilizados son los betalactámicos. Esta clase de fármacos comprende el grupo más grande de agentes antibacterianos y docenas de derivados están disponibles para el uso clínico. La popularidad de estos agentes se origina de su efecto y su baja toxicidad para los seres humanos, además porque sus estructuras moleculares pueden manipularse con mayor facilidad para lograr una mayor actividad con la finalidad de alcanzar aplicaciones terapéuticas más amplias (Forbes, 2004).

a) Clasificación general y estructura química

Los β -lactámicos son ácidos orgánicos relativamente fuertes, la mayoría son solubles en agua y se ionizan completamente en solución. Se clasifican en relación a su estructura nuclear común: el anillo betalactámico (Figura. No. 1). Las penicilinas están constituidas de un núcleo químico común, el ácido 6-aminopenicilánico, formado por la unión de un anillo β -lactámico tetragonal y uno pentagonal de tiazolidina; este núcleo contiene 3 carbonos asimétricos, y está unido por un enlace peptídico a una cadena lateral o radical, clasificándose según la presencia de diferentes cadenas laterales, y por formar sales con metales y bases orgánicas por ser un ácido carboxílico.

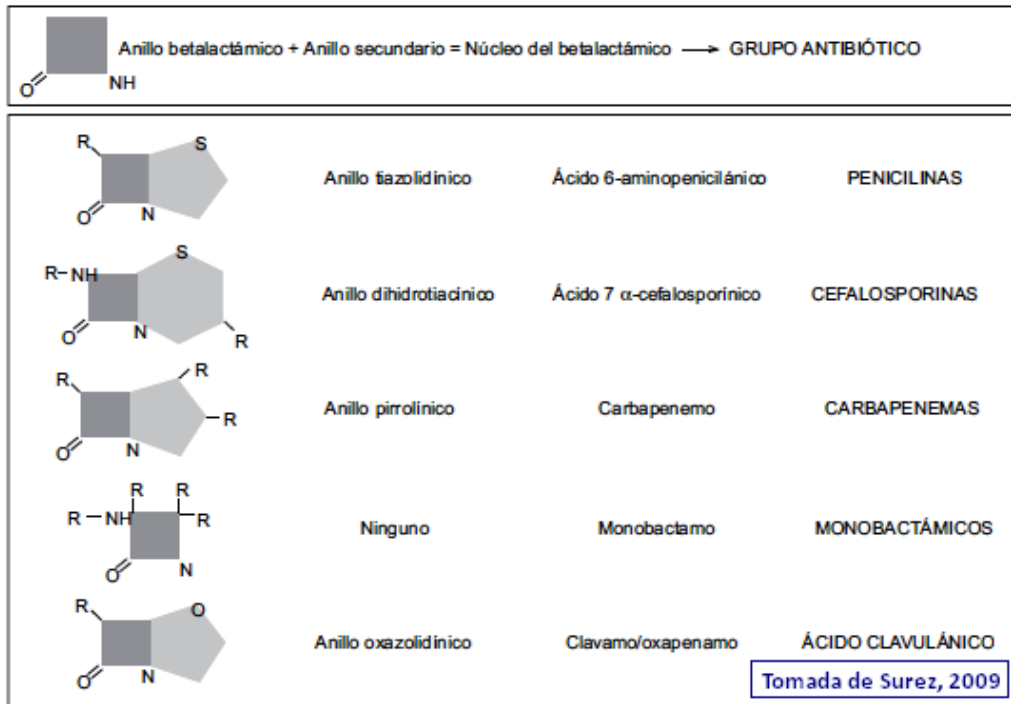
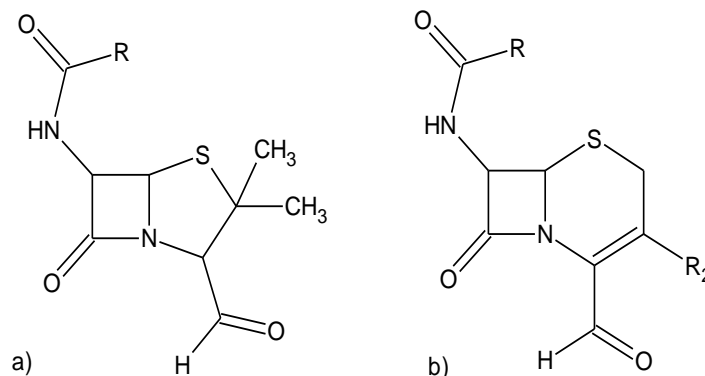


Figura 1.-Estructura química de los betalactámicos y su clasificación

El núcleo químico común para las cefalosporinas es el ácido cefalosporánico, cuyo sistema anular es semejante al del ácido penicilánico con la diferencia que en vez del anillo pentagonal de tiazolidina, posee uno hexagonal de dihidrotiazina, distinguiéndose distintas cefalosporinas por sus cadenas laterales. El propio núcleo es el elemento estructural fundamental de actividad biológica; la transformación metabólica o la alteración química de esta parte de la molécula hacen que se pierda toda acción bacteriana importante (Figura. No. 2) (Petri, Et al, 2007; Katzung, 2007; Perozo, Et al, 2009; Jehl, Et al, 2004).



Tomada de Litter, 1975

Figura 2.- Estructura a) ácido penicilánico y b) ácido cefalosporánico

b) Mecanismo de acción

La pared celular de las bacterias es un elemento protector de la integridad de las mismas ya que se comporta como una capa externa que rodea completamente a la membrana citoplasmática del microorganismo, proporcionando estabilidad gracias a su estructura entramada y rígida que previene la lisis por la alta presión osmótica interna, siendo por tanto esencial para proliferación, desarrollo y crecimiento bacteriano; además de esta estructura depende la pertenencia de las bacterias al grupo de bacterias Gram positivas o Gram negativas (Figura. No. 3).

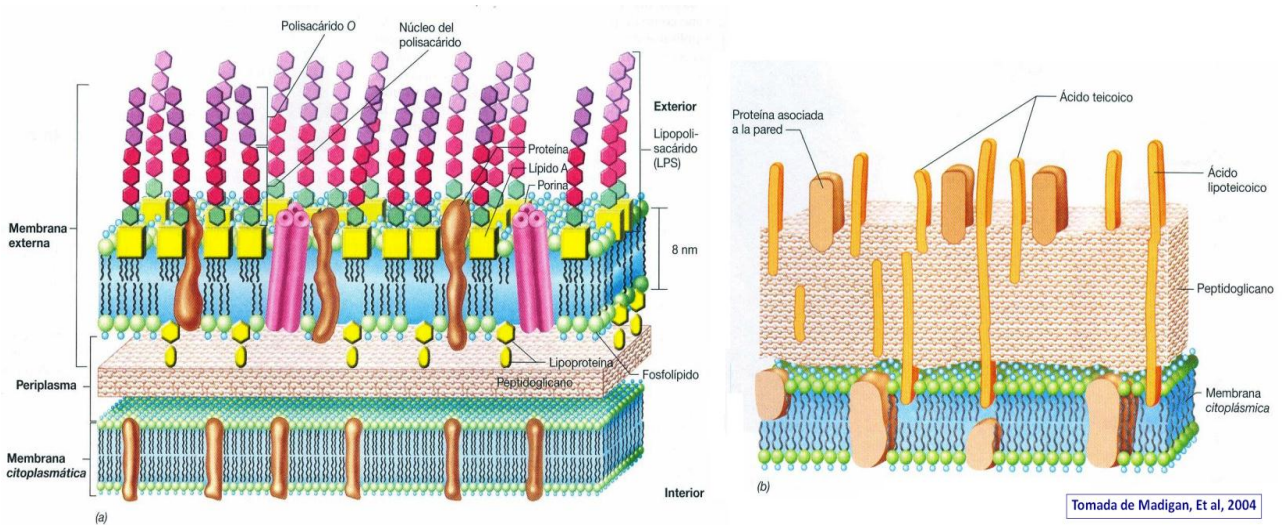


Figura 3.-Pared celular de las bacterias a) Gram negativa y b) Gram Positivas

La pared está compuesta de un heteropolímero: el peptidoglicano (PG) que en general es una estructura tridimensional de polisacáridos y polipéptidos (mureína y mucopéptido). El peptidoglicano es un polímero constituido por varias cadenas lineales, formadas a su vez por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que son aminoazúcares que se encuentran alternados (20 a 100 moléculas). Las cadenas polioídicas están unidas entre ellas por cadenas peptídicas cortas denominadas tetrapéptidos que están formados por una secuencia de D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala), los cuales están fijados en sus extremidades al ácido N-acetilmurámico de una cadena y a un tetrapéptido. El grado de resistencia de esta pared está en función de su empaquetamiento, que a su vez depende de la longitud de las cadenas, del número de tetrapeptidos, del número de uniones peptídicas y de los eventuales puentes de hidrógeno que se pueden formar en el peptidoglicano. Cabe mencionar que en

microorganismos Gram positivos, la pared tiene de 50 a 100 moléculas que establecen un espesor de 20 a 80 nm, a diferencia de las bacterias Gram negativas cuyo espesor es de sólo de 1 a 2 moléculas que establecen un espesor de 2.5 nm siendo por tanto más delgada, sin embargo la pared de estas bacterias contiene un elemento suplementario: la membrana externa, la cual rodea al peptidoglicano y ofrece ciertas ventajas a este tipo de microorganismos (Nester, 2007; Katzung, 2007). La biosíntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana es un proceso continuo y dinámico que incluye unas 30 enzimas bacterianas: transpeptidasas, carboxipeptidasas y glicosiltransferasas, que en conjunto son asociadas al término PBP (Proteínas de Unión a Penicilina), que representan las enzimas implicadas en la síntesis del peptidoglicano. Esta síntesis puede considerarse en tres etapas.

La primera es la etapa citoplásmica que es la formación del péptido precursor, este es un pentapéptido denominado difosfato de uridina (UDP)-acetilmuramil-pentapéptido. El cual se forma después de un cierto número de reacciones citoplásmicas que ponen en juego el UTP, la N-acetilglucosamina-P, el fosfoenolpiruvato, NADPH y la piruviltransferasa (que es la enzima que permite la fijación del fosfoenolpiruvato sobre la N-acetilglucosamina), finalizando en la formación inicial del ácido UDP-N-acetilmurámico, al cual se le añaden sucesivamente los diferentes aminoácidos, teniéndose al final de estas reacciones un dipéptido (D-alanil-D-alanina). La síntesis del dipéptido, que es a menudo el ácido mesodiaminopimelico (aminoácido dibásico), entraña la racemización previa de L-alanina y una condensación catalizada por la D-alanil-D-alanina sintetasa, la D-cicloserina, análogo estructural de la D-alanina, que actúa como inhibidor competitivo de la racemasa y sintetasa. Un transportador lipídico (fosfolípido C55) va a tomar a su cargo este pentapéptido precursor y le hará atravesar la membrana citoplásmica.

Las reacciones de la segunda fase que se desarrollan en la membrana citoplásmica, donde la pareja precursor-transportador, una molécula de N-acetilglucosamina se agrega al UDP-acetilmuramilpentapéptido para finalizar en la formación de un polímero largo disacárido-pentapeptido-transportador. En este estadio el transportador se separa.

La tercera etapa que se lleva a cabo en la parte más externa de la pared celular, incluye la unión del disacárido-pentapéptido al peptidoglicano en curso de formación y la terminación de los enlaces (entramado). Debe considerarse que este disacárido-pentapéptido puede o bien unirse a un fragmento idéntico en el exterior de la bacteria y dar como resultado entonces una elongación, o bien unirse a un fragmento idéntico en el interior de la bacteria y entonces formar un septo preparando así la división bacteriana, o bien unirse a un polímero pre existente y producir el engrosamiento de la pared.

La formación de los enlaces se da gracias a reacciones de transglicosilación y transpeptidación. En las primeras reacciones intervienen las glicosiltransferasas que son enzimas que aseguran la formación de cadenas de polisacáridos al unir los disacáridos-pentapéptidos entre ellos, creando una unión entre la N-acetilglucosamina de un disacárido-pentapéptido y el ácido N-acetil-murámico-pentapéptido de otro disacárido-pentapéptido. En las reacciones de transpeptidación intervienen las transpeptidasas, que son enzimas que unen las diferentes cadenas de polisacáridos entre ellas quitando el residuo terminal de D-alanina-D-alanina del disacárido-pentapéptido de una cadena de polisacárido y uniendo la D-Ala (en 4) al aminoácido de un disacárido-pentapéptido de otra cadena de polisacárido, formándose puentes peptídicos entre filamentos adyacentes de glucano. Existen varios tipos de transpeptidasas que tienen actividad carboxipeptidasas, las cuales también participan en la síntesis ya que son enzimas que quitan un resto de D-Ala de los dipéptidos D-Ala-D-Ala terminales impidiendo las transpeptidaciones posteriores por lo que tienen un papel en la regulación de la síntesis de peptidoglicano. Al mismo tiempo, en la síntesis de la pared celular, el peptidoglicano más viejo superpuesto a las estructuras recién sintetizadas se elimina continuamente mediante unas enzimas líticas o autolisinas, que son principalmente las glicosidasas, activas sobre los filamentos de glicanos (se distinguen las glucosaminidasas y las muramididasas), y las mureína hidrolasas que llevan a cabo el rompimiento de los enlaces covalentes por hidrólisis autolítica del peptidoglicano existente para permitir la inserción de nuevo, dando paso a la nueva pared celular recién sintetizada (Figura. No. 4) (Petri, Et al, 2007; Katzung, 2007; Camacho, 2004; Garza, 2010; Jehl, Et al, 2004).

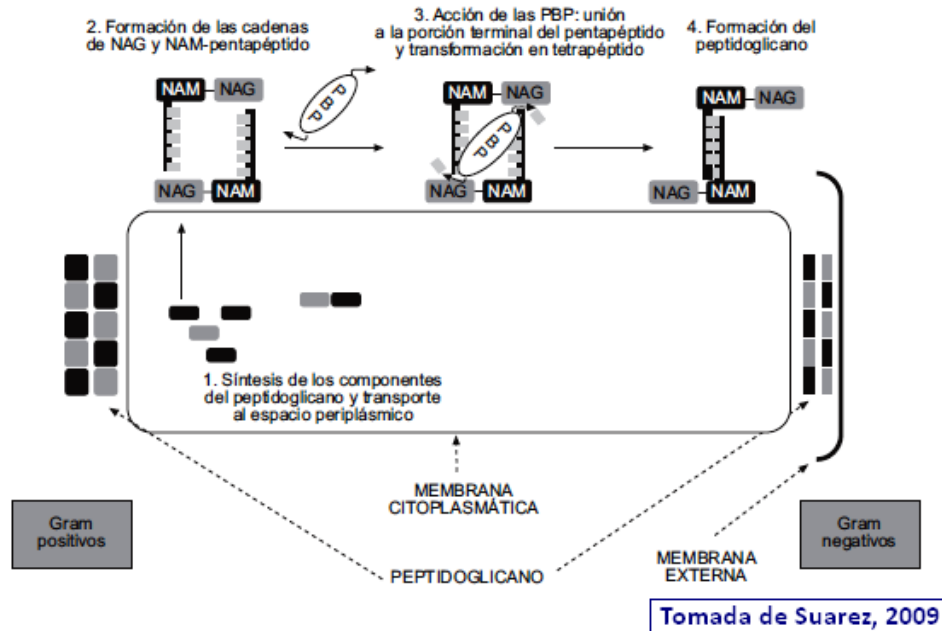


Figura 4.-Etapas de formación de la pared celular

Es en la última etapa de la síntesis de peptidoglicano la que se inhibe por los antibióticos betalactámicos como las Penicilinas y las Cefalosporinas, ya que estos antimicrobianos son análogos estructurales del sustrato natural de D-Ala-D-Ala, y se unen covalentemente a las PBP (en el sitio activo de estas enzimas), lo cual inhibe la reacción de transpeptidación teniendo como consecuencia el bloqueo de la síntesis de peptidoglicano y la lisis celular como resultado de la hidrólisis autolítica normal del peptidoglicano, proceso que continúa tras la acción del betalactámico, causando el adelgazamiento de la pared que finalmente deriva en inestabilidad osmótica. En el caso de la Penicilina, los modelos estereoscópicos indican que su conformación es muy semejante a la de la D-alanil-D-alanina por lo que la transpeptidasa es acilada por este antibiótico, es decir, se forma la enzima peniciloil que involucra la rotura de la ligadura -CO-N- del anillo betalactámico (Koneman, 2008; Nester, 2007; Granados, Et al, 1997). Es por esta razón que estos antibióticos son bactericidas ya que su efecto se basa en poner en juego a otros grupos de enzimas que están implicadas en la degradación (recombinación del peptidoglicano) (Figura. No. 5) (Jehl, Et al, 2004). Las paredes celulares bacterianas son únicas por contener peptidoglicano, debido a esto, los antibióticos que interfieren sólo con este componente de la pared celular no afectan las células eucarióticas, resultando por lo general, en un índice terapéutico alto. Además, debido a que las paredes celulares sólo se sintetizan en células en multiplicación activa, los betalactámicos sólo son efectivos contra las bacterias en crecimiento (Nester, 2007).

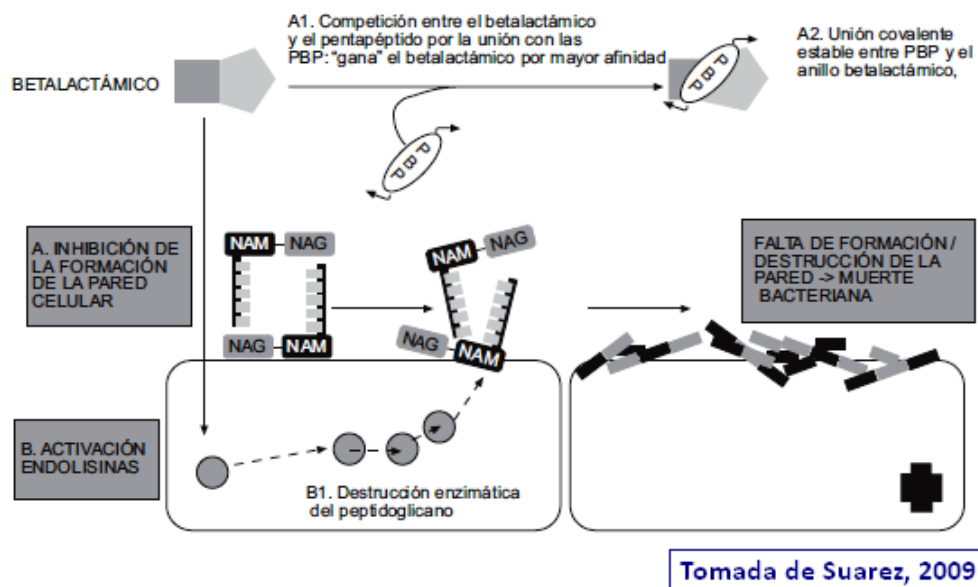


Figura 5.-Mecanismo de acción de los betalactámicos

Los distintos miembros del grupo de betalactámicos tienen afinidades diferentes por las PBP y su eficacia contra las bacterias está determinada, en parte por su grado de unión a estas enzimas, ya que cada betalactámico tiene una afinidad máxima para una PBP concreta además, las PBP de las bacterias Gram positivas difieren significativamente de las Gram negativas y las PBP de las bacterias anaerobias difieren de las de las aerobias, presentándose estas diferencias de afinidad en bacterias relacionadas como los cocos Gram positivos (Koneman, 2008 Jehl, Et al, 2004). Igualmente, los diferentes betalactámicos varían en su espectro de actividad, algunos son más activos contra bacterias Gram positivas, mientras otros son más activos contra bacterias Gram negativas. Una razón para esta diferencia surge de la arquitectura de la pared celular: la capa de peptidoglicano de las bacterias Gram positivas contacta directamente con el ambiente exterior, por lo que las enzimas que sintetizan el peptidoglicano están más disponibles al fármaco, en cambio, la membrana externa que se encuentra antes de la pared de las bacterias Gram negativas conforma una barrera exterior que impide el acceso del fármaco lo que las hace resistentes a muchos betalactámicos (Nester, 2007).

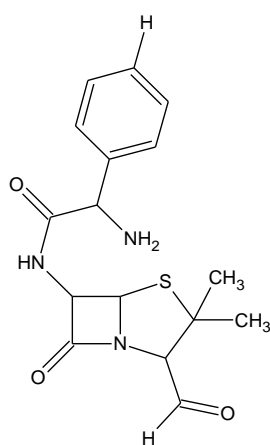
c) *Penicilina*

En 1928 fue Fleming quien estudiando las variantes de *Staphylococcus aureus* en el laboratorio, observó que un hongo contaminante de sus cultivos, producía lisis bacteriana a su alrededor; el hongo contenía una acción inhibitoria notable para muchos microorganismos; como el hongo pertenecía al género *Penicillium* sp., Fleming llamó Penicilina a la sustancia antibacteriana encontrada.

Las Penicilinas constituyen uno de los grupos de antibióticos betalactámicos de mayor importancia, considerándose uno de los primeros antibióticos y aunque han surgido nuevos, sigue siendo uno de los más importantes y de mayor uso, del cual se han sintetizado nuevos derivados (Petri, Et al, 2007; Abarca, 2001).

-Clasificación

- i. Espectro moderado: Penicilina, Penicilina G, Oxacilina, Meticilina, Dicloxacilina
- ii. Espectro amplio: Amoxicilina, Ampicilina (Figura. No. 6).
- iii. Espectro extendido: Carbenicilina, Ticarcilina, Peperacilina.



Tomada de Katzung, 2007

Figura 6.- Estructura química de la Ampicilina

d) Cefalosporinas

Una vez introducida al ambiente clínico, pasaron pocos años para identificar la proliferación de bacterias resistentes a Penicilina en el ambiente hospitalario. En diez años se convirtieron las infecciones causadas por bacterias resistentes a Penicilina en una pandemia. Debido a esto la ciencia tuvo que desarrollar antibióticos de amplio espectro y se dio el desarrollo de las Cefalosporinas, las cuales fueron aisladas inicialmente a partir de hongo *Cephalosporium*.

Esta clase de antibióticos en poco tiempo fueron introducidos en el ambiente clínico, perteneciendo como línea de defensa contra la mayoría de bacterias causantes de infecciones por más de 20 años. Presentan el mismo mecanismo de acción que las Penicilinas, pero poseen un espectro antibacteriano más amplio puesto que cuentan

con una actividad frente a bacterias Gram negativas mayor que las Penicilinas, son resistentes a muchas betalactamasas y están dotados de unas propiedades farmacocinéticas superiores (como una semivida más prolongada) (Murray, Et al, 2006). Además las modificaciones en las cadenas laterales modifican la penetración a través de las porinas promoviendo a su vez la gran variabilidad en sus propiedades tanto antibacterianas como farmacocinéticas (Garza, 2010).

-Clasificación

La cantidad de Cefalosporinas exige un sistema de clasificación con base en su estructura química, características clínico-farmacológicas, resistencia a betalactamasas o espectro antimicrobiano; el sistema más aceptado es este ya que conforma dichas características por “generaciones”.

i. Primera generación

Ejemplificadas por Cefalotina, Cefalexina y Cefazolina (Figura. No. 7). Incluyen vías de administración oral e intravenosa y son consideradas de estrecho espectro de actividad, actuando satisfactoriamente contra bacterias Gram positivas y relativamente moderada contra las Gram negativas. Casi todos los cocos Gram positivos (con excepción de los Enterococos, *Staphylococcus aureus* MRSA y *S. epidermidis*) y bacterias anaerobias de la cavidad bucal son sensibles, a excepción de *Bacteroides fragilis*. La actividad contra *Moraxella catarrhalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* es satisfactoria.

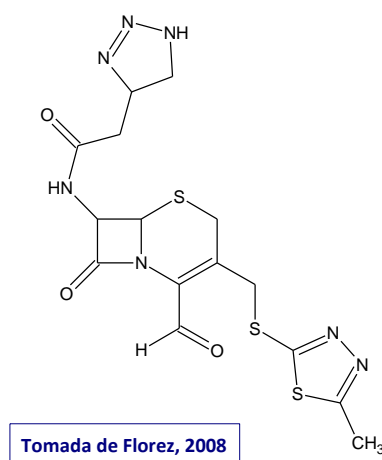


Figura 7.- Estructura de Cefazolina, Cefalosporina de primera generación.

ii. Segunda generación

Son menos efectivas contra bacterias Gram positivas pero tienen un más amplio espectro contra bacterias Gram negativas como *B. fragilis* y *Haemophilus influenzae*. Entre los fármacos más conocidos se encuentran Cefoxitina (Figura. No. 8), Cefamandol, Cefotetan, Cefaclor, Cefuroxima, y Cefmetazol, que incluyen vías de administración que van de la intravenosa a oral.

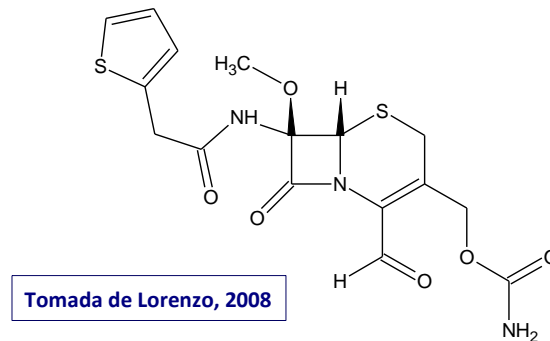


Figura 8.- Estructura de Cefoxitina, Cefalosporina de segunda generación.

iii. Tercera generación

Casi siempre son menos activas que los medicamentos de la primera generación contra Gram positivos, pero son más activos contra las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. El incremento de actividad contra bacterias Gram negativas se al mejorar su penetración, su incremento en la afinidad contra las PBP y la disminución en la eficiencia catalítica de las betalactamasas. Ejemplo de estas Cefalosporinas son Cefotaxima, Ceftriaxona (Figura. No. 9), Cefpodoxima, Ceftazidima (Figura. No. 10) y Cefoperazona, esta última activa contra *Pseudomonas aeruginosa*.

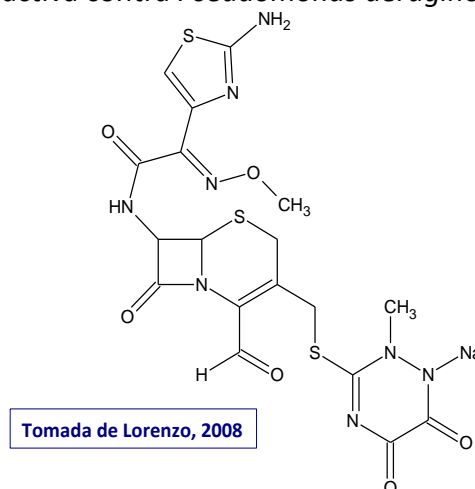


Figura 9.- Estructura química de Ceftriaxona, Cefalosporina de tercera generación.

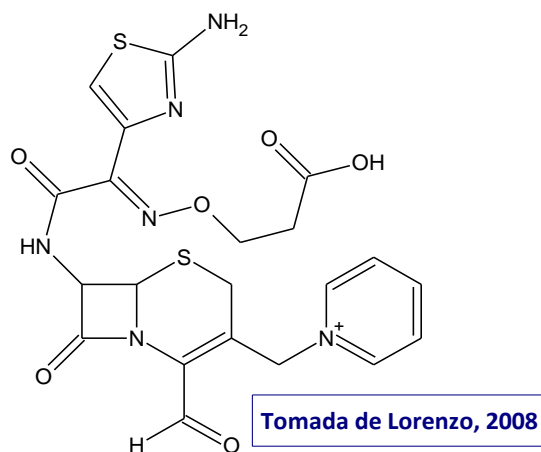


Figura 10.- Estructura química de Ceftazidima, Cefalosporina de tercera generación.

iv. Cuarta generación

Tienen propiedades semejantes a las Cefalosporinas de primera generación pero presentan un espectro de actividad amplio en comparación con las de la tercera generación y una mayor estabilidad a la hidrólisis por betalactamasas mediadas por plásmidos o cromosomas, además de tener una buena penetración a través de las porinas y afinidad a las PBP.

Son de particular utilidad para el tratamiento empírico de las infecciones graves de los pacientes hospitalizados cuando una causa posible es la infección por microorganismos Gram positivos, *Pseudomonas* ó bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Ejemplos de estos fármacos son Cefepima (Figura. No. 11) y Cefpiroma (Petri, Et al, 2007; Garza, 2010).

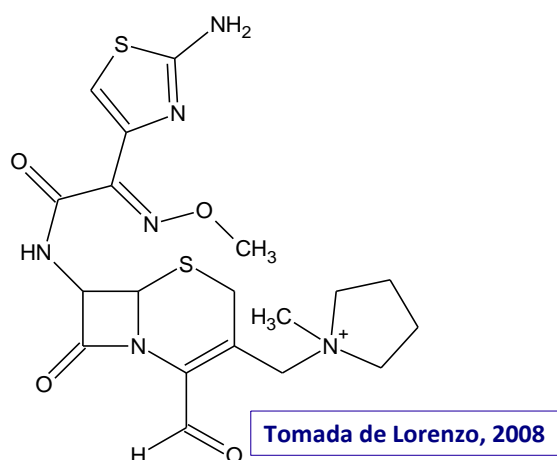


Figura 11.- Estructura química de Cefepima, una Cefalosporina de cuarta generación.

e) Otros betalactámicos

i. Carbapenémicos o Carbapenems

Son betalactámicos que contienen un anillo betalactámico fusionado y un sistema de anillos de 5 miembros que difiere de las penicilinas por que contienen un átomo de carbono en lugar del de azufre. Poseen un espectro de actividad más amplio que todos los otros antibióticos betalactámicos. Ejemplos son Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Feropenem y Doripenem. Imipenem y Meropenem, que fueron aprobados para uso clínico con la característica de una dosis diaria. Son solubles al agua, tienen baja biodisponibilidad oral y son utilizados en el ambiente hospitalario contra bacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Son hidrolizados por las betalactamasas de clase A que generalmente hidrolizan tanto penicilinas y cefalosporinas, y por metalo- β -lactamasas, así como por la betalactamasas (Figura. No. 12) (Garza, 2010; Koneman, 2008).

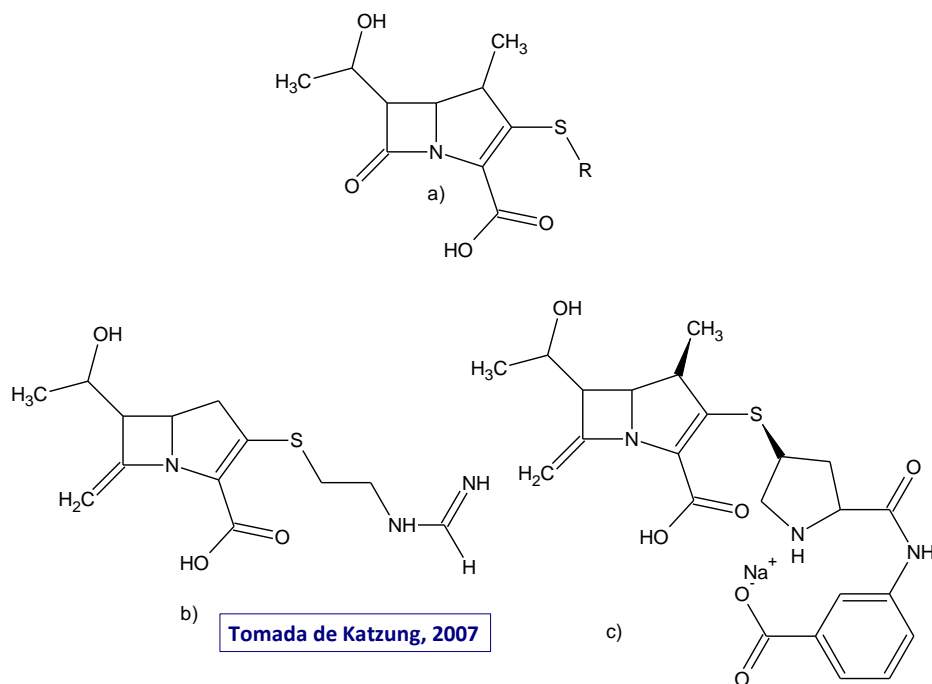


Figura 12.- Estructura de Carbapenémicos: a) Ácido 3-hidroxiethylcarbapenémico, b) Imipenem y c) Ertapenem

ii. Inhibidores de Betalactamasas

Son compuestos que se asemejan a los antibióticos betalactámicos lo suficientemente bien como para poder unirse a las betalactamasas ya sea en forma reversible o irreversible, lo que protege al antibiótico de la destrucción incapacitando su respectiva

hidrólisis y permitiendo la actividad del mismo. Poseen actividad limitada contra las PBP por lo que no son considerados como antibióticos, sin embargo son fármacos activos contra enzimas codificadas en el plásmido (incluso las enzimas que hidrolizan a la Ceftazidima y Cefotaxima), pero son inactivas a la concentración clínica habitual contra las betalactamasas cromosómicas de tipo I inducidas en los bacilos Gram negativos (como los géneros *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Citrobacter*) por el tratamiento con cefalosporinas de segunda y tercera generación (Forbes, 2004).

Los tres inhibidores de la actividad de betalactamasas que han hallado un lugar en la medicina clínica son el Ácido Clavulánico, el Sulbactam y el Tazobactam, que son eficaces contra la penicilinas estafilocócica y tienen una eficacia variable contra las enzimas cromosómicas de las bacterias Gram negativas (Koneman, 2008). Los ejemplos de combinaciones de betalactámico/inhibidor son: Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ácido Clavulánico y la Piperacilina/Tazobactam (Figura. No. 13). El Clavulanato y el Tazobactam son superiores al Sulbactam en la actividad contra las betalactamasa mediadas por plásmidos de los microorganismos Gram negativos que incluyen las betalactamasas de espectro extendido. No existe ninguna diferencia importante entre las actividades inhibitoras del Clavulanato y el Tazobactam, aunque el espectro de su actividad es diferente. Algunas enzimas de espectro extendido son resistentes a la actividad de los tres compuestos (Forbes, 2004).

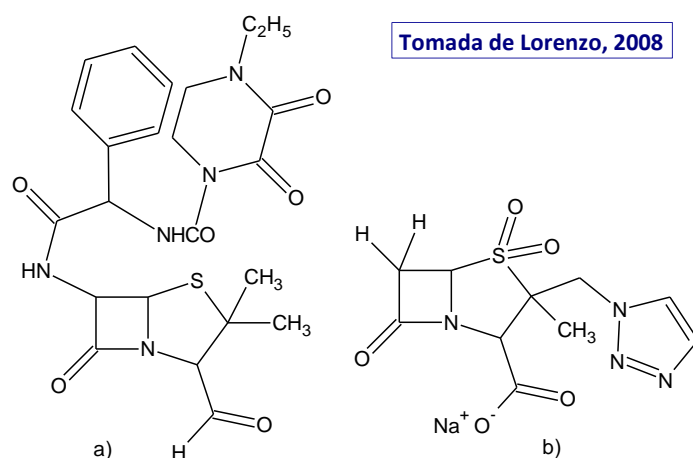


Figura 13.- Estructura del betalactámico a) Piperacilina e Inhibidor de betalactamasa b) Tazobactam

El ácido clavulánico es producido por *Streptomyces clavuligerus* y tiene poca actividad antimicrobiana intrínseca, pero es un inhibidor (ligador irreversible) de las

betalactamasas producidas por diversos microorganismos tanto Gram negativos como Gram positivos (Petri, Et al, 2007; Koneman, 2008).

iii. *Monobactámicos*

Este grupo es representado por el Aztreonam, y presentan la misma cadena lateral acil que la Ceftazidima, mientras el Aztreonam tiene N-sulfonato en la otra posición (Figura. No. 14), además de que están constituidos de un solo anillo betalactámico. El aztreonam es un fármaco activo contra activo frente a bacterias Gram negativas aeróbicas, como las enterobacterias y especies del genero *Yersinia*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* y *Neisseria* (Katzung, 2007).

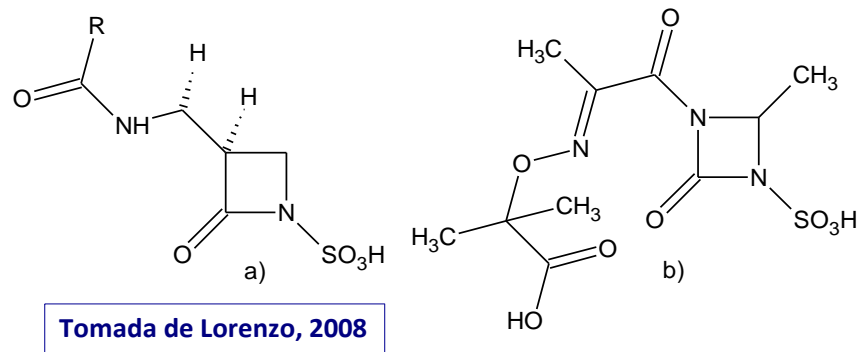


Figura 14.- Estructura del a) Ácido 3-amino-4-metilmonobactámico y de b) Aztreonam

3. Resistencia a antibióticos

Por lo anterior se cuenta con una diversidad de antimicrobianos y los microorganismos tienen sus propios recursos para evitar los efectos de estos fármacos. La resistencia a los antibióticos se debe a mecanismos como la degradación o la modificación del antimicrobiano, el cambio del sitio blanco, la eliminación del antibiótico por la presencia de bombas de reflujo o el impedimento de la entrada del antibiótico a la célula bacteriana por la alteración de porinas, entre otros.

La capacidad de resistencia a los antibióticos que presentan los microorganismos puede ser una característica intrínseca (natural), o adquirida como la que resulta del uso de antibióticos. La resistencia natural de una especie o género es una característica propia del conjunto de cepas que pertenecen a esta especie o género con independencia de las condiciones de aislamiento. Es siempre transmisible a la descendencia (transmisión vertical) por su naturaleza cromosómica. La resistencia

natural determina los fenotipos “salvaje” de las especies bacterianas frente a los antibióticos. La resistencia adquirida concierne tan sólo a una proporción más o menos importante y variable en el tiempo de aislados de una misma especie o de un género; existe gracias a la adquisición de uno (o varios) mecanismos de resistencia que determinan un fenotipo bien preciso de resistencia, diferente del fenotipo salvaje que presentan las cepas que no han adquirido este mecanismo. Estos últimos mecanismos se conocen mejor que los de la resistencia natural. La resistencia adquirida, frecuentemente mediada por determinantes genéticos, forma parte de un elemento genético móvil, que se transmite horizontalmente, a veces entre especies diferentes. La transmisión vertical es igualmente posible, pero es a veces aleatoria en ausencia de una presión de selección por el antibiótico, permitiendo su estabilización (Jehl, Et al, 2004). Las bacterias desarrollan variados mecanismos para sobrevivir en presencia de un antibiótico debido a la mutación en alelos resistentes de genes nativos y a la facilidad que tienen para intercambiar información, intra e interespecie, utilizando para ello elementos como los plásmidos, transposones o integrones capaces de movilizar genes de resistencia (Celis, Et al, 2009).

En algunos casos, ciertos tipos de bacterias son resistentes a los efectos de un antibiótico en particular (Nester, 2007). Estas alteraciones o mecanismos de resistencia pueden aparecer de diversas maneras, pero el resultado final es la pérdida parcial o completa de la eficacia antibiótica (Forbes, 2004). La resistencia adquirida a los antibióticos se explica por tres mecanismos diferentes:

a) Transporte de antibióticos a través de la pared y las membranas celulares

Para comprender el transporte de moléculas hacia el sitio activo es necesario considerar las diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. Las bacterias Gram positivas, como se mencionó anteriormente tienen una única membrana celular con una capa externa grande de peptidoglicano. Para los antibióticos glucopéptidos y betalactámicos que probablemente no tienen que atravesar la membrana plasmática para ejercer su actividad antibiótica, el transporte a través de las membranas de las bacterias Gram positivas no constituye un problema. Las bacterias Gram negativas, como se mencionó anteriormente, tienen una

membrana plasmática interna y una membrana celular externa, entre la cual hay una capa delgada de peptidoglicano. La permeabilidad de las membranas a los antibióticos y el transporte de las moléculas a través de las barreras son muy importantes para las bacterias Gram negativas, que como se sabe tienen dos membranas que obstaculizan la llegada de los antibióticos a sus dianas intracelulares, considerándose la membrana celular externa como una barrera fundamental para todos los antibióticos; además algunos de estos microorganismos cuentan con un espacio periplásmico que puede contar con otros mecanismos adicionales (por ejemplo betalactamasas). El método más sencillo para el ingreso de los fármacos en las bacterias Gram negativas es la difusión directa a través de la membrana lipídica, pero incluso las sustancias muy hidrófobas no atraviesan la bicapa lipídica con eficacia. La razón para este bloqueo de la difusión es en parte la naturaleza polarizada y asimétrica de la membrana celular externa bacteriana, que tiene lipopolisacáridos con el lípido A y un oligosacárido unido a la cara externa de la membrana, los cuales pueden sufrir ciertas mutaciones que disminuyen la accesibilidad de los antibióticos a las porinas sobre el exterior de la membrana externa. Para muchos antibióticos, incluido el grupo betalactámico, el medio primario de transporte de la membrana externa de las bacterias entéricas es un grupo notable de proteínas de membrana denominadas porinas, que son proteínas de membrana que tienen la facultad de reagruparse para formar canales (poros) llenos de agua que permiten la difusión a través de la membrana de diferentes solutos hidrófilos (Koneman, 2008; Jehl, Et al, 2004).

Por lo tanto un mecanismo de resistencia a los antibióticos puede atribuirse a la disminución de la permeabilidad del antibiótico por alteración de porinas presentes en la membrana celular de la bacteria, las cuales se obturan parcial o totalmente o incluso desaparecen (Perozo, Et al, 2009). Factores como la carga de la molécula y la hidrofobicidad del compuesto desempeñan un papel importante ya que las moléculas con carga negativa se mueven más lentamente a través de la membrana que las moléculas con carga más positiva o que los iones dipolares. Se presume que las cargas negativas hacen que el antibiótico “se cuelgue” cuando atraviesa la porina de carga negativa. La exclusión de los compuestos hidrófobos del medioambiente acuoso de la porina puede explicar la falta de eficacia del compuesto hidrófobo Meticilina contra las

bacterias Gram negativas. Asimismo, los betalactámicos con cadenas laterales grandes y voluminosas atraviesan poco la membrana. Los antibióticos distintos de los betalactámicos también pueden depender de los canales de porina para el acceso a las células (Koneman, 2008).

En algunas bacterias, un importante mecanismo de resistencia es la extracción activa de los antibióticos desde la célula bacteriana, de modo que las concentraciones intracelulares de éstos nunca alcanzan un nivel suficientemente alto como para ejercer una actividad antibiótica eficaz. Esta resistencia también como sistema de expulsión que está constituido por proteínas particulares que juegan el papel de bomba de expulsión, que utilizando una fuerza protón-motriz expulsa el antibiótico cuando aparece en la célula bacteriana. Los mecanismos de transporte activo son teleológicamente útiles para eliminar distintas sustancias potencialmente tóxicas de las cuales es posible que los antibióticos incluso no sean los principales. El mecanismo de salida dependiente de energía es una defensa importante contra las Tetraciclinas, los Macrólidos, Fluoroquinolonas y el Cloranfenicol (Jehl, Et al, 2004).

b) Modificación de las enzimas diana: proteínas de unión y resistencia a los antibióticos

La modificación de los sitios blanco también tiene un papel clínicamente importante en la resistencia a betalactámicos, y puede llegar incluso hasta la ausencia de la diana. En términos de resistencia adquirida, se puede observar una modificación parcial de la naturaleza de la diana, una modificación de número (hiperproducción), un cambio total (nueva diana) y a veces, una asociación de varios de estos mecanismos.

La modificación total de la naturaleza de las dianas de los betalactámicos, esta relacionada directamente con el hecho de que los microorganismos cambian o adquieren de otros, los genes que codifican enzimas modificadas para la síntesis de la pared celular (PBP). Estas “nuevas” PBP conservan su función incluso en presencia de un antibiótico betalactámico, porque el antibiótico no tiene afinidad suficiente por la PBP modificada, es decir, ya no tiene acceso a la cadena de peptidoglicano en crecimiento. Las alteraciones en las PBP son más importantes para la resistencia de las bacterias Gram positivas a los betalactámicos que para las bacterias Gram negativas

entéricas y las especies de *Pseudomonas*, sin embargo los cambios en las PBP tienen efectos considerables sobre algunas bacterias Gram negativas; además de que la pérdida de la proteína variante conduce al restablecimiento de la sensibilidad o incluso a un estado de hipersensibilidad (Forbes, 2004; Koneman, 2008). Asimismo la modificación de las dianas del antibiótico puede deberse a mutaciones, como la resistencia adquirida a las Fluoroquinolonas por modificación de la DNA girasa o de la topoisomerasa IV, ó como la resistencia de las micobacterias a la Estreptomicina, a la Rifampicina y a los Macrólidos por la modificación del ribosoma o de la RNA polimerasa.

c) Inactivación del antibiótico

Es el mecanismo más frecuente en la patología infecciosa. Puede tratarse de una destrucción del antibiótico, como la hidrólisis de los betalactámicos por las betalactamasa o de una modificación de la molécula añadiendo radicales tales como esterificaciones de los aminoglucósidos-fosfotransferasas, -nucleotidiltransferasas y las -acetiltransferasas (Jehl, Et al, 2004; Koneman, 2008).

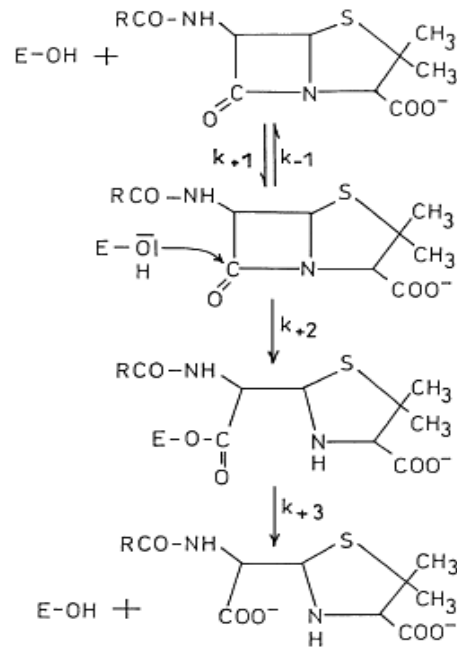
4. β -lactamasas

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 algunas enzimas que hidrolizaban el anillo betalactámico. Como se mencionó anteriormente la resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos puede estar mediada por la destrucción enzimática de los antibióticos, modificación de sus blancos o disminución de la captación intracelular del fármaco. Las tres vías tienen un papel importante en la resistencia a antibacterianos, pero la destrucción bacteriana de los betalactámicos por producción de betalactamasas es el método más frecuente de resistencia bioquímica. (Forbes, 2004; Camacho, 2004).

a) Características generales

Las betalactamasas son proteínas ó enzimas catalíticas con estructura cuaternaria de hoja β , que reconocen a los antibióticos betalactámicos y son capaces de hidrolizarlos

irreversiblemente eliminando a su vez la actividad antibacterial por la consecuente desactivación de la estructura química de la molécula.



Tomada de Matgne, 1998

Figura 15.- Reacción de hidrólisis de los anillos betalactámicos por la enzima betalactamasa

Un mayor número de betalactamasas operan a través del mecanismo de éster de serina y se muestra en la (Figura. No. 15), el cual está compuesto por reacciones de acilación-desacilación, con la conversión de la betalactamasa a una acil-enzima. La acción de las serina-betalactamasas comienza con la unión covalente de la enzima con el antibiótico para producir el complejo no covalente. Posteriormente el anillo betalactámico 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 la enzima, el cual ataca al carboxilo rompiendo a su vez el enlace amida involucrado, produciendo un éster de acil covalente. La hidrólisis del éster finalmente culmina con el proceso dándose la liberación de la enzima en forma activa, quedando el antibiótico biológicamente inactivo debido a la ruptura irreversible del enlace amida del anillo betalactámico, lo que a su vez impide su unión eficaz a las PBP de modo que la síntesis de la pared celular puede continuar (Matagne, Et al, 1998; Livermore, 1995; Camacho, 2004; Garciadiego, 2011). Su producción está controlada por un gen, cromosómico o transferido por elementos extracromosomales como plásmidos, transposones ó integrones (Perozo, 2009; Pino, Et al, 2007; Camacho, Et al, 2004).

b) Microorganismos productores de betalactamasas

La importancia de estas enzimas no solo radica en que cualquier antibiótico o grupo de antibióticos betalactámicos puede ser inactivado, sino que además su diversidad excede 340 tipos diferentes de enzimas, incremento intenso que no muestra ningún signo de aminorarse, esto a su vez tiene profundas implicaciones en el manejo clínico de las enfermedades infecciosas. La especificidad de una betalactamasa por un betalactámico es un elemento importante a considerar con relación a esto ya que una mutación puntual en uno o más aminoácidos puede generar no solo un incremento en dicha diversidad, sino que además puede modificar la especificidad de la molécula, sobre todo si se presenta en un área estructuralmente crítica de la enzima (Koneman, 2008). Es debido a esto que las betalactamasas han evolucionado a lo largo del tiempo por lo que en la actualidad se encuentran en un gran número de microorganismos de diferentes géneros y especies (Perozo, 2009).

A pesar de que hay un mecanismo básico para la actividad de las betalactamasas, hay diferencias bien marcadas, por ejemplo, las betalactamasas producidas por las bacterias Gram positivas, se excretan en el medio inmediato, donde tiene lugar la hidrólisis de los betalactámicos antes de que el fármaco pueda unirse a las PBP presentes en la membrana celular. En contraste, las betalactamasas producidas por las bacterias Gram negativas permanecen dentro de la célula, en el espacio periplásmico, donde están ubicadas de manera estratégica para hidrolizar los betalactámicos cuando atraviesan la membrana externa a través de los canales de porinas. Las betalactamasas también varían en el espectro de sus sustratos, es decir, no todos los betalactámicos son sensibles a la hidrólisis por betalactamasas. Por ejemplo, la betalactamasa estafilocócica puede hidrolizar con facilidad la Penicilina y derivados de la Penicilina, como Ampicilina, Mezlocilina y Piperacilina, pero no puede hidrolizar con eficacia muchas Cefalosporinas o el Imipenem (Forbes, 2004). Estas enzimas han sido ahora demostradas en muchas especies más que incluyen los géneros de *Enterobacter*, *Serratia* y *Proteus* (Koneman, 2008).

Igualmente los miembros del género *Staphylococcus* son las bacterias Gram positivas que producen betalactamasas con mayor frecuencia; alrededor del 90% o más de los

aislamientos es resistente a la Penicilina como resultado de la producción de este tipo de enzimas. Unos pocos aislamientos de *Enterococcus* también producen betalactamasas (Forbes, 2004). En contrario las bacterias Gram negativas, incluidas las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, además de *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae* y otros géneros de bacterias no fermentadores, producen docenas de diferentes tipos de betalactamasas que median la resistencia a uno o más de los antibióticos (Koneman, 2008).

En la actualidad está claro que las betalactamasas y las PBP tienen un origen evolutivo común aunque distante, puesto que se han encontrado secuencias similares de aminoácidos en PBP de alto y de bajo peso molecular y algunos tipos de betalactamasa, además se han observado similitudes en la estructura tridimensional. Cabe señalar que algunas PBP pueden funcionar como una betalactamasa ya que posee actividad transpeptidasa, y por lo tanto lleva a cabo la escisión de un enlace amino es por un mecanismo acil-enzimático (Abarca, 2001; Sánchez, 2008). Es debido a esto que existen casos documentados de betalactamasas que aparecieron antes de la introducción local los betalactámicos, como es el caso reportado por los científicos que desarrollaron la Penicilina que demostraron presencia de Penicilinasas en una cepa antes de la introducción del uso clínico de este tipo de antibiótico. De la misma forma se han presentado pruebas que apoyan el concepto de que el papel fisiológico de las betalactamasas en su forma natural el cual consiste en reestructurar el peptidoglucano durante el crecimiento de las bacterias y otros microorganismos que contienen a este polímero como son los algunos miembros de la familia de *Enterobacteriaceae* los cuales poseen betalactamasas cromosómicas naturales, probablemente derivadas de las propias PBP con las que tienen analogía secuencial y estructural (Seral, 2010; Álvarez, 2010; Koneman, 2008).

c) Clasificación

Se han diseñado distintos esquemas de clasificación, un primer esquema que resultó útil hace algunos años fue el provisto por Richmond y Sykes en 1973, basado en perfiles de hidrólisis, susceptibilidad a inhibidores y si estas enzimas se encontraban codificadas en el cromosoma bacteriano o en plásmidos; pero la cantidad y la variedad

de enzimas que surgieron posteriormente rebasaron los límites de este esquema, por lo que surgió una clasificación en 1980 propuesta por Ambler que incluye, sólo enzimas que han sido caracterizadas en base a su estructura molecular y secuencia de aminoácidos, generando solo cuatro clases A, B, C, y D. En 1995, se estableció una clasificación de las betalactamasas en base al esquema de Bush-Jacoby-Medeiros (Tabla 1), para integrar las características funcionales y moleculares a los sistemas de clasificación. En este esquema de clasificación las betalactamasas están divididas en clases de acuerdo a sus características funcionales, moleculares (como su peso y estructura), y propiedades bioquímicas (como su punto isoeléctrico, sitio activo y secuencia de aminoácidos) además de las características anteriormente mencionadas, por lo que en base a esto criterios se crearon los siguientes grupos:

- *Grupo 1*, Cefalosporinas que son pobremente inhibidas por Ácido Clavulánico.
- *Grupo 2*, Penicilinasas, Cefalosporinas y betalactamasas de espectro amplio, que son generalmente inhibidas por Ácido Clavulánico.
- *Grupo 3*, metallo- β -lactamasas que hidrolizan Penicilinas, Cefalosporinas y carbapenémicos y que son pobremente inhibidas por los inhibidores clásicos como Ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam. (Garza, 2010; Abarca, 2001).

i. Grupo 1 de Bush-Jacoby-Medeiros

Las enzimas Ambler clase C son primariamente Cefalosporinas, constitutivas o inducibles que se hallan sobre los cromosomas de las bacterias Gram negativas. En forma más reciente se ha descubierto que las enzimas de clase C se diseminan mediante plásmidos. Esta clase de enzimas son activas contra Penicilina, pero aún más contra Cefalosporinas pudiendo hidrolizar cefamicinas, oxiiimino-Cefalosporinas y monobactámicos. El sitio activo de estas enzimas está constituido por un aminoácido serina que se encuentra en el centro de la molécula.

i. Grupo 2 de Bush-Jacoby-Medeiros

Este es el grupo más importante y consiste en las serinas-proteasas que tienen actividad de amplio espectro. Se encuentran codificadas por genes que se encuentran en los cromosomas bacterianos o en plásmidos ó transposones, por lo que pueden

transferirse con facilidad de una bacteria a otra, fenómeno visible en aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas. En este grupo se encuentran las enzimas estafilocócicas y muchas de la betalactamasas más importantes de las bacterias Gram negativas, donde se encuentran principalmente las familias TEM y SHV. Otras características que reúnen las enzimas de este grupo es que son susceptibles a inhibidores de betalactamasas (como Ácido Clavulánico) y que además poseen el aminoácido serina en su sitio activo el cual se encuentra en un surco ente dos dominios estructurales. Tienen la capacidad de hidrolizar sólo Penicilinas, sin embargo debido al uso de las Cefalosporinas se incluye en este grupo a las betalactamasas con mutaciones que van desde 1 a 5 residuos, algunos cercanos al sitio activo de la enzima con la capacidad de reconocer e hidrolizar Cefalosporinas (BLEE).

ii. Grupo 2d de Bush-Jacoby-Medeiros

Las enzimas Ambler clase D (oxacilinasas), son también llamadas PSE por ser enzimas producidas por el género *Pseudomonas*. Estas enzimas carecen de identidad en su secuencia de aminoácidos en comparación con las betalactamasas de clase A. Otra característica de estas enzimas es que son poco inhibidas por los inhibidores de betalactamasas (como Ácido Clavulánico). Poseen el aminoácido serina en su sitio activo y se caracterizan por su perfil de hidrólisis contra Penicilinas y Cefalosporinas de espectro reducido (Koneman, 2008; Garza, 2010).

i. Grupo 3 de Bush-Jacoby-Medeiros

Las enzimas Ambler clase B ó metallo- β -lactamasas (MBL) requieren cationes divalentes como cofactores para llevar a cabo su actividad. Ambler las clasifico como serina- β -lactamasas, pero Bush las clasifico en un grupo separado de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, como la hidrólisis de Imipenem, su sensibilidad a EDTA y la ausencia de inhibición por Ácido Clavulánico. En este grupo se encuentran principalmente las familias IMP, VIM, ASA, IMI y FEZ. No obstante, son de difícil clasificación a nivel molecular, lo que se atribuye al mecanismo de hidrólisis que es totalmente distinto a las otras enzimas, ya que realizan la inactivación del anillo betalactámico cuando los cationes divalentes de zinc se coordinan con los grupos hidroxilos de la enzima realizando el ataque nucleofílico. Estas enzimas poseen

actividad contra carbapenémicos, Penicilinas y Cefalosporinas, pero no como Aztreonam.

Tabla 1.- Clasificación de Betalactamasas según Bush-Jacoby-Medeiros y Ambler

Grupo	Clase molecular	Sustrato de referencia	Inhibición por Ácido Clavulánico	Inhibición por EDTA	Enzimas representativas
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC de Gram negativos MRI-1, CMY, FOX, ACT
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bacterias Gram negativas
2b	A	Penicilinas y Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	+	-	TEM-3 a TEM-174, SHV-2 a SHV-127
2br	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-41, TRC-1
2c	A	Penicilinas y Carbapenémicos	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas y Cloxacilinas	+/-	-	OXA-1 a OXA-150, PSE-4
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinas de <i>P. vulgaris</i>
2F	A	Penicilinas, Cefalosporinas y Carbapenémicos	+	-	NMC-A de <i>E. cloacae</i> , SME-1 de <i>S. marcescens</i> , KPC, GES
3	B	La mayoría de β -lactamasas (Penicilinas y Cefalosporinas) incluyendo Carbapenémicos	-	+	L-1 de <i>S. maltophilia</i> , CCRA de <i>B. fragilis</i> , VIM, IMP, SPM, GIM, SIM
4	No determinado	Penicilinas	-	¿	Penicilinas de <i>B. cepacia</i>

d) Betalactamasas y resistencia a los antibióticos

Las betalactamasas de las bacterias Gram positivas son en su mayor parte enzimas de clase C inducibles que se forman en la membrana celular, y son excretadas al ambiente extracelular. Las implicaciones prácticas de estas características son dobles. En primer lugar, las bacterias deben estar expuestas al antibiótico betalactámico antes de que la enzima se produzca en grandes cantidades. Segundo, la producción extracelular de betalactamasa podría proteger las bacterias coinfectantes que no producen la enzima.

Las betalactamasas de las bacterias Gram negativas son más complicadas y el nivel creciente de complejidad. Las enzimas cromosómicas que eran expresadas constitutivamente en bajo nivel en muchas especies entéricas (clase C/grupo 1) fueron aumentadas primero por enzimas de amplio espectro inducibles codificadas por plásmidos o transposones (clase A/grupo 2), más tarde por mutaciones en las enzimas de espectro ampliado mediadas por plásmidos (también clase A/grupo 2) y más recientemente por la aparición de las enzimas de clase C/grupo 1 sobre plásmidos (Koneman, 2008).

e) Tratamiento antimicrobiano contra betalactamasas

Se desarrollaron diversas modificaciones moleculares en la estructura betalactámica para proteger el anillo contra la hidrólisis enzimática. Este desarrollo llevó a la producción de antibióticos más efectivos, además se aplicaron estrategias similares para desarrollar Penicilinas y Cefalosporinas más resistentes a la variedad de betalactamasas producidas por los bacilos Gram negativos. Otra estrategia terapéutica contra las betalactamasas en general es combinar dos fármacos betalactámicos diferentes, uno de ellos (el inhibidor de betalactamasa) se une con avidéz y de forma irreversible a la betalactamasa, y la incapacita para la hidrólisis, mientras el segundo betalactámico, que es sensible a la actividad de la betalactamasa, ejerce su actividad antibacteriana (Forbes, 2004).

5. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE o ESBL)

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas y el surgimiento de enterobacterias resistentes a los antibióticos representan un gran problema mundial actualmente, siendo las cepas productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) un ejemplo de este fenómeno, ya que han generado una gran preocupación debido a las implicaciones clínicas y terapéuticas que tienen debido a su transmisión y diseminación a diversos microorganismos (Perozo, 2009; Álvarez, Et al, 2010).

a) Definición

Las BLEE o ESBL (siglas en ingles) son enzimas capaces inactivar por hidrólisis a las Penicilinas, Cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación (estas

últimas dos conocidas como oximino-cefalosporinas por contener una cadena oximino en su estructura molecular) (Cercenado, 2011; Navarro, F., Et al, 2011; Guzmán, 2009; Fagundo, 2008) y los monobactámicos (como Aztreonam), que son sus diferentes sustratos betalactámicos.

Son enzimas que se encuentran en microorganismos que en general son resistentes a Ceftazidima, Cefotaxima y Ceftriaxona pero son sensibles a las Cefamicinas (Cefoxitina, Cefotetan y Cefmetazol) y a ciertos carbapenémicos (Imipenem, Meropenem y Ertapenem), incluyendo generalmente susceptibilidad a antibióticos inhibidores de betalactamasas como son el Ácido Clavulánico (ó Clavulanato), Sulbactam y Tazobactam, es decir, se inhiben con inhibidores de serina β -lactamasas (Díaz, Et al, 2009; Seral, 2010; Álvarez, Et al, 2010; Garciadiego, 2011; Martínez, 2011; Pino, Et al, 2007; Navarro, Et al, 2005).

b) Clasificación de Betalactamasas de Espectro Extendido

Las BLEE son enzimas de mayor relevancia clínica, cuya familia está en continuo crecimiento como consecuencia de distintas mutaciones en los genes que codifican los aminoácidos que conforman las betalactamasas clásicas con menor espectro hidrolítico (grupo 2b: TEM-1, TEM-2 y SHV-1) (Castro, Et al, 2008; Gobernado, Et al, 2005; Navarro, Et al, 2005; Garzón, Et al, 2004). Estas betalactamasas 2b poseen actividad Penicilinasas y son en su mayoría, inhábiles por el Ácido Clavulánico; las mutaciones en el centro activo de estas enzimas 2b han determinado la aparición de las BLEE (Castro, Et al, 2008), y de acuerdo a lo anteriormente mencionado, se clasifican dentro del grupo 2b de la clasificación Bush-Jacoby-Medeiros, constituyendo el subgrupo 2be; en la clase molecular A según su correlación con la clasificación molecular de Ambler (Navarro, F., Et al, 2011; Perozo, 2009; Álvarez, Et al, 2010; Sánchez, 2004; Morfin, 1999). Entre las familias de enzimas más distinguidas se encuentran las de tipo TEM, SHV y CTX (Navarro, F., Et al, 2011; Garciadiego, 2011).

A lo largo del tiempo se han descubierto diversas BLEE, que han incrementado su incidencia y que no se relacionan clara y estrechamente con las familias de betalactamasas establecidas anteriormente, es decir que son no derivadas de TEM ni SHV: PER (PER-1 y PER-2), VEB-1, CME-1, GES (GES-1, GES-2), SFO-1, TLA-1, BEL, BES,

IBC (IBC-1) y Toho (Toho-1 y Toho-2) las cuales se han encontrado en un número limitado de sitios geográficos y que en general se caracterizan por hidrolizar a la Cefotazidima de forma más eficiente que a otros betalactámicos. Además de la resistencia conferida de alto nivel contra betalactámicos, dichas enzimas degradan también monobactámicos (Navarro, F., Et al, 2011; Martínez, 2010); asimismo se han detectado muchas mutantes de SHV-1 (SHV-2 a SHAV63). Es elemental señalar que los microorganismos que poseen resistencia natural a betalactámicos, se pueden agrupar en esta clase como productoras y no productoras de betalactamasa cromosómica inducible (García, Et al, 2005; Álvarez, Et al, 2010; Gobernado, 2005; Truppia, Et al, 2005).

i. Betalactamasas de tipo TEM

La sustitución de aminoácidos responsables del fenotipo de ésta enzima se encuentra en el sitio activo de la misma, y al cambiar su configuración, permite el acceso al fenotipo oximino betalactamasa. La sustitución de un único aminoácido en las posiciones 104, 164, 238, y 240 produce el fenotipo de BLEE, no obstante las BLEE con mayor espectro usualmente tienen más de una sustitución de aminoácidos (García, 2011). En general se conocen más de 160 variantes de TEM (TEM-3 a TEM-139) (Gobernado, 2005), la mayoría de ellas BLEE, sin embargo esta familia también incluye a las enzimas IRT (*inhibitor resistant TEM*) y CMT (*complex mutant TEM*).

ii. Betalactamasas de tipo Cefotaximasas (CTX)

Estas enzimas se denominan con estas siglas por tener mayor actividad contra las Cefalosporinas de tercera generación como Cefotaxima, Cefotazidima ó Ceftriaxona, a diferencia de su actividad frente a otros sustratos betalactámicos oximino como Cefepima, contra los que poseen niveles de resistencia variables. Estas enzimas además confieren, a las bacterias que las producen, altos niveles de resistencia contra monobactámicos (Mantilla, Et al, 2009).

Las Cefotaximasas (CTX-M) son las BLEE más ampliamente diseminadas entre especies de la familia de *Enterobacteriaceae*, y son la causa principal de resistencia en

aislamientos provenientes de infecciones nosocomiales y comunitarias que han ido en aumento en los últimos años. Estas han incrementado su dispersión y es debido a esta diseminación que estas enzimas han adquirido relevancia epidemiológica en los últimos años en diversas zonas geográficas a nivel mundial (Díaz, Et al, 2009; Garcíadiago, 2011; Mantilla, Et al, 2009; García, Et al, 2005).

A diferencia de las otras BLEE, estas enzimas no surgieron por mutaciones de otras enzimas; su origen proviene de los genes en plásmidos que pertenecen a los miembros del género *Kluyvera.*, microorganismos comensales, infrecuentemente patogénicos que producen este tipo de enzimas de forma “natural”.

Comparando la estructura molecular estas enzimas en comparación con las CTX-M, se observa un alto grado de identidad (Penicilinasas cromosómicas), por lo cual se puede sugerir un mismo tipo de transmisión. Actualmente se han descrito más de 60 enzimas CTX-M las cuales son el tipo de BLEE más frecuente a nivel mundial, siendo la CTX-M-2 la enzima que más se presenta en las cepas de aislamientos clínicos. En la actualidad se conocen más de 80 de Cefotaximasas CTX-M (clasificadas en 5 grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) correspondientes a la familia de las BLEE (Seral, 2010; Garcíadiago, 2011).

iii. Betalactamasas de tipo SHV

Esta enzima al inició fue relacionada a las TEM pero al ser menos común, se le agrupo en la familia SHV, categoría dada por su grupo sulfhídrido. Estas enzimas, al igual a las anteriores familias, ha tenido cambios en los aminoácidos alrededor de su sitio activo, más comúnmente en la posición 238 ó 238 y 240, lo que le ha otorgado su gran diversidad. Actualmente se conocen más de 1115 variedades de SHV con distribución mundial en diferentes especies de enterobacterias incluyendo el género *Salmonella*, siendo las más comunes SHV-5 y SHV-12 (Garcíadiago, 2011).

iv. Betalactamasas de tipo Oxacilinasas (OXA)

Las enzimas OXA son menos frecuentes y también están mediadas por plásmidos. Las cepas portadoras de las betalactamasas tipo OXA (principalmente OXA-1) hidrolizan Oxacilina y suelen presentar patrones de resistencia similares a las portadoras de IRT,

ya que presentan resistencia a Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilinas y una sensibilidad disminuida (o resistencia) a Amoxicilina-Ácido Clavulánico, Ampicilina-Sulbactam y a la combinación de Piperacilina-Tazobactam.

Una característica de las enzimas de tipo OXA es que generalmente presentan una menor sensibilidad a Cefepima. Debido a que en ciertos casos el Ácido Clavulánico presenta actividad sobre estas enzimas, es frecuente observar (especialmente mediante la técnica de difusión con discos) sinergia entre el Ácido Clavulánico y la Cefepima, siendo este patrón característico de las enzimas tipo OXA-1. Asimismo, algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional 2de), se consideran dentro del grupo de las BLEE, las cuales se presentan con mayor frecuencia en microorganismos como *P. aeruginosa* (Navarro, F., Et al, 2011; Garcíadiego, 2011).

v. *Betalactamasas de tipo AmpC*

Además de las de betalactamasas anteriormente mencionadas, se ha reportado la existencia de otras enzimas que en el caso de hiperproducción confieren fenotipos de resistencia similares a la que determinan las BLEE de origen plasmídico. Estas enzimas se conocen como Cefalosporinas del tipo AmpC, y son también serina-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Estas enzimas son también llamadas Cefalosporinas aunque su espectro de acción hidrolítica no sólo incluye a estos antibióticos, ya que son capaces de inactivar por hidrólisis a Aminopenicilinas y Ureidopenicilinas, Cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas las Cefamicinas y, en menor medida las Cefalosporinas de tercera generación. Las Betalactamasas de tipo AmpC son muy poco eficaces hidrolizando las Cefalosporinas de cuarta generación y los Carbapenémicos, sin embargo este espectro de hidrólisis puede ampliarse y afectar además a Cefalosporinas de cuarta generación (AmpC de espectro extendido), pero actualmente se desconoce cuál es la prevalencia y la relevancia clínica y epidemiológica de estas variantes de AmpC (Navarro, F., Et al, 2011; Seral, 2010; Del Valle, 2009). La Cloxacilina y el Aztreonam, así como el Ácido Borónico y sus derivados (Ácido fenil-Borónico), inhiben a las betalactamasas de tipo AmpC, mientras que el Ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam no son buenos inhibidores (Navarro, F., Et al, 2011).

Entre las enterobacterias que producen estas enzimas de forma natural se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella*, *C. koseri*, *C. freundii*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* y distintas especies del género *Kluyvera*. (Seral, 2010; Álvarez, 2010). Sin embargo en general los microorganismos que producen este tipo de enzimas se denominan con el acrónimo general de SPACE (S: *Serratia*; P: *Pseudomonas*, A: *Acinetobacter*, C: *Citrobacter*, E: *Enterobacter*) (Pino, Et al, 2007). La resistencia general de una cepa del grupo SPACE a Cefalosporinas de tercera generación sugiere la producción de betalactamasas del tipo AmpC, las que a diferencia de las BLEE no son inhibidas por Ácido Clavulánico (Pino, Et al, 2007; Gutiérrez, Et al, 2005).

La producción de AmpC puede ser constitutiva o inducible, siendo los niveles de producción dependientes del grado de expresión del gen *bla_{AmpC}*. Para comprender la diferencia entre betalactamasas AmpC inducibles y constitutivas, es necesario conocer el mecanismo de expresión y represión del gen que codifica a estas enzimas (genes *bla_{AmpC}*). Las bacterias que poseen genes *bla_{AmpC}*, tienen un complejo sistema molecular regulador de la expresión del mismo, el cual está íntimamente relacionado con el reciclaje del peptidoglucano. El proceso se inicia cuando los productos de degradación de la pared 1,6 anhidromuropéptidos (1,6 amp), ingresan al citoplasma bacteriano a través de una permeasa transmembrana denominada AmpG (codificada por el gen *ampG*). Estos productos de degradación 1,6 amp, actúan como molécula señal (promotores o inductores) del activador transcripcional AmpR (codificado por el gen *ampR*). Cuando el AmpR se une a los 1,6 amp se induce la expresión del genes *bla_{AmpC}* y de esta manera, se produce la enzima AmpC, la cual ejercerá su efecto hidrolítico sobre los betalactámicos. El sistema represor consiste en el clivaje de los 1,6 amp por la enzima AmpD, la cual es una amidasa citoplasmática (N- acetil-anhidromuramil-lalaninamidasas) codificada por el gen *ampD*, hasta ácido 1,6 anhidromurámico y péptidos. Los péptidos son procesados hasta tripéptidos los cuales son reusados, resultando en la formación del precursor de la pared celular UDP-N-acetilmuramilpentapéptido, que al unirse con el activador transcripcional AmpR, lo bloquea reprimiendo así la transcripción del genes *bla_{AmpC}*. Otro gen involucrado es el *ampE*, el cual en conjunto con *ampD*, forma el operón *ampDE* que codifica una

proteína de membrana la cual se piensa actúa como molécula sensora requerida para la inducción (Del Valle, 2009).

Independientemente del mecanismo que conduce a una hiperproducción de AmpC, los aislados hiperproductores de AmpC presentan un fenotipo de resistencia (fenotipo AmpC) a las Penicilinas, las asociaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasa, Cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas generalmente las Cefamicinas, así como a las Cefalosporinas de tercera generación, pero en grado variable, dependiendo del nivel de hiperproducción. Esto se debe a que los betalactámicos inducen la producción de AmpC causando un incremento en la concentración citoplasmática de los productos de degradación 1,6 Amp por lo que todos los betalactámicos son inductores de estas enzimas en mayor o menor grado. Específicamente los aislados con este fenotipo AmpC suelen ser además sensibles a los carbapenémicos, aunque dicha sensibilidad se reduce significativamente si se produce la pérdida de alguna porina relacionada con la resistencia antimicrobiana (Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

1) AmpC constitutiva ó AmpC cromosómicas no inducibles

Cuando este gen se expresa de forma constitutiva (ausencia de genes reguladores del tipo *ampD* o *ampR*) puede hacerlo a niveles basales bajos, confiriendo un fenotipo de resistencia natural o salvaje característico de la especie bacteriana, o puede hacerlo a unos niveles muy superiores al basal, por sobreexpresión de *bla*_{AmpC} mediada por mutaciones en la región de atenuador y/o promotor del gen cromosómico *bla*_{AmpC}, adquisición de promotores fuertes para la expresión de *bla*_{AmpC}, produciendo cantidades elevadas de AmpC (hiperproducción de AmpC) confiriendo la resistencia anteriormente señalada (Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

En este grupo se pueden ubicar las siguientes enterobacterias productoras de BLEE: *E. coli* (como bacteria representativa), *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Shigella spp.*, *P. mirabilis*, *C. koseri*, *P. vulgaris*, *P. penneri* y *P. mirabilis* que no presentan resistencia natural a los antibióticos betalactámicos, excepto a Penicilina, Meticilina y Oxacilina. Estos microorganismos aunque producen la enzima tipo AmpC en forma constitutiva

no inducible con un mínimo modo de expresión, no presentan resistencia a las Aminopenicilinas (Ampicilina y Amoxicilina), Carboxipenicilinas (Carbenicilina y Ticarcilina) y Acil Ureidopenicilinas (Mezlocilina y Piperacilina), salvo en cepas hiperproductoras de AmpC (Camacho, Et al, 2004; Famiglietti, Et al, 2005; Del Valle, 2009).

Este también es el caso de *Salmonella* que es una bacteria que carece normalmente de betalactamasas cromosómicas constitutivas, ya que representan un coste biológico que evitaría la capacidad invasiva y de multiplicación intracelular, inclusive se ha demostrado que posee genes de resistencia dentro del islote de patogenicidad de localización cromosómica (Trupia, Et al, 2005; Del Valle, 2009).

2) AmpC cromosómicas inducibles

En determinadas especies bacterianas el gen *bla*_{AmpC} se expresa de forma inducible, en niveles bajos de manera natural y aumentan su síntesis en presencia de inductores (betalactámicos). En los aislados que tienen un gen *bla*_{AmpC} inducible, su expresión puede estar desreprimida de forma parcial o total (mutaciones en genes reguladores de tipo *ampD* y *ampR*) perdiendo así la característica de inducción y dando lugar a la producción estable de grandes cantidades de AmpC (hiperproducción parcial o total de AmpC) (Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

El género *Enterobacter* constituye el género arquetípico en la producción de este tipo de enzimas, ya que *Enterobacter cloacae* y *E. aerogenes*, producen betalactamasas tipo AmpC de forma frecuente, sin embargo especies infrecuentes de *Enterobacter* tales como *E. taylorae*, *E. agglomerans*, etc., quedan excluidos de esta recomendación. A este grupo también pertenecen *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morganii*, *P. aeruginosa* y *Providencia spp* (Del Valle, 2009).

Estas enterobacterias presentan resistencia a: Ampicilina y Amoxicilina, con o sin Ácido Clavulánico, y a Cefalosporinas de primera generación. *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *C. freundii*, presentan además resistencia a Cefoxitina; mientras que *S. marcescens*, *M. morganii* y *Providencia spp.* presentan sensibilidad variable a este antimicrobiano (Camacho, Et al, 2004; Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

3) AmpC plasmídicas inducibles y AmpC plasmídicas constitutivas

La evidencia molecular sugiere que los genes que codifican a estas enzimas, están codificadas y derivan de los genes *bla*_{AmpC} cromosómicos que naturalmente poseen las enterobacterias mencionadas. Estos genes han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando la diseminación a diferentes microorganismos como son integrones, como los de clase 1, o transposones localizados en plásmidos conjugativos por lo que se conocen como AmpC plasmídicas que por su naturaleza se encuentran potencialmente presentes en todas las enterobacterias (AmpC plasmídicas). Estos genes *bla*_{AmpC} plasmídicos proceden del cromosoma bacteriano y se clasifican en 6 familias que se diferencian por la homología de sus genes: CIT (derivadas de AmpC cromosómica de *C. freundii*), DHA (derivadas de AmpC cromosómica de *M. morganii*), ACC (cuyo origen está relacionado con AmpC cromosómica de *Hafnia alvei*), FOX (derivadas probablemente de AmpC cromosómica de *Aeromonas media*), MOX (presumiblemente derivadas de AmpC cromosómica de *Aeromonas caviae*), EBC (derivadas de las AmpC cromosómicas de *E. cloacae* y/o *Enterobacter asburiae*) (Del Valle, 2009). Las betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas pueden causar fracasos terapéuticos, similares a los descritos en infecciones causadas por aislados hiperproductores de AmpC cromosómica inducible (selección de mutantes con desrepresión estable) en tratamientos con betalactámicos (Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

vi. *Betalactamasas resistentes a los inhibidores (IRT)*

La asociación Amoxicilina y Ácido Clavulánico presenta actividad frente a un gran número de enterobacterias incluyendo las resistentes a la Amoxicilina por producción de BLEE como TEM-1, TEM-2 o SHV-1. Estas betalactamasas hidrolizan Penicilinas, específicamente a las Aminopenicilinas como Ampicilina y Amoxicilina, así como a las Carboxipenicilinas como Ticarcilina; y además son sensibles a los inhibidores de betalactamasa. A partir de estas enzimas y mediante mutaciones puntuales aparecieron las IRT, aunque también se han descrito diferentes enzimas derivadas de SHV-1. Además, algunas Oxacilinasas como la OXA-1, también confieren un fenotipo similar al de las IRT, que se caracteriza por resistencia a Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas y Ureidopenicilinas siendo insensibles a la acción de los inhibidores

de betalactamasa de clase A como el Ácido Clavulánico y, en su gran mayoría no tienen actividad sobre el resto de betalactámicos. Generalmente, una cepa que expresa una betalactamasa de tipo IRT presentará resistencia a Aminopenicilinas, Carboxipenicilinas, Ureidopenicilinas (en mayor o menor medida) y sensibilidad disminuida o resistencia a Amoxicilina-Ácido Clavulánico. Estas cepas muestran además sensibilidad a las Cefalosporinas, incluyendo las de primera generación. (Navarro, F., Et al, 2011).

vii. *Betalactamasas del Complejo TEM*

Otras enzimas BLEE también pertenecientes a la clase A, aunque del subgrupo 2be son las betalactamasas CMT (*complex mutant TEM*) como la TEM-50 que combinan una cierta resistencia a la inhibición por el Ácido Clavulánico junto a una mayor actividad frente a Oximino-Cefalosporinas. (Navarro, F., Et al, 2011).

c) *Microorganismos productores de BLEE*

Las BLEE son enzimas producidas principalmente por bacilos Gram negativas (Pujol, 2003) ya que recientemente han sido encontradas en casi todas las enterobacterias, en una serie de casos que han sido reportados desde los años 80 (Castro, Et al, 2008; Famiglietti, Et al, 2005). Sin embargo las especies de enterobacterias que con mayor frecuencia las producen son *K. pneumoniae*, *E. coli* (Cercenado, 2011; Guzmán, 2009) y *K. oxytoca* (Garcíadiego, 2011), encontrándose un porcentaje considerable de BLEE en otros géneros como son *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Salmonella* y *Shigella*.

Su producción ha sido identificada en microorganismos no fermentadores como *Acinetobacter*, *Burkholderia*, el género *Pseudomonas*, y en menor medida en *Stenotrophomonas maltophilia* y algunas otras especies. (Castro, Et al, 2008; Garcíadiego, 2011; Celis, Et al, 2009; Martínez, 2011; Espinal, Et al, 2004). Particularmente su producción por *P. aeruginosa* ha sido destacable) ya que de este microorganismo recientemente se descubrieron 5 tipos de BLEE diferentes, entre los que se destacan: TEM y SHV, (Navarro, Et al, 2005; Trupia, Et al, 2005; Lezameta, Et al, 2010; Perozo, 2008; Piersigilli, Et al, 2009), donde además se han encontrado BLEE

inusuales como PER, VEB y GES/IBC, además de muchas betalactamasas mutantes clase D de espectro extendido que incluyen las enzimas OXA y diferentes carbapenemasas (Rivera, Et al, 2008; Martínez, et al, 2007). En el caso particular de *Salmonella enterica* si llega a producir betalactamasas estas son de origen plasmídico y las más frecuentes son TEM, SHV, OXA y CTX-M. En el caso particular de *S. thypimurium* de distribución mundial, se ha encontrado que posee un plásmido que codifica a Penicilinasas OXA-1 y que además presenta una sensibilidad disminuida a la Cefepima, lo que puede dificultar su diferenciación de una cepa productora de BLEE (Trupia, Et al, 2005; Garcíadiego, 2011).

d) Características genéticas de las BLEE

Los genes de resistencia a antimicrobianos han permitido a los diferentes microorganismos expandir su nicho ecológico, permitiendo su desarrollo y proliferación en diferentes ambientes. No es sorprendente que estos genes se encuentren diseminados en diferentes cepas bacterianas, por medio de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones y/o integrones) de transmisión; mecanismos de transferencia que resultan de interés en el caso de la producción de BLEE como mecanismo de diseminación (Garza, 2010).

En general el genoma bacteriano consiste de DNA cromosómico, en donde reside la información genética responsable de las características celulares, las vías metabólicas y la reparación celular. Este genoma también se encuentran en pequeños elementos circulares o lineales extracromosomales de DNA conocidos como *plásmidos*, que se replican autónomamente (replicón), es decir, el control de su replicación es independiente de la maquinaria enzimática, siendo dependiente de las secuencias en el propio plásmido. Estos elementos contienen información genética útil ya que en el caso de las bacterias estos elementos codifican para diversas actividades suplementarias como factores de virulencia, producción de toxinas, degradación de compuestos orgánicos tóxicos y resistencia a metales pesados, luz ultravioleta, y resistencia a antibióticos, etc., es por esto que existen bacterias que pueden contener simultáneamente una variedad de diferentes plásmidos.

Una característica importante de muchos plásmidos es la habilidad de transferir una copia de sí mismo de una bacteria a otra, mediante contacto célula-célula, lo que se conoce como conjugación ó vía de transferencia horizontal. Para lograr esto los plásmidos poseen la información necesaria para tener contacto entre la célula donadora y receptora, por medio de la codificación de *pilis*, que permiten 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 conjunción de estos elementos permiten que los genes se transmitan de manera vertical en una familia (clonal), así como por conjugación entre especies, lo que permite la diseminación de información genética.

La transferencia de material genético de un plásmido a un cromosoma también puede ocurrir por un episodio de recombinación-transformación (incorporación directa de DNA libre por células bacterianas), que implica una co-integración de la información del plásmido al cromosoma.

El proceso de transferencia de material genético de un plásmido a un cromosoma también se facilita por pequeños elementos móviles de DNA que pueden insertarse y removerse del cromosoma o de un plásmido, conocidos como *transposones*, que incluyen determinantes que les permiten realizar una recombinación sitio específica ó ilegítima que facilita el movimiento de una molécula de DNA a otra. Otra variante de un plásmido es un *integrón*, que también es un elemento móvil de DNA que tiene una estructura específica con dos segmentos conservados en los flancos de una región central, por lo que un integrón actúa como un “cassette” de expresión para genes insertados, los cuales pueden ser más de uno (Garza, 2010; Morfin, Et al, 1999).

Diversas investigaciones han demostrado que mayor parte de los genes de resistencia a los betalactámicos, las Tetraciclinas y los Aminoglucósidos que se organizan dentro de plásmidos conjugativos, también se pueden encontrar dentro de un transposón, fundamentándose así el que los genes localizados en transposones incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos. Esto se explica ya que en el ciclo de adquisición de resistencia bacteriana, los antibióticos ejercen presión selectiva creando un reservorio de genes de resistencia y DNA de resistencia. Es de este reservorio del que las

bacterias pueden incorporar DNA con codificación de resistencia. Por lo tanto, los genes de resistencia presentes en el citoplasma bacteriano en donde pueden formar “cassettes” de multirresistencia, pueden llevar a cabo la incorporación de estos genes, esto a través de replicadores por medio de plásmidos y transposones, con lo cual continúa la diseminación de los genes de resistencia por transferencia intra e inter específica (Garza, 2010; Morfin, Et al, 1999).

En el caso de las BLEE, estas se encuentran codificadas en genes *bla*, que, como se señaló anteriormente, pueden encontrarse en elementos móviles como son plásmidos, transposones e integrones que en conjunto han permitido una amplia y rápida diseminación, no solo entre distintas cepas de la misma especie (horizontal) sino también entre bacterias de distintos géneros (clonal) (Castro, Et al, 2008; Garza, 2010),

Es importante mencionar que los genes *bla*, que codifican BLEE se encuentran junto con otros genes que codifican la resistencia a otros antibióticos no betalactámicos ya que, como se señaló anteriormente, estos pueden residir en el mismo plásmido, transposón ó integron, transfiriéndose conjuntamente con el gen responsable de la producción de BLEE por medio del mecanismo conjugativo, transmitiéndose de un microorganismo a otro, confiriendo el perfil de resistencia antibiótica múltiple mencionada por diversos autores (Fagundo, Et al, 2008; Garcíadiego, 2011). Esta resistencia conjunta entre antibióticos betalactámicos y no betalactámicos por transferencia de múltiples elementos genéticos está basada en diversas investigaciones que han corroborado el fenómeno. En el caso de cepas de *K. pneumoniae* se ha demostrado que en un mismo transposón responsable de la producción de enzimas inactivadoras de Aminoglucósidos, también es responsable de la codificación de la BLEE, lo que tiene como consecuencia la aparición de bacterias multirresistentes. Esto fue demostrado científicamente en cepas de *K. pneumoniae* las cuales fueron simultáneamente resistente a Ceftazidima y a otras cefalosporinas de tercera generación, así como a Amikacina y otros Aminoglucósidos (García, Et al, 2005; Garza, 2010; Garzón, 2004; Perozo, 2009; Navarro, F., Et al, 2011; Garza, 2010). Igualmente se han encontrado que algunos aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE tipo SHV-4 con idénticos perfiles de plásmidos y genomas, expresan diferentes perfiles de resistencia, esto fundamenta además el que los

aislamientos aun siendo genéticamente diferentes, expresen fenotipos similares de resistencia (Martínez, 2007).

La resistencia a aminoglucósidos está relacionada, sobre todo, con la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA). La secuenciación de integrones completos que contienen genes que codifican BLEE (en particular CTX-M) y EMA ha permitido comprobar esta resistencia asociada (Martínez, 2010).

La resistencia a quinolonas también es un ejemplo de resistencia asociada genéticamente entre BLEE y otros antibióticos no betalactámicos, esto se ve ejemplificado en la resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *E. coli*, la cual se debe casi exclusivamente de mutaciones en genes cromosómicos de las cepas productoras de BLEE (Fagundo, Et al, 2008; Garciadiego, 2011; Martínez, 2010; Hernández, Et al, 2009). De igual forma múltiples estudios recientes indican que algunas cepas productoras de BLEE contienen genes de resistencia a Quinolonas mediados por plásmidos, que contribuyen al fenotipo de multirresistencia (Martínez, 2010).

e) Resistencia a antibióticos no betalactámicos relacionada con BLEE

La presión selectiva ejercida por el uso excesivo de Cefalosporinas y el abuso de agentes betalactámicos, que además es generada por la presión antibiótica global que se ejerce en grupo de antibióticos, justifica la resistencia a otros antibióticos, que a su vez ha influido en la aparición de nuevas variantes de BLEE y microorganismos multirresistentes (Celis, Et al, 2009; De Cueto, Et al, 2006; Yagüe, Et al, 2005).

Actualmente se conoce que el perfil de multirresistencia antibiótica que expresan las cepas productoras de BLEE ocasiona, especialmente en el ámbito hospitalario, un problema terapéutico de notables dimensiones. La aparición de las BLEE ha dificultado enormemente el tratamiento de numerosas infecciones bacterianas porque estas cepas presentan, además de la resistencia mencionada, altas tasas de resistencia a otros antimicrobianos de familias diferentes (Desimoni, 2004; Navarro, 2005), Como se señaló anteriormente, esto se debe a las características de transmisión genética de las BLEE lo que propicia la aparición de diferentes cepas resistentes a los Aminoglucósidos, a Trimetoprim/Sulfametoxazol, Quinolonas, Fluoroquinolonas, Tetraciclinas y

Clotrimoxazol, entre otros; resistencia que puede ser transferida entre especies no relacionadas y que por lo tanto excluye a estos antimicrobianos como alternativas para el adecuado tratamiento a infecciones causadas por este tipo de cepas (Perozo, 2009; Díaz, Et al, 2009; Castro, et al, 2008; Fagundo, Et al, 2008; De Cueto, Et al, 2006; Martínez, 2011).

Además de los casos señalados en el apartado anterior, existen reportes documentados de aislamiento de los microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* productores de BLEE en especímenes clínicos, que presentan multirresistencia *in vitro* a los siguientes antimicrobianos: Penicilina, Isoxazolil Penicilina (Oxacilina), Meticilinas, Glucopéptidos, Macrólidos, Azálidos (excepto *S. enterica* no *Typhi* y *Shigella spp.*), Cetólidos, Clindamicina, Estreptograminas Y Oxazolidinonas (Linezolid); lo que limita las opciones terapéuticas a nivel intra y extra hospitalario (Famiglietti, Et al, 2005).

Con base en la información anterior, se ha establecido la necesidad de realizar ensayos de susceptibilidad a diversos antimicrobianos en las cepas productoras de BLEE, ya que si bien las cepas BLEE son resistentes a las Penicilinas, Cefalosporinas y Aztreonam, las pruebas de susceptibilidad realizadas en los laboratorios pueden proporcionar resultados específicos para cada antibiótico probado de susceptible o intermedio a otro tipo de antibióticos betalactámicos y no betalactámicos, esto ya que experimentalmente se ha probado que hasta el 40% de las BLEE revelan un patrón de susceptibilidad al menos a uno de ellos, la razón de esta aparente susceptibilidad radica en el diverso grado de hidrólisis de los antibióticos por las betalactamasas, así como de su penetración a través de la pared bacteriana, características que varían de cepa a cepa (Fagundo, Et al, 2008).

f) Epidemiología de las BLEE

La multirresistencia asociada a la diseminación por plásmidos ha definido el éxito epidemiológico actual de las BLEE y otros microorganismos multirresistentes nosocomiales, ya que como se describió anteriormente la diseminación de plásmidos de resistencia en diferentes clones o variaciones individuales dentro de cada cepa son la causa de la expresión de diferentes fenotipos de resistencia, que da como resultado

la presencia simultánea de varias betalactamasas, ejemplo de esto es *P. aeruginosa* en el que de un total de 8 aislamientos, solo 2 mostraron fenotipos idénticos de resistencia a los betalactámicos y el resto presento diferentes fenotipos de resistencia a estos mismos antibióticos (Desimoni, Et al, 2004). Al inicio la resistencia bacteriana, solo se encontraban en cepas con genes capaces de producir una o dos betalactamasas, sin embargo en la actualidad se tienen diferentes mutaciones en dichos genes que les permiten sintetizar tres o cuatro enzimas diferentes. Cuando múltiples enzimas son producidas por un mismo microorganismo, las características epidemiológicas pueden reflejar una mezcla compleja de microorganismos causantes de brotes en diversos ambientes (Abarca, 2001). Puesto que, la resistencia a betalactámicos es fácilmente transferida a diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, un mismo paciente puede presentar una resistencia a gran variedad de antibióticos no solamente betalactámicos sino también a otros no betalactámicos, que como se señalo anteriormente complica el empleo de diversos antibióticos, hecho que también cobra importancia epidemiológica al tratarse de una población y una zona geográfica específica. Aun considerando esto, cuando se habla de BLEE se hace referencia a las enzimas de codificación plasmídica ya que son estas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a su elevada capacidad de diseminación anteriormente mencionada (Álvarez, 2010).

i. Características epidemiológicas generales

Las bacterias productoras de BLEE causan infecciones hospitalarias y comunitarias de diseminación mundial e incidencia imparable. La prevalencia de aislamientos clínicos productores de BLEE varia de país a país y de hospital a hospital, aunque no ha cesado de aumentar progresivamente en una amplia gama de bacterias Gram negativas, extendiéndose en todo el mundo y generando brotes epidémicos que constituyen una amenaza en la evolución de las infecciones tanto nosocomiales como comunitarias, siendo por tanto un problema creciente en las instituciones de salud, por generar mayores tasas de resistencia a antimicrobianos a nivel mundial (Gobernado, 2005; Cercenado, 2011; Martínez, 2010; Navarro, F., Et al, 2011; Hernández, Et al, 2009).

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente *K. pneumoniae* y *E. coli* son los microorganismos responsables de infecciones nosocomiales graves relacionadas con la producción de BLEE entre las que se encuentran las infecciones urinarias, quirúrgicas, neumonía, meningitis. Pero no solo se han encontrado como causantes de infecciones sino que también se han documentado casos donde estos microorganismos se encuentran colonizando diversos sitios corporales con potencial riesgo de transmisión (Gobernado, 2005; Garcíadiago, 2011). Inicialmente *K. pneumoniae*, fue la especie más frecuentemente asociada con la producción de BLEE en las décadas anteriores, pero actualmente esta siendo desplazada de forma paulatina, aunque con menos carácter epidémico, por *E. coli*, reportándose actualmente porcentajes de fenotipo BLEE en más de 12 800 cepas de este microorganismo en América latina (8.5 %), Pacífico occidental (7.9 %) Europa (5.3 %) Canadá (4.2%) y Estados Unidos (3.3 %) (Garcíadiago, 2011). Sin embargo esto no es un problema exclusivo de estos dos microorganismos ya que como se describió anteriormente las BLEE se han encontrado en diferentes géneros bacterianos, que incluye su presencia en bacterias Gram negativas no fermentadoras. En enterobacterias las BLEE que se encuentran con mayor frecuencia son CTX-M, TEM, PER y en menor cantidad las derivadas de SHV, aunque en la actualidad se han descubierto un gran número de variedades de BLEE en distintos microorganismos (Famiglietti, Et al, 2005; Perozo, 2009; Hernández, Et al, 2009).

Desde su descripción inicial, se han identificado más de 300 BLEE diferentes, que como ya se ha mencionado la mayoría pertenece a las familias TEM, SHV y CTX-M. Las BLEE más frecuentes en la actualidad son TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32 (Seral, 2010; Navarro, F., Et al, 2011). Ciertos autores consideran que las enzimas BLEE tipo CTX-M han incrementado en todo el mundo en años recientes, además, recientemente se identificó al clon de *E. coli* productor de BLEE de tipo CTX-M-15, de alta resistencia antibiótica y elevada virulencia. Asimismo la presencia de la BLEE productora de TEM se ha considerado de mayor predominio en Estados Unidos y Europa (Castro, Et al, 2008). Existen reportes donde las muestras a partir de las que se han aislado distintas cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE han sido: orina (65%), exudados, sangre (11%), heridas (10.8%) y distintas secreciones respiratorias (7.5%). Además de este tipo de

muestras, se han presentado reportes del cultivo de microorganismos BLEE positivos a partir de expectoración, muestras vaginales, secreción de sonda gástrica, sonda Foley y meconio entre otras (Navarro, Et al, 2005; Díaz, Et al, 2009).

ii. Factores de riesgo y distribución

Los factores de riesgo asociados a la adquisición de infecciones por BLEE son múltiples y difieren según los estudios, además, de que su repercusión clínica no esta claramente definida (García, Et al, 2011). Uno de los principales factores de riesgo que contribuyen a la infección por enterobacterias productoras de BLEE es la hospitalización, ya que se encuentra reportado que los pacientes hospitalizados infectados por cepas de este tipo tienen mayor mortalidad, ya que no solo expone indirectamente a los pacientes a distintos reservorios intra hospitalarios, además favorece la colonización y la transmisión horizontal de las diferentes clonas productoras de BLEE, especialmente de *K. pneumoniae* y *E. coli* (García, Et al, 2011; Garcíadiago, 2011). Ejemplo de esto es el caso de *K. pneumoniae* ya que este es un microorganismo que puede ser aislado de 1 a 6% en la orofaringe y entre el 5 al 38% en heces de personas normales, pudiéndose incrementar estos valores a un 19% en la orofaringe y un 77% en materia fecal cuando el paciente hospitalizado (Desimoni, 2004; Sánchez, 2004). Se ha postulado que desde el punto de vista epidemiológico el reservorio de las BLEE es el tracto digestivo, esto por su probable colonización intestinal, por lo que se ha planteado que su transmisión, es relativamente fácil por medio de las manos debido a falta de medidas higiénicas (Perozo, 2009; Martínez, 2007, Gobernado, 2005; Casellas, Et al, 2005; Sánchez, 2008; Garcíadiago, 2011). Ejemplo de ello es *E. cloacae* que es parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, microorganismos que han emergido recientemente como importantes patógenos nosocomiales que no solo produce BLEE sino que además puede producir cefalosporinasas de tipo AmpC (García, 2005).

Además la hospitalización también es considerada como factor de riesgo por la presencia de una enfermedad de base (como EPOC), la gravedad del paciente (García, Et al, 2011; Martínez, 2010; Garcíadiago, 2011), el sometimiento a procedimientos invasivos (cirugías) así como, nutrición parenteral, hemodiálisis, cateterización

invasora (arterial, venosa, central, umbilical ó urinaria), presencia de gastrostomía, yeyunostomía, tubos nasogástricos ó sondas (urinaria), así como la ventilación mecánica aunado a fallas en las medidas de higiene del personal de salud, que en conjunto permiten la transmisión de genes que codifican BLEE, la adquisición de una infección nosocomial y la generación de brotes epidemiológicos. Estos brotes son generalmente monoclonales, ya que en cierto casos cuando la frecuencia de dichas cepas es alta en una institución, es más probable que un solo tipo de BLEE este involucrado reportándose además solo algunas epidemias secundarias a una sola cepa productora de BLEE sin embargo no se debe descartar la posibilidad de brotes policlonales (Díaz, 2009; Cercenado, 2011; Garciadiego, 2011; Martínez, 2011; Castro, Et al, 2008; Navarro, 2005; Gutiérrez, Et al, 2005; Garzón, 2004).

El tiempo de estancia en las salas de Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), salas de cirugía, unidades de quemados, sepsis neonatal, neonatología y unidades pediátricas en general representa además un factor de riesgo, ya que estas salas presentan un mayor índice de infección como consecuencia de las características que presentan estos pacientes haciéndolos más susceptibles a este tipo de infecciones, como lo es la edad (recién nacidos, pediátricos y edad avanzada), que su vez determina la existencia de otros factores de riesgo como es el bajo peso al nacer, residencia en acilos, etc. En el caso de pacientes con bacteremia por *E. coli* productor de BLEE son más a menudo de edad avanzada, que presentaron un mayor porcentaje de comorbilidad y uso de recursos sanitarios. La inmunosupresión que presentan los pacientes es un factor de riesgo porque favorece la adquisición de enterobacterias productoras de BLEE de diversos reservorios, así como la adquisición de otros patógenos nosocomiales multirresistentes como *P. aeruginosa*. Es por esto que la presencia de BLEE es un problema especialmente en las áreas de hematología que albergan pacientes con cáncer, en especial enfermos con leucemia linfoide aguda (Rivera, 2008; Garciadiego, 2011; García, Et al, 2011; Velasco, Et al 2010; Gutiérrez, Et al, 2005). La exposición intensiva a antibióticos, especialmente los betalactámicos es un factor de riesgo que se presenta con mayor frecuencia en este tipo de salas y la población extra hospitalaria (García, Et al, 2011; Martínez, 2010; Celis, Et al, 2009; Alpuche, 2002).

A pesar de la gran importancia de este tipo de infecciones, la prevalencia de las bacterias productoras de BLEE permanece desconocida en muchos hospitales y en muchas países a nivel mundial no está claro el significado clínico, debido principalmente a que se han realizado escasos estudios prospectivos diseñados específicamente para evaluar el pronóstico de estas infecciones (Navarro, Et al, 2005).

Estos factores se vieron corroborados en una investigación sobre bacteremia grave ocasionada por *E. coli* ya que en este estudio se encontró que la mayor parte de los pacientes presentaban algún tipo de patología de base, predominantemente neoplasia (38.2 %), seguida de la patología urológica (32.3 %), asimismo en este estudio el tratamiento antibiótico previo, la gravedad clínica inicial, un pronóstico desfavorable y la adquisición relacionada con cuidados sanitarios se asociaron a bacteriemia por *E. coli* productor de BLEE comparado con una no productora de BLEE. (García, Et al, 2011; Garcíadieago, 2011; Velasco, Et al, 2010).

Esto indica que las enterobacterias productoras de BLEE son importantes en el ambiente hospitalario, sin embargo como se señalo anteriormente, se ha registrado su presencia en pacientes ambulatorios, existiendo casos donde se adquiere una infección causada por un microorganismo productor de BLEE, en muchos casos sin tener como antecedente una terapia de primera línea con betalactámicos como factor de riesgo (Martínez, 2011; Fagundo, Et al, 2008; Martínez, 2007; Gobernado, 2005). En los últimos años la alta presencia de BLEE en la comunidad plantea cuestiones de gran interés epidemiológico porque durante un tiempo el problema estuvo centrado, en hospitales, siendo producidas más frecuentemente por *E. coli* y *K. pneumoniae*, siendo las enzimas principales los miembros de las familias TEM y SHV. Esta situación ha cambiado de forma drástica en la última década, ya que en muchas zonas geográficas se han aislado cepas de enterobacterias productoras de BLEE de forma cada vez más frecuente del medio extra hospitalario, habiéndose observado un crecimiento enorme de las betalactamasas de la familia CTX-M, y producidas además por otras especies (*P. mirabilis*, *Enterobacter* spp., *S. enterica*, etc.) (Martínez, 2011). Debe señalarse que es más frecuente la detección de cepas de *E. coli* procedentes de muestras de heces y de orina, especialmente en portadores sanos. Recientemente las cepas productoras de BLEE se han aislado de orina de pacientes no hospitalizados de pacientes de atención

primaria con infección de vías urinarias, muestra que es considerada como la más investigada para la presencia de estas enzimas. Esto revela la circulación de estas cepas en la comunidad, lo que además demuestra que este tipo de microorganismos no se hallan confinados en el ámbito hospitalario (Gobernado, 2005; Garciadiego, 2011; Navarro, 2005).

Los viajes internacionales realizados a diferentes países también se consideran como factor de riesgo para la adquisición de una infección por enterobacterias productoras de BLEE, siendo los lugares de infección más frecuentes Asia, India, Medio Oriente, África y Sudamérica (Garciadiego, 2011).

El comportamiento epidemiológico de las bacterias productoras de BLEE se encuentra basado en la transmisión de cepas con multirresistencia anteriormente descrita, la aparición de brotes de infección nosocomial, relacionándose en general con altas tasas de morbilidad, mortalidad y a menores tasas de respuesta clínica y microbiológica. La elevada mortalidad está relacionada con el tratamiento inicial empírico el cual en muchos casos es inadecuado, lo que conlleva un fracaso terapéutico que incrementa el riesgo de muerte del paciente. Esta situación fue ejemplificada con un reporte documentado que señalo la existencia de una tasa de mortalidad del 3.7% en pacientes tratados con carbapenémicos, comparada con 64% en pacientes que recibieron antibióticos sin actividad contra estos microorganismos. En relación a esto se han reportado estudios donde se compara la mortalidad en pacientes infectados por *E. coli* productoras de BLEE y los infectados con *E. coli* no productoras de BLEE, observándose que en pacientes con infecciones de este tipo presentaban mayor mortalidad por no recibir de inició el antibiótico efectivo (Gobernado, 2005; Garciadiego, 2011; Guzmán, 2009; Garza, 2010). Además la morbilidad y mortalidad asociada a infecciones por BLEE implica largas estancias intrahospitalarias, mayores tasas de reingreso y en consecuencia el aumento de los costos en las instituciones de salud en cuanto a la duración del tiempo de hospitalización y administración de un tratamiento inicial incorrecto, que se ve aumentado en pacientes con este tipo de infecciones en comparación con las infecciones causadas por bacterias no productoras de BLEE de las mismas especies, esto porque los pacientes hospitalizados reciben más antimicrobianos y requieren mayores cuidados sanitarios que los pacientes infectados

por cepas no productoras de BLEE. [Garzón, Et al, 2004](#); [Yagüe, Et al, 2005](#); [Cercenado, 2011](#); [Guzmán, 2009](#)).

Es debido a esto que varios autores afirman que es necesario implementar las medidas para resolver y controlar la amenaza epidemiológica que estas bacterias representan para la población en general, tales como determinar la amplitud del problema a nivel comunitario y hospitalario, investigar la tendencia de las cepas resistentes y su distribución geográfica estableciendo con esto su asociación con brotes epidémicos, con lo que se lograría la implementación no solo de pruebas rápidas y adecuadas para la detección de BLEE por parte del laboratorio de bacteriología logrando una educación sanitaria como medida de control basada principalmente en campañas para concientizar a los médicos acerca de la prescripción adecuada de betalactámicos (tipo, vía, dosis intervalo de administración) especialmente en unidades críticas y de larga estancia, consulta de guías orientadoras y consensos de tratamiento, seguimiento de una política de antibióticos que debe ir enfocada en terapias antimicrobianas que erradiquen las cepas productoras de BLEE (formularios del hospital, rotaciones, terapia combinada, terapia secuencial, un comité de control de infecciones, etc.), tratamientos específicos por área hospitalaria que conlleven el uso adecuado de Cefalosporinas (en especial las de tercera generación), entre otras medidas ([Gobernado, 2005](#); [Navarro, Et al, 2005](#); [Cercenado, 2011](#)). Diversos autores señalan que la prevención de este tipo de infecciones radica principalmente en el seguimiento de las medidas de higiene conocidas y practicadas rutinariamente como son aislamiento del paciente en el caso de infección intrahospitalaria, así como la asepsia y lavado de manos del personal de salud, ya que esto evita la transmisión de estas cepas en el ambiente hospitalario ([Perozo, 2009](#); [Gobernado, 2005](#); [Castro, Et al, 2008](#); [Navarro, 2005](#); [Navarro, N. M., Et al, 2011](#)).

iii. Antecedentes históricos de la epidemiología de las BLEE

La primera enzima betalactamasa mediada por plásmidos en bacterias Gram negativas fue descubierta en 1960 y se denominó TEM, subsecuentemente una segunda enzima fue aislada y reconocida como betalactamasa, que al ser analizada de acuerdo a sus propiedades se observó que esta estaba relacionada fuertemente con la primera por lo

que se le denominó TEM-2, que difería de la inicial solamente en un aminoácido, cambio que se reflejó en el punto isoeléctrico de la enzima (Garcíadiego, 2011). La enzima TEM-1 fue detectada en un aislamiento de *E. coli* resistente a Ampicilina en 1965, pero pronto fue diseminada a todas las enterobacterias. En 1969 se detectaron enzimas TEM en *P. aeruginosa* y de 1973 a 1975 se encontraron en *H. influenzae*, *V. cholerae* y *N. gonorrhoeae*.

Este surgimiento se dio como consecuencia de la presión selectiva ejercida por la introducción de la Ampicilina, Carbenicilina y las primeras Cefalosporinas ya que se presume que su aparición fue a la par del uso de antibióticos betalactámicos que fueron creados con la esperanza de que fueran eficaces contra los aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* cuya resistencia a los betalactámicos era atribuible directamente a la producción de las betalactamasas plasmídicas TEM-1 y SHV-1. Posteriormente el análisis exhaustivo del uso de estos antibióticos, demostró que la resistencia se debía a la producción de una betalactamasa plasmídica transferible (exactamente SHV-2); estas enzimas se denominaron BLEE. Durante las décadas de los 80 y principios de los 90, la inmensa mayoría de las BLEE encontradas eran inicialmente del tipo TEM ó SHV habiéndose descrito hasta la fecha distintas derivadas de las betalactamasas iniciales TEM-1 y TEM-2 y SHV-1, sin embargo aunque en estas décadas se observó que la mayoría de los aislamientos eran productores de este tipo de betalactamasas, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países son las CTX-M (Garcíadiego, 2011; Casellas, Et al, 2005). En general se comparte la hipótesis de que la aparición de BLEE está asociada a la introducción y uso masivo de las Cefalosporinas de amplio espectro (como las parenterales) y el Aztreonam (Gobernado, 2005).

Otros autores afirman que en realidad el origen de las BLEE corresponde a un aislado conservado en el Centro de Estudios en Antimicrobianos en Buenos Aires en el año 1980 durante un estudio sobre el uso exclusivo de Amikacina en una institución hospitalaria realizado esto conjuntamente con investigaciones de fase III de Cefotaxima. Este fue también uno de los primeros casos documentados donde se hacía referencia a la primera enzima con resistencia a Cefalosporinas de tercera generación, la cual posteriormente se demostró que era productora de la BLEE de tipo SHV-5 (Casellas, Et al, 2005).

Las primeras betalactamasas capaces de hidrolizar oximino-Cefalosporinas fueron descritas por primera vez en Alemania en el año de 1983 (TEM-3, una variante de la betalactamasa TEM-2) en diferentes aislados microbiológicos de enterobacterias que presentaban resistencia a Cefotaxima y Ceftazidima (Cefalosporinas de más amplio espectro). Posteriormente se reportaron brotes de infección causados por estas cepas en Francia (en 1984, donde se descubrió una TEM-3 con fenotipo semejante), Europa y Estados Unidos (1988) (Seral, 2010; Camacho, Et al, 2004; Garciadiego, 2011; Casellas, Et al, 2005). Sucesivamente fueron identificadas ocasionalmente en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en el resto de Europa donde se detectaron BLEE tipo SHV y TEM en diferentes brotes epidémicos que surgieron de países como Italia, España, Bélgica y Portugal pertenecientes a enterobacterias como lo son *E. aerogenes* (portador de TEM-24), *E. cloacae* (productora de SHV-12, TEM-24 y TEM-116 en Portugal) y *P. mirabilis* (productora de TEM-24). Posteriormente estas betalactamasas fueron descritas en Taiwán donde además de presentarse una BLEE tipo SHV se describió la presencia de una betalactamasa tipo AmpC (Seral, 2010; Abarca, 2001). Fue en 1987 cuando el término betalactamasas de amplio espectro fue aplicado a este tipo de enzimas, después las palabras “amplio aspecto” fueron eliminadas por K. Bush en 1989, quien nombró a estas enzimas como betalactamasas de espectro extendido, esto al observar la capacidad de hidrólisis a Cefalosporinas a una velocidad de por lo menos 10% más en comparación con Bencilpenicilina (Garza, 2010).

Desde entonces, estos microorganismos se han descrito cada vez con más frecuencia en diferentes países del mundo, considerándose desde entonces como patógenos nosocomiales de vital importancia (Díaz, Et al, 2009; Fagundo, Et al, 2008; De Cueto, Et al, 2006; Navarro, 2005).

En 1989 se detectó un aislado clínico de *E. coli* con una enzima diferente a TEM y SHV, que se denominó CTX-M-1. Entre 1986 y 1992 aparecieron simultáneamente las primeras CTX-M en Japón, Alemania, Argentina, Italia y Francia (Seral, 2010; Truppia, Et al, 2005). En hospitales de Rusia CTX-M-3 y CTX-M-15 fueron debidamente identificadas. En Sudáfrica se encontró una diversidad de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE y se especuló que la producción de estas enzimas fue endémica corroborándose con estudios posteriores. Posteriormente en Europa y Etiopia se

descubrió la producción de una BLEE de tipo CTX-M-15 en *S. entérica* procedente de humanos y animales, codificadas en el cromosoma bacteriano y a partir de plásmidos conjugativos portadores del gen *bla* elemento importante para la codificación de BLEE señalado en párrafos anteriores. Es en este tipo de BLEE donde la evolución está generando un amplio rango de combinaciones que en la actualidad, son consideradas como las BLEE más ampliamente diseminadas en diferentes partes del mundo, siendo las más prevalentes en países de Europa y Sur América. Desde que se descubrió la primera CTX-M, se ha observado una rápida y extensa aparición de nuevos tipos de estas enzimas lo cual ha levantado diferentes alarmas epidemiológicas (Mantilla, Et al, 2009). Es importante señalar que una característica de la familia CTX-M que prevalece en Argentina y en otros países de América Latina es que su hidrólisis es dependiente en ciertos casos del inóculo de los diferentes betalactámicos (Casellas, Et al, 2005).

En 1991 en Turquía y más tarde en Francia, se detectaron por primera vez Oxacilinasas, que se demostró se inhibían débilmente por el Ácido Clavulánico pero que tenían un fenotipo similar al de las BLEE; resultando ser mutantes de la betalactamasas tipo OXA después de investigaciones posteriores. De este tipo de enzimas se han descrito 11 variedades y aunque principalmente son producidas por miembros del género *Pseudomonas*, también se han descrito en enterobacterias (Seral, 2010).

1) Europa

En general la prevalencia de BLEE en Europa es mayor que en Estados Unidos y menor que en Asia y Sudamérica, aunque se encuentran diferencias significativas en los distintos países europeos ya que el Reino Unido sigue siendo el país de este continente con una mayor prevalencia de aislados BLEE, igualmente es destacable la presencia de BLEE en países del norte y el este de Europa, Suecia, Noruega y Alemania, que tradicionalmente contaban con tasas inferiores al resto de los países europeos, tasas que actualmente ya se están igualando. En Europa se ha reportado recientemente la prevalencia de BLEE del 5% en *E. coli* y 22% para *K. pneumoniae* (Fagundo, Et al, 2008). Esto fundamenta el postulado de que algunos microorganismos que expresan ciertas enzimas están mejor adaptados a algunas áreas geográficas de este continente (Seral, 2010).

En Europa, en el informe del *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) que analiza cepas de origen invasivo, se observó un aumento significativo en la resistencia a Cefalosporinas de tercera generación provocado por el aumento de las BLEE (del 2,8% en 2006 al 4,3% en 2007), tendencia que continuó en 2008, ya que los datos del EARSS de este año indicaron un 8.6% de cepas bacteriémicas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE (Cercenado, 2011). El sistema de vigilancia SENTRY realizado en este continente denotó recientemente una prevalencia 22.6 y 5.3% en Europa para cepas *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE (Navarro, N. M., Et al, 2011).

2) España

Los primeros aislamientos bacteriológicos con BLEE reconocidos en España se detectaron en 1988 en dos hospitales de Madrid y correspondían a cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Durante la década de 1990 se describieron epidemias importantes en distintos hospitales españoles en las que estuvieron implicadas cepas de *K. pneumoniae*, *S. enterica* y *E. aerogenes* (Díaz, Et al, 2009).

En 1993 se reportó un brote epidémico causado por una cepa de *K. pneumoniae* productora de dos tipos de BLEE, que afectó a 145 pacientes, que fueron más de la mitad de los ingresados en una unidad de cuidados intensivos y que tardó tres años en erradicarse con las adecuadas medidas de tratamiento y prevención (Castro, Et al, 2008). En un estudio realizado entre 1994 y 1996 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona se observó que tan sólo un 0.2% de los aislados de *K. pneumoniae* y un 0.1% de los aislados de *E. coli* presentaban BLEE (Díaz, Et al, 2009). Los datos del estudio de vigilancia global SENTRY (aislamientos de 1997-1999) indican que la resistencia a los antimicrobianos tenía una prevalencia de 45% en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a Cefalosporinas de espectro extendido (Navarro, Et al, 2005).

Entre marzo y junio de 2000 se llevó a cabo el primer estudio nacional de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE (TEM-12, SHV-2 y CTX-M-9) del grupo de estudio de Infección Hospitalaria, del proyecto GEIH-BLEE 2000 el cual reveló unos porcentajes de cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* con producción de BLEE del 2.7 y del 0.5%, respectivamente, siendo el primer microorganismo mencionado, el mayor productor

de estas enzimas. Este estudio multicéntrico fue representativo ya que señaló la mayoría de las cepas de *E. coli* no estaban relacionadas clonalmente, mientras que en bastantes centros sí se observó el agrupamiento clonal de las cepas de *K. pneumoniae*. Además se encontró que las enzimas más frecuentemente identificadas fueron CTX-M-9, SHV-12 y CTX-M-14 en *E. coli*, y TEM-3 y TEM-4 en *K. pneumoniae* (Martínez, 2010). Inclusive este estudio informó que las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE eran un problema a nivel comunitario ya que reportó que el 51% de las cepas de *E. coli* y el 20% de *K. pneumoniae* productoras de BLEE eran procedentes de la comunidad externa, estableciéndose la importancia de estas enzimas no solo como a nivel nosocomial si no también en la comunidad (De Cueto, Et al, 2006; Díaz, Et al, 2009; Hernández, Et al, 2002). En el 2005 en Barcelona, se encontraron en dos periodos de estudio un 2.1% y 3.8% de prevalencia respectivamente, de enterobacterias BLEE positivas a partir de materia fecal humana de origen comunitario, lo cual fundamenta aun más lo anteriormente establecido (Navarro, Et al, 2005; Martínez, 2010).

En el año 2003 se reportaron diversos casos de presencia de BLEE causantes de infección intra abdominal. El estudio SMART del 2004 reportó que el 22% de las cepas de *Enterobacter* aisladas de infecciones intra abdominales producían BLEE (Casellas, Et al, 2005; Garcíadiego, 2011). Ahora en más del 90% de los hospitales españoles se detectan este tipo de enzimas en distintos sitios de infección.

En 2006, para comprender mejor la diseminación de los microorganismos productores de BLEE, se desarrolló un segundo estudio nacional en 44 hospitales con respecto a su producción por parte de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* (proyecto GEIH-BLEE 2006), donde se encontraron diferencias epidemiológicas reflejadas en un porcentaje de producción de BLEE de 4.04% y 5.04% para cada microorganismo respectivamente, demostrándose así una rápida diseminación de este tipo de enterobacterias, ya que la cifra fue 8 veces superior a la encontrada en un estudio previo realizado en 2000 (0.5%). En el caso de *K. pneumoniae*, los datos del mismo estudio multicéntrico realizado en 2006, muestran también un aumento 2 veces superior de cepas productoras de BLEE (5.04%, con un rango del 0 a 30%), respecto al estudio del año 2000 (2.7%). En *E. coli* se identificaron, sobre todo, BLEE de las familias CTX-M (73%) y

SHV (26%), con muy baja representación de TEM (1%). Como en el estudio del 2000, la SHV-12 fue la BLEE más frecuente del tipo SHV, pero entre las CTX-M predominaron CTX-M-14 y CTX-M-15/28. También en *K. pneumoniae* (y a diferencia de lo observado en 2000) predominaron las enzimas CTX-M. En este caso las enzimas frecuentemente identificadas fueron CTX-M-15 y SHV-12. El importante porcentaje de cepas de *E. coli* causantes de bacteriemia que producen BLEE (cerca al 9% en el segundo estudio multicéntrico del 2004) implicó la necesidad de reconsiderar el tratamiento empírico inicial en los pacientes que se sospeche una sepsis causada por esta especie (Martínez, 2010).

Cabe destacar que en este estudio la adquisición se consideró comunitaria en el 10%, relacionada con los cuidados sanitarios en el 18% y nosocomial en el 68%, con predominio de la adquisición en las unidades de cuidados intensivos. El aumento se debió a que las cepas aisladas de pacientes no hospitalizados y en su mayoría de origen urinario. Igualmente en el estudio se destaca que la adquisición de la cepa productora de BLEE fue comunitaria (Cercenado, 2011; Díaz, Et al, 2009). En ese mismo año en Sevilla se reportó, en el hospital Universitario Virgen Macarena, la presencia en un 64% de cepas de *E. coli* y 36% de *K. pneumoniae* productoras de BLEE en muestras no hospitalarias reafirmando lo propuesto por el proyecto GEIH-BLEE 2000, además se demostró que un alto porcentaje de estas cepas aisladas a partir del tracto urinario, eran productoras de diferentes tipos de BLEE como lo son de SHV-12 y CTX-M-14 demostrándose igualmente la continuidad de producción de la BLEE CTX-M-9 antes descrita (Díaz, Et al, 2009; De Cueto, Et al, 2006).

Proteus mirabilis en España ha presentado una notable producción y diversidad de enzimas BLEE (CTX-M-1, CTX-M-32 y VEB-4) con prevalencia que ha incrementado a lo largo de los años, esto de acuerdo a lo establecido en el estudio MYSTIC del año 2004, el cual informó de una prevalencia de BLEE en *P. mirabilis* se encontraba por debajo del 4%, siendo esta prevalencia en el 2006 de un 1.4%, de acuerdo a lo reportado por el proyecto GEIH-BLEE 2006. El estudio SENTRY anteriormente realizado afirmó que el 5.3% de las cepas de *P. mirabilis* son productoras de BLEE mientras que en Italia en infecciones urinarias extra hospitalarias, este microorganismo fue con más frecuencia

el productor de BLEE, siendo por tanto no solo un problema restringido a España (Casellas, Et al, 2005).

Diversos estudios españoles del 2004 al 2007 cifran en torno al 1-2% la prevalencia general de BLEE en enterobacterias, con predominio fundamentalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae* y aparición ocasional en otras enterobacterias (*K. oxytoca*, *P. mirabilis*, etc.), aunque algunas de las especies en las que este hallazgo es todavía infrecuente, como *Salmonella* muestran una tendencia ascendente. Igualmente se fueron publicados diferentes reportes de la prevalencia de BLEE en bacterias pertenecientes al género *Enterobacter* y *Citrobacter* por debajo del 4% en el 2004; presentándose el caso particular de un brote de *E. cloacae* productor de SFO-1 codificada en plásmido, considerado como el primer brote que se detecto fuera de Japón. Conjuntamente se ha observado la presencia de BLEE en aislamientos pertenecientes a *S.entérica*, en la cual se han hallado las enzimas CTX-M-15, CTX-M-10 y SHV-12. Posteriormente en el 2008 se reportó en este país un 30.8% de presencia de BLEE de tipo CTX-M-15 (Garcíadieago, 2011; Hernández, 2009).

3) Norteamérica

En América del Norte se registro una prevalencia de BLEE en *E. coli* de 7% y de *K. pneumoniae* del 12% (Fagundo, Et al, 2008). Existen reportes que indican que en esta región el 50% de las infecciones hospitalarias, y el 70% de las extra hospitalarias son tratadas con Cefalosporinas , lo que sugiere una fuerte presión selectiva en esta zona de América donde la prevalencia presenta variaciones marcadas de una región a otra, aunque se encuentra reportada una prevalencia general de 43.5% para *E. coli*, reportándose en el mismo periodo de tiempo del 5% en Argentina, hasta 63% en Perú y para *K. pneumoniae* se reportan rangos entre 26% en Ecuador y 73% en Chile (Garzón, Et al, 2004).

En Estados Unidos, la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE es de 0 a 25% dependiendo del hospital con una media nacional alrededor del 3%. Estudios epidemiológicos llevados a cabo en Europa y otras áreas geográficas revelan un aumento de la prevalencia y la dispersión en *E. coli* y *Klebsiella*. Actualmente se detectan sobre todo, en *E. coli* y en pacientes con infecciones contraídas en la

comunidad, produciéndose un flujo de aislados desde este ambiente al medio hospitalario (Navarro, Et al, 2005; Truppia, Et al, 2005; Seral, 2010). El sistema de vigilancia SENTRY informa una prevalencia de 7.6 y 3.3% en Estados Unidos para *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE respectivamente (Navarro, N. M., Et al, 2011). Las enzimas TEM-10, TEM-12 y TEM-26 son las más comunes en este país, pero el tipo de BLEE más predominante es la SHV (Garcíadiago, 2011).

En Canadá, recientemente se informó que la infección urinaria hospitalaria es donde se aíslan frecuentemente *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE (Navarro, N. M., Et al, 2011). Además en este país se realizó un estudio prospectivo sobre la importancia de *E. coli* productora de BLEE adquirida en la comunidad, lo cual reportó, además de los factores de riesgo asociados mencionados anteriormente, que las mujeres tenían mayor riesgo de adquirir la infección, así como pacientes residentes de lugares urbanos, o con comorbilidades como DM, enfermedad cardiaca, hemodiálisis, cáncer e incontinencia urinaria (Garcíadiago, 2011).

4) Latinoamérica

El programa SENTRY de vigilancia global de la resistencia a los antimicrobianos, reporto en el 2004 una prevalencia de 45% en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a Cefalosporinas de amplio espectro, en América Latina (Navarro, 2005). En la actualidad el sistema de vigilancia SENTRY informó una prevalencia de 45.0 y 8.5% en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE procedentes de América Latina (Navarro, N. M., Et al, 2011).

En Argentina se detectó la presencia de BLEE tipo SHV, PER-2 y CTX-M-2, esta última comprobada inicialmente en aislados recolectados en 1992, donde se encontraron cepas procedentes de un hospital pediátrico en el que 60% de las cepas de *K. pneumoniae* eran productoras de una BLEE, y un 81% de las cuales producían una enzima de punto isoeléctrico 7,9 compatible con CTX-M-2, BLEE que se ha demostrado que abunda actualmente en todos los países. En este mismo país se reportó en 1999 que las BLEE más prevalentes entre *K. pneumoniae* son las del tipo CTX-M-2, con un 62% de aislamientos productores, seguidas de PER-2 (12%), SHV-2 (11%), SHV-5 (10%) y combinaciones de ellas (5%). A sí mismo en Argentina se han realizado

investigaciones en las que se ha encontrado cepas de *E. coli* con el gen *bla*, distinguiéndose además cepas productoras de BLEE como colonizantes del tracto gastrointestinal de los neonatos, que aunque no constituyen un factor necesario para la aparición de la infección extra intestinal, aunado con factores del hospedero como son enfermedades asociadas, función gástrica, motilidad intestinal, tratamientos farmacológicos, etc., contribuyen en la instauración de infecciones por BLEE (Castro, Et al, 2008; Garciadiego, 2011; Casellas, Et al, 2005; Desimoni, Et al, 2004).

En un estudio realizado en Colombia en el Hospital San Jerónimo de Montería durante los años 2001 y 2002, se encontró que de 7 cepas de *E. coli* BLEE positivas, tres provenían de la UTI y de 17 aislamientos de *K. pneumoniae* BLEE positivas, 7 correspondieron a esta sala de UTI (Navarro, 2005; Martínez, 2003). En Lima, Perú se han reportado la presencia de BLEE en 2.9% y 44.4% de los aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, reportándose además en reservorios en el área de gineco-obstetricia en un 3.6% de *E. coli* productoras de BLEE (Rivera, Et al, 2008). En Chile se dispone de información sobre cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE, reportándose además la resistencia de *A. baumannii* a Cefalosporinas de tercera generación debido a la producción de enzimas del grupo AmpC, presentándose en un bajo porcentaje (10.1%) la producción de BLEE (Pino, Et al, 2007). Además de esto, el primer aislamiento clínico reportado en América Latina correspondió a un proceso infeccioso debido a *K. pneumoniae* en Santiago de Chile y se trató de la enzima SHV-5 (Casellas, Et al, 2005).

En un estudio realizado en Venezuela entre el 2002 y el 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 BLEE (Guzmán, 2009).

5) México

En el caso particular de México, son muy pocos estudios los que han reportado las características epidemiológicas de las BLEE, sin embargo se han realizado investigaciones en diversas zonas del país, como el efectuado por la Red de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en 1999 donde se reportó una prevalencia de 29.5% en

cepas de *K. pneumoniae* resistentes a Cefalosporinas de tercera generación (Navarro, Et al, 2005).

Este estudio retrospectivo mostró que desde los años 90 las BLEE se encontraron circulando en diferentes aislamientos clínicos causantes de infecciones nosocomiales y que han formado parte de brotes hospitalarios.

En un estudio realizado de 1990-1998 en diferentes ciudades (México, Villa Hermosa y Cuernavaca), se identificaron las BLEE SHV-2 y SHV-5 contenidas en diferentes de enterobacterias: *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*. Este último fue descrito en aislamientos clínicos obtenidos durante un brote intrahospitalario en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos en el hospital Niño Morelense, en Cuernavaca, Morelos, con lo cual se demostró que este microorganismo productor de BLEE estaba asociado a pacientes de menos de dos meses de edad, con cuadro clínico de bacteremia (Garza, 2010).

En este país se han reportado varios estudios que incluyen brotes causados por *K. pneumoniae* productora de BLEE con un fenotipo resistente a múltiples fármacos con altas tasas de morbilidad y mortalidad. El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) indicó una alta prevalencia de las enzimas SHV-2 y SHV-5, variantes de la familia SHV, reportadas en aislamientos de *K. pneumoniae* en un hospital pediátrico de la Ciudad de México (Alpuche, 2002; Garza, 2010). A su vez existen otros reportes que documentan altos índices de morbilidad y mortalidad, como es el caso del reporte de un brote de *K. pneumoniae* (SHV-5) en un hospital de Cuernavaca Morelos donde 62% de los 21 niños menores de 2 meses fallecieron a causa de una infección por BLEE.

En un estudio realizado en Sonora con cepas aisladas del 2002 al 2003 se reportó que 5% de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* eran productoras de BLEE, esto después de aplicar las respectivas pruebas confirmatorias a las cepas sospechosas que en este caso fueron un 5.8% de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Además de ser productoras de BLEE se observó que poseía una sensibilidad a Cefoxitina, lo que corrobora la no actividad de las BLEE contra las Cefamicinas. En este estudio además se encontró que la prevalencia de las cepas productoras de BLEE fue del 5%, el cual se encontraba por debajo del 29.5% reportada para México en 1999 en cepas de *K. pneumoniae*, esto a su

vez demostró un aumento aproximado del 50%. Así mismo, se reportó que 33% de las cepas productoras de BLEE fueron aisladas de la Unidad de Terapia Intensiva (UTI), por lo que consideraron la estancia en esta sala como un factor de riesgo (Navarro, Et al, 2005; Garza, 2010).

Posterior a este estudio en este mismo estado de la república se realizó una segunda detección de BLEE en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* en el periodo del 2008 al 2009, encontrándose que la mayoría de las cepas pertenecían a *E. coli* (83.9%) seguido de *K. pneumoniae* en un (16.1%), observándose una mayor prevalencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE hospitalarios que comunitarios. En este estudio se observó además que los productores de BLEE fueron aislados con mayor prevalencia de infecciones urinarias comunitarias (0.0-64.9%) y hospitalarias (0.0-50.0%), seguido de sangre (0.0-26.5%), piel y tejido blando (8.2-17.2%), éstas últimas de origen hospitalario. En este estudio se observó una alta sensibilidad a carbapenémicos. Se detectó un incremento de 18.4% en la prevalencia total de *E. coli* y de 25.4% para *K. pneumoniae* productoras de BLEE, en comparación con un estudio de prevalencia realizado de 2002 a 2003 (4.4 y 6.7% respectivamente) (Navarro, N. M., Et al, 2011).

También se ha reportado la diseminación e identificación de una betalactamasa autóctona (reportada únicamente en México) de un aislamiento de *E. coli* a partir del tracto urinario con mayor actividad contra la Cefotaxima denominada TLA-1 en honor a la cultura prehispánica de Morelos, que además ha tenido alta prevalencia de acuerdo a los estudios realizados por el Instituto Nacional de Salud Pública (Castro, Et al, 2008).

La propagación de la resistencia se ha identificado por clones endémicos y/o por un plásmido que alberga los genes de *bla_{SHV}* o *bla_{TLA-1}* que son las principales enzimas BLEE propagadas en hospitales mexicanos. En el hospital de Durango se reportó un brote en los servicios de pediatría y en la UCI neonatales donde se identificaron cepas BLEE (SHV-5 y TLA-1), reportándose también que el 72% de las cepas de *K. pneumoniae* nosocomiales aisladas de sangre y orina fueron resistentes a Cefotaxima (Fagundo, Et al, 2008; Navarro, Et al, 2005). En un estudio realizado en el estado de Guerrero, en el Hospital General de Acapulco, se destacó la presencia de betalactamasas TEM, SHV,

CTX-M y TLA-1 en base puntos isoeléctricos; considerando además que este fue el primer reporte de la presencia de BLEE tipo CTX-M en hospitales de México. Es importante mencionar que en México no existen reportes del hallazgo de cepas BLEE positivas a partir de muestras comunitarias (Castro, Et al, 2008; Navarro, Et al, 2005).

La prevalencia de BLEE en México ha sido reportada como alta ya que se han publicado reportes que manejan su frecuencia en un 28% en *E. coli* y 56% en *K. pneumoniae* en pacientes hospitalizados además de un 13% y 6% para pacientes ambulatorios respectivamente. Anteriormente *K. pneumoniae* era considerada la más frecuente, pero actualmente está siendo desplazada por *E. coli* sobre todo fuera del ámbito hospitalario, particularmente en la infección urinaria.

El Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS reporto 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 spp.*, *Enterobacter spp.* y *Pseudomonas spp.*, se ha encontrado estas cepas como las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales asociadas a una alta mortalidad. Particularmente se han reportado brotes por *K. pneumoniae* y *S. marcescens* multirresistentes en diferentes áreas geográficas del país (Fagundo, Et al, 2008; Navarro, Et al, 2005; Alpuche, 2002). Reportes recientes sobre las infecciones nosocomiales causadas por la enterobacterias productoras de este tipo de enzimas, se obtuvo que *K. pneumoniae* es la enterobacteria productora de BLEE de origen nosocomial con mayor frecuencia de aislamientos (56.0%) en hospitales mexicanos, seguida de *E. cloacae* (29.0%) y *E. coli* (15.0%) (Navarro, N. M., Et al, 2011; Silva, Et al, 2011).

En un estudio reciente de prevalencia, factores de riesgo y morbi-mortalidad asociada a infección por *E. coli* realizado en el centro médico ABC, se encontró que las infecciones causadas por este microorganismo tienen una prevalencia que va del 23.66% al 25.88%, que aumento del 2009 y 2010, lo que fue relacionado con el abuso en la terapia antimicrobiana por los profesionales de salud, poco control de estos antibióticos así como a su fácil acceso por la población (Garciadiego, 2011).

Recientemente en México se reporto la presencia de producción de BLEE en cepas de *S. marcesens* (Garza, 2010).

Cabe mencionar que si en algunos países de primer mundo se realizan estudios de este tipo, en nuestro país son poco comunes los programas de manejo de antibióticos y las tasas de infecciones por *E. coli* resistentes han aumentado en la última década. (Garcíadiego, 2011). Por lo cual es importante realizar este tipo de estudio para contribuir a la prevención como medio para contrarrestar el impacto epidemiológico y económico de la resistencia bacteriana y su modo de transmisión, para lo cual se deben instruir programas de control de infecciones y un sistema de vigilancia de resistencia a agentes antimicrobianos (Castro, Et al, 2008; Garzón, 2004; Alpuche, 2002).

6) Otros países

En Turquía, observó una prevalencia de un 21% en el aislamiento de *E. coli* productora de BLEE uropatógena comunitaria. En el presente estudio se detectaron *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE como causantes de diversas infecciones hospitalarias y comunitarias (Navarro, N. M., Et al, 2011).

6. Técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología

La correcta identificación en el laboratorio de microbiología de las BLEE es importante debido a que la producción de estas enzimas por los diferentes microorganismos varía entre los diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, por lo cual el laboratorio de microbiología debe estar preparado para reconocer de forma oportuna la presencia de BLEE, determinar su resistencia, dar alerta ante del fenotipo encontrado e iniciar un plan para el control de las infecciones causadas por estas bacterias, además de contribuir a la selección del tratamiento de los pacientes infectados y evitar principalmente fracasos en la terapia antimicrobiana (Pujol, 2003), teniendo además beneficios en la calidad de vida de los pacientes como son la disminución de la estadía hospitalaria y disminución de los costos (Álvarez, 2010; Castro, Et al, 2008; Fagundo, Et al, 2008; Prats, 2005).

Los métodos de detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituyen varios métodos fenotípicos, bioquímicos, genotípicos y bioensayos, que en general comienzan por una adecuada interpretación de los perfiles de sensibilidad aplicando los criterios habituales de lectura del antibiograma por el CLSI, sin embargo en algunas bacterias las técnicas de difusión o dilución convencionales no son suficientemente sensibles, esto aunado con las limitaciones que presentan las BLEE con respecto a los criterios habituales de sensibilidad. Por lo tanto se deben elegir métodos de confirmación apropiados basados en la inhibición de estas enzimas y en la prueba de al menos dos sustratos (Cefalosporinas de tercera generación, de acuerdo a la CLSI) para detectar enzimas con baja actividad hidrolítica contra alguno de estos antibióticos y además, añadir Cefepima y carbapenémicos. En el presente apartado se describen las pruebas con su respectivo fundamento y metodología, que se emplearon para la detección de BLEE en las cepas del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México Federico Gómez; por lo que el resto de metodologías, que se encontraron en la investigación respectiva y que forman parte de las diversas pruebas para detección y confirmación de cepas productoras de BLEE, se encuentran descritas en el [Anexo I al VII](#).

La detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica y esto viene condicionado por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o ausencia de otros mecanismos de resistencia ([Navarro, N. M., Et al, 2011](#)). Por tanto el laboratorio de microbiología se enfrenta a dos retos, por una parte, el elevado número de BLEE que se han descrito hasta la actualidad y por lo tanto, la posibilidad de que una misma cepa origine diferentes tipos de estas enzimas, cuyas diferencias fenotípicas pueden ser muy sutiles (por ejemplo CTX-M y SHV), por lo que los fenotipos pueden variar respecto a los esperados complicando la interpretación. Por otro lado, la posibilidad de encontrar cepas de enterobacterias que producen enzimas que no deben ser consideradas estrictamente como BLEE, como las cepas de enterobacterias productoras de AmpC que como se vio anteriormente, en casos de hiperproducción pueden parecerse fenotípicamente a las BLEE. Recientemente varios autores han recomendado utilizar inhibidores de AmpC así

como pruebas complementarias, en aquellos microorganismos que lo requieran para evitar un mal diagnóstico (Castro, Et al, 2008).

Es necesario señalar que no existe una metodología que reúna sensibilidad, especificidad y sencillez, dada la complejidad de la detección de las BLEE y sus variantes, por lo que varios autores recomiendan una adecuada interpretación de las pruebas confirmatorias y la elección del método de confirmación óptimo para cada laboratorio (Seral, 2010).

Existen métodos estándar de acuerdo a la CLSI para la detección de BLEE en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *K. oxytoca* y *P. mirabilis* ya que este comité recomienda la confirmación de la producción de este tipo de enzimas, sin embargo, para el resto de *Enterobacteriaceae* y no fermentadores, no existe estandarización de los métodos para la detección de las BLEE, por lo que es difícil detectar y reportar BLEE con esos microorganismos constituyendo un problema aun no resuelto. A sí mismo, existen notables diferencias entre las BLEE prevalentes que varían de región a región geográfica por lo cual es necesario evaluar la capacidad de los distintos métodos para detectar las BLEE presentes en cada región (Seral, 2010; Álvarez, 2010; Martínez, 2007; Garcíadiago, 2011). En otros países como en la India, donde se comparo el método de sinergia de doble disco y el método tridimensional se llegó a la conclusión de que el último de ellos dio 93% de sensibilidad frente al 85% del primero. En Bélgica, se comparo en setenta aislamientos clínicos de *E. coli* y *Klebsiella spp*, por tres métodos de tamizaje para la detección y prevalencia de BLEE: por el método de doble disco, método tridimensional y E-test-BLEE, en este caso se concluyo que la sensibilidad de las pruebas fue de 96,9%, 90,6% y 81,2%, respectivamente. El método americano es el más utilizado para la detección de BLEE, ya que sigue las recomendaciones del CLSI, entidad que recomienda el empleo de sus técnicas estandarizadas como métodos de referencia en base a su buena sensibilidad y especificidad, reafirmado por diferentes estudios (Lazameta, 2010).

El reto está en identificar los biomarcadores que, incorporados en pruebas de laboratorio de diagnóstico microbiológico clínico, rápidamente conduzcan no sólo a la identificación del agente causante de la infección, sino que también detecten los

mecanismos de resistencia que se están expresando en la bacteria, de tal forma que se pueda diseñar una terapia antibiótica certera y oportuna y, desde luego, que estas pruebas sean económicamente viables para ser utilizadas masivamente (Celis, Et al, 2009).

a) Métodos fenotípicos iniciales

Su detección se basa en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las Cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos; es decir se fundamenta en la resistencia que confieren contra estos sustratos. Otra de las características fenotípicas empleada para la detección de estas enzimas es que son inhibidas por el Ácido Clavulánico (ó Clavulanato) que bloquea su resistencia permitiendo la acción de los antibióticos probados observable en el aumento de los halos de inhibición. La prueba fenotípica para confirmar *in vitro* la producción de una BLEE según la CLSI se basa en la observación del efecto antibiótico potenciado para Cefotaxima y Ceftazidima en presencia de Ácido Clavulánico, pruebas que requieren como mínimo 48 horas desde que el producto patológico llega al laboratorio. Desde la década de 1980 se han publicado diferentes protocolos por parte de la CLSI con las respectivas pruebas fenotípicas que exploran estas características las cuales se han ido actualizando a lo largo de los años presentando distintas variaciones en cuanto a los puntos de corte de acuerdo a la tendencia de las cepas y las diversas variaciones de las BLEE, a pesar de ello, todos estos señalamientos indican que la aplicación de cualquiera de las pruebas debe ir precedida de un riguroso análisis (Navarro, F., Et al, 2011; Seral, 2010; Garciadiego, 2011), ya que diferentes tipos de BLEE confieren un grado de resistencia variable y la intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, pudiendo incluso no tener efecto fenotípicamente detectable en algunos casos en los que únicamente tiene lugar un aumento de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) permaneciendo en el intervalo de sensibilidad concreto (Perozo, 2009).

b) Susceptibilidad a agentes antibacterianos por difusión en agar

De acuerdo a lo señalado por varios autores, el inicio de las pruebas de detección de BLEE incluye el que todas las cepas a analizar deben ser sometidas a una serie de

ensayos para su correcta identificación lo cual puede realizarse por métodos manuales (como API 20E) o por medio de sistemas de identificación (como Vitek ó Phoenix) (Díaz, Et al, 2009; De Cueto, Et al, 2006). Las cepas pueden mantenerse a -70°C en una mezcla de caldo Luria Bertoni (LB) y glicerol antes de su análisis o si se prefiere pueden ser mantenidas en caldo tripticasa-glicerol (2:1) a la misma temperatura ó en caldo BHI con glicerol a -20°C (Pino, Et al, 2007; Navarro, Et al, 2005; Espinal, Et al, 2004).

El tamizaje inicial incluye la aplicación de pruebas de susceptibilidad rutinarias mediante el método de Kirby-Bäuer siguiendo los lineamientos del CLSI (Perozo, 2009; Piersigilli, Et al, 2009). Las cepas reconstituidas se hacen desarrollar toda la noche en Agar Nutritivo 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 varias cajas de agar Müeller-Hinton para colocar posteriormente los sensidiscos con los siguientes antibióticos: Cefpodoxima (10 µg/disco), Ceftazidima (30 µg/disco), Cefotaxima (30 µg/disco), Cefepima (30 µg/disco), Ceftriaxona (30 µg/disco), Imipenem (10 µg/disco), Meropenem (10 µg/disco), Cefoxitina (30 µg/disco) y Aztreonam (30 µg/disco) (Mantilla, Et al, 2008; Gaitán, 2009). Adicionalmente se pueden incluir discos de otros antibióticos como son: Ampicilina (10 µg/disco), Amoxicilina, Gentamicina (10 µg/disco), Cefalotina, Trimetoprim/Sulfametoxazol (23.75/1.25 µg/ml por disco), Amikacina (30 µg/disco), Ciprofloxacina (5 µg/disco), Nitrofurantoína (300 µg/disco) y Piperacilina-Tazobactam (110 µg/disco) (Seral, 2010; Álvarez, 2010; Pino, Et al, 2007; Trupia, Et al, 2005; Sánchez, 2004). Las cajas se incuban por 24 horas a $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y la resistencia o sensibilidad de los microorganismos se interpreta comparando la medida de los diámetros de los halos de inhibición con tablas preestablecidas por la CLSI (Espinal, 2004; Desimoni, 2004; Sánchez, 2004; Bertona, Et al, 2005).

Ante una cepa de una bacteria gram negativa con CMI elevada para las Cefalosporinas de tercera generación con respecto a lo esperado para dicha cepa (disminución de la sensibilidad a uno ó más de los antimicrobianos probados), o ante un hallazgo de multirresistencia en las pruebas de sensibilidad, es prioritario descartar la presencia de BLEE según los criterios recomendados por CLSI, que señala que una cepa es

sospechosa de producción de BLEE 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: Cefpodoxima ≤ 17 mm, Ceftazidima ≤ 22 mm, Aztreonam ≤ 27 mm, Cefotaxima ≤ 27 mm y Ceftriaxona ≤ 25 mm en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*; y diámetros de: Cefpodoxima ≤ 22 mm, Ceftazidima ≤ 22 mm, y Cefotaxima ≤ 27 mm en el caso de *P. mirabilis*. Utilizando estos puntos de corte modificados, pueden reconocer 98% de las bacterias productoras de BLEE, Ceftazidima 91%, Cefotaxima 80% y Ceftriaxona 79% (Seral, 2010; Lazameta, 2010; Perozo, 2009; Famiglietti, Et al, 2005; Camacho, Et al, 2004; Pujol, 2003).

Para el control de calidad de esta prueba varios autores recomiendan usar las cepas de *E. coli* ATCC 25922 no productor de BLEE, *E. coli* ATCC 35218 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 productor de BLEE (Seral, 2010; Sánchez, Et al, 2008). Pudiendo incluir también como cepas control a microorganismos como *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (susceptible a Imipenem) (Pino, Et al, 2007; Casellas, Et al, 2005; González, Et al, 2007; Gaitán, 2009).

c) Métodos fenotípicos de confirmación de BLEE

Con base a las recomendaciones actuales de la CLSI, las cepas que presentan halos de inhibición sospechosos para uno o varios de los antibióticos anteriores, se deben someter a las pruebas de confirmación recomendadas las cuales exploran la sensibilidad a Cefotaxima y Ceftazidima con/sin Ácido Clavulánico mediante difusión en agar con discos o Microdilución en caldo (Navarro, Et al, 2005). Entre las pruebas fenotípicas, destacan las técnicas que emplean la difusión con sensidiscos en las que la presencia de una BLEE se sospecha no solo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico producido entre las Cefalosporinas de amplio espectro o los monobactámicos y el Ácido Clavulánico, cuando previamente se han situado de forma estratégica los discos (Navarro, N. M., Et al, 2011).

Cabe mencionar que la mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE se han diseñado para *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y recientemente para *P. mirabilis*, sin embargo, no se debe menospreciar la

presencia cada vez mayor de BLEE en enterobacterias que a su vez son productoras de betalactamasas cromosómicas, entre ellas se encuentra la betalactamasa K1 de *K. oxytoca*, la SHV-1 de *K. pneumoniae* y las Cefalosporinas as CepA de *P. vulgaris* y *P. penneri*; ó para los productores de AmpC, cuya incidencia está creciendo y que no son consideradas en las recomendaciones para el cribado de posible producción de BLEE por la CLSI (Seral, 2010; Navarro, N. M., Et al, 2011). A pesar de esto los criterios establecidos por la CLSI han sido validados, encontrándose una buena sensibilidad y especificidad, superior al 90%, pero que puede variar dependiendo del análisis o de la prevalencia de cepas con BLEE (Garcíadiago, 2011).

i. Difusión en agar con discos combinados ó Método del doble disco con y sin inhibidor

Esta prueba se emplea para confirmar los resultados obtenidos por el método de difusión del disco en agar; para ello se utilizan sensidiscos impregnados con las diferentes Cefalosporinas y un inhibidor de β -lactamasas (Camacho, Et al, 2004).

Para una detección más eficiente se requiere un medio sólido (placa de agar Müller-Hinton) inoculado con una suspensión bacteriana según la metodología anterior, sobre la cual se sitúan los discos de Cefotaxima (30 μ g/disco), Cefepima (30 μ g/disco), Ceftriaxona (30 μ g/disco), Ceftazidima (30 μ g/disco), y otros discos con los mismos antibióticos adicionados de Ácido Clavulánico (10 μ g/disco) ó Clavulanato de litio (5 μ g/disco) (Casellas, Et al, 2005). En esta prueba puede emplearse también los mismos sensidiscos con antibióticos pero a cada uno se le añade 10 μ l de una solución de Clavulanato De Potasio (1.0 mg/ml) ó Clavulanato de litio, metodología que no se encuentra estandarizada por la CLSI pero que ha sido probada por diversos autores, los cuales afirman la obtención de resultados semejantes a lo establecido (Perozo, 2009). Después de la incubación por 24 horas a 35°C \pm 1°C, se miden los respectivos diámetros de inhibición producidos en cada sensidisco (Casellas, Et al, 2005). Actualmente pueden emplearse sensidiscos comerciales que contienen la Cefalosporina y el inhibidor de betalactamasas integrados como son: Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30 mg/10mg), Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30/10 mg), Cefpodoxima/Ácido Clavulánico (10/10 mg); los cuales facilitan la aplicación manual de esta prueba (Famiglietti, Et al,

2005). Otra opción es el empleo de cuatro discos combinados comerciales: Cefpodoxima/Ácido Clavulánico (10/1 µg), Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30/10 µg), Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30/10 µg) y Cefpiroma/Ácido Clavulánico (30/7.5 µg) cuya interpretación es igual a los criterios de la CLSI (Camacho, Et al, 2004; Bertona, Et al, 2005). Se confirma la presencia de una BLEE cuando la sensibilidad a cualquiera de los antibióticos en presencia de Ácido Clavulánico aumenta mayor o igual a 5mm el diámetro de inhibición respecto al halo de inhibición con la Cefalosporina sola (sin la adición de Ácido Clavulánico) evaluada anteriormente. Esto en base a lo que se tiene como definición de BLEE, ya que se encuentra estipulado que estas enzimas pueden ser inhibidas por este antibiótico, permitiendo la inhibición del crecimiento de estos microorganismos por parte de las oximino cefalosporinas como Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima y el Aztreonam (Seral, 2010; Fagundo, Et al, 2008; Lezameta, Et al, 2010). Debe considerarse que en general la Ceftazidima detecta más eficientemente las BLEE derivadas de TEM, SHV y PER-2, mientras que Cefotaxima aumenta la sensibilidad de la técnica para detectar mejor las de tipo CTX-M (Álvarez, 2010; Seral, 2010; Famiglietti, Et al, 2005; Garciadiego, 2011). Recientes investigaciones señalan que la Cefepima seguida de Ceftazidima y Cefotaxima son los mejores indicadores de BLEE (Pino, Et al, 2007; Piersigilli, Et al, 2009; Álvarez, 2010; Trupia, Et al, 2005). Para el control de calidad de esta prueba se recomienda utilizar la cepa de *E. coli* ATCC 25922 (no productor de BLEE) sensible a todos los antibióticos (Seral, 2010).

d) Sistemas automatizados para la detección de BLEE

i. Vitek y MicroScan

Los equipos automatizados Vitek 2 (tarjeta ID-GN), MicroScan WalkAway, y Sensitire, son capaces de detectar BLEE considerando a estas cepas como reportes presuntivos puesto que cuentan con paneles adicionales para su confirmación que incrementan el costo y el tiempo empleado en esta determinación lo cual demora hasta un día más de proceso; sin embargo el resultado reportado se obtiene de forma más rápida que los métodos manuales antes mencionados (Fagundo, Et al, 2008). El sistema Vitek es una prueba de Microdilución que puede detectar BLEE de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. La prueba emplea los antibióticos Cefotaxima y Ceftazidima solos en una

concentración de 0.5 mg/ml y cada uno de los antibióticos en combinación con Ácido Clavulánico en una concentración de 0.4 mg/ml. Esta prueba detecta sólo las BLEE que son susceptibles al Ácido Clavulánico. La resistencia en los pozos de Microdilución con Ceftazidima y Cefotaxima solas y la susceptibilidad en los pozos con la combinación indican una BLEE. La prueba ha demostrado poseer una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98% (Morfin, 1999).

Existen reportes del uso de MicroScan ESBL plus como sistema para las pruebas de susceptibilidad (Garzón, et al, 2004). Este sistema contiene concentraciones dobles seriadas de: Amikacina (4-32 µg/ml), Ampicilina/Sulbactam (8/4-16/8 µg/ml), Ampicilina (8-16 µg/ml), Aztreonam (8-16 µg/ml), Cefazolina (4-16 µg/ml), Cefepima (2-16 µg/ml), Cefotaxima (4-32 µg/ml), Cefotetan (16-32 µg/ml), Ceftazidima (2-16 µg/ml), Ceftriaxona (8-32 µg/ml), Cefuroxima (4-16 µg/ml), Ciprofloxacina (1-2 µg/ml), Gentamicina (1-8 µg/ml), Imipenem (4-8 µg/ml), Levofloxacina (2-4 µg/ml), Meropenem (4-8 µg/ml), Moxifloxacina (2-4 µg/ml), Piperacilina/Tazobactam (8/4-16/4 µg/ml), Ticarcilina/Ácido Clavulánico (16/2-64/2 µg/ml), Tobramicina (1-8 µg/ml), Trimetoprim/Sulfametoxazol (2/38 µg/ml) (Sánchez, 2008). La prueba confirmatoria con paneles de Microdilución del sistema MicroScan ESBL Plus Dried ESBL Confirmation con dilución para Cefotaxima y Ceftazidima solos y en combinación con Ácido Clavulánico. Este test ha presentado una sensibilidad del 97.3% y especificidad de 90.1% (Sánchez, 2008; Yagüe, Et al, 2005).

e) Reporte de resultados de las pruebas de detección de producción BLEE

El grado de hidrólisis frente a Cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactámicos puede variar según el tipo de BLEE y el nivel de producción, pudiendo aparecer sensibles *in vitro* a algunos de estos antibacterianos (Navarro, N. M., Et al, 2011). El CLSI antes del año 2010 recomendaba informar las cepas con fenotipo de BLEE como resistentes a Penicilinas, Cefalosporinas y Aztreonam indistintamente de los resultados *in vitro* de la CMI o del halo de inhibición (Seral, 2010; Castro, Et al, 2008; Famiglietti, Et al, 2005; ; Navarro, 2005; Camacho, Et al, 2004), esto ya que anteriormente se sostenía que el tratamiento con Cefalosporinas poseía discrepancias en la relación *in vivo/in vitro*, ya que se observó que algunos de estos antibióticos

aparentemente activos *in vitro*, se acompañaban de una tasa variable de fracaso dependiendo de la CMI (Gobernado, 2005). Mientras que el EUCAST recomendaba antes del 2010 que ante la sospecha de una BLEE en cualquier enterobacteria por lectura interpretada del antibiograma (excepto *K.* y *C. koseri*), se confirmará la presencia de la BLEE e interpretar el resultado sensible o resistente un resultado intermedio con base a la aplicación de pruebas adicionales de susceptibilidad a los antibióticos probados (Seral, 2010). En el año 2010 ambos comités modificaron los puntos de corte de las Cefalosporinas Cefotaxima, Cefepima y Aztreonam basándose en estudios de farmacocinética y farmacodinamia, efectuando a su vez una nueva recomendación consistente en informar la sensibilidad de los aislados con BLEE según los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad *in vitro* independientemente del mecanismo de resistencia (Navarro, N. M., Et al, 2011). A pesar de la disminución de los puntos de corte, que parecen dar una buena predicción de la evolución clínica al tratamiento, sigue existiendo discusión sobre la influencia del inóculo bacteriano entre otras cuestiones, por lo tanto, la decisión de seguir esta recomendación dependerá de los criterios locales atendiendo a aspectos epidemiológicos y de política de antimicrobianos así como la obtención de estudios clínicos que aseguren la eficacia terapéutica de estos antibióticos en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias productoras de BLEE en diferentes situaciones clínicas (Navarro, N. M., Et al, 2011).

7. Tratamiento BLEE

La diseminación de la resistencia a las Cefalosporinas de espectro extendido por parte de las BLEE limita aún más el uso de los betalactámicos y estimula el uso de antibióticos más costosos y de mayor espectro, ya que al ser estas bacterias resistentes a las Penicilinas y Cefalosporinas (incluidas las de tercera y cuarta generación) hace que el tratamiento de las infecciones por cepas productoras de BLEE (en especial las nosocomiales) posean limitadas opciones terapéuticas (Álvarez, 2010; Cercenado, 2011; Garcíadiego, 2011). En diferentes centros de salud a nivel mundial se han encontrado infecciones difíciles de controlar generadas por la presencia de BLEE, lo que ha elevado la tasa de mortalidad de diferentes tipos de pacientes implicando un importante reto terapéutico (Cercenado, 2011; Castro, Et al, 2008; Guzmán, 2009).

La detección precoz de enterobacterias productoras de BLEE es de gran interés debido a las múltiples ventajas que le proporcionan al paciente ya que al no ser detectadas fácilmente por los procedimientos microbiológicos de rutina, conllevan un tratamiento empírico inicial demorando la administración del antibiótico idóneo, lo que conduce a una peor evolución asociada con fracaso terapéutico, que en el mejor de los casos consiste en más días de hospitalización y mayor coste aunado a fallas terapéuticas, y en el peor de los casos conduce a la muerte del paciente. Parece evidente que la evolución de los pacientes con infecciones por cepas productoras de BLEE mejora si se administra un tratamiento empírico adecuado y precoz (Romero, Et al, 2009; Álvarez, 2010; Cercenado, 2011; Navarro, N. M., Et al, 2011).

Teniendo en cuenta la múltiple resistencia antibiótica de las bacterias productoras de BLEE, siempre que se sospeche su presencia o esté documentada, los antibióticos a emplear como principal opción terapéutica son los carbapenémicos (Casellas, Et al, 2005; Navarro, N. M., Et al, 2011), que son antibióticos resistentes intrínsecamente a las BLEE debido a su grupo químico 6-hidroxi-etil en posición *trans*, lo que se asocia a su éxito terapéutico (Castro, Et al, 2008). El tratamiento de elección es Imipenem, ya que se ha demostrado la susceptibilidad de aproximadamente 100% de los aislados clínicos con presencia de BLEE, particularmente los conformados por *E. coli* y *K. pneumoniae*, con lo cual se rectifica su acrecentada actividad que evade la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana. Otra opción es el Ertapenem, que también es uno de los agentes más recomendables frente a microorganismos productores de BLEE (Cercenado, 2011; Garcíadiego, 2011; Navarro, 2005).

En un documento consenso elaborado por cinco sociedades científicas españolas sobre el tratamiento de la infección intra abdominal, con etiología mixta (bacterias aerobias y anaerobias) incluyendo la infección por cepas productoras de BLEE, se considero a los Carbapenémicos, como una de las buenas opciones para el tratamiento antibiótico en todo tipo de estas infecciones. Igualmente el Carbapenémico Ertapenem es un medicamento recomendado ante la infección adquirida en la comunidad, leve o moderada, en enfermos con o sin factores de riesgo asociados. No obstante se recomienda el uso de Imipenem o Meropenem como tratamiento a infecciones comunitarias graves o nosocomiales en enfermos inmunodeprimidos o que hayan

recibido terapia antibiótica previa. Igualmente estos últimos Carbapenémicos también pueden emplearse como tratamiento contra la peritonitis terciaria asociados a glucopéptidos o Linezolid, con o sin Fluconazol (Gobernado, 2005).

Recientemente se ha demostrado que el uso de los antibióticos Carbapenémicos en la práctica clínica debe ser especialmente juicioso, primero porque constituye casi la única terapia eficaz frente a las BLEE y segundo porque su uso indiscriminado puede inducir la producción de carbapenemasas en cepas de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y bacilos gram negativos no fermentadores como lo son *Acinetobacter spp.*, *S. maltophilia* y *Pseudomonas spp.*, que se consideran multirresistentes. Inclusive, ya se han descrito casos de cepas productoras de BLEE que (sin tener una carbapenemasa específica) son resistentes a carbapenémicos como es el caso de los microorganismos que producen SHV-38, que además tiene una débil actividad carbapenemasa que produce moderados incrementos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Imipenem. Igualmente, en cepas de *K. pneumoniae* productoras de SHV-2, se observó una disminución de la sensibilidad a Imipenem, la cual fue atribuible a la deficiencia en porinas, lo que además fue demostrado experimentalmente con el empleo de un inóculo pesado. Igualmente la producción de diversas CTX-M en cepas que carecen de porinas también ha sido documentada como causa de resistencia a carbapenémicos, en especial a Ertapenem (Navarro, N. M., Et al, 2011; Martínez, 2011; Martínez, 2007). Conjuntamente se ha evidenciado que en Latinoamérica existen elevadas tasas de resistencia asociada a Carbapenémicos al igual que en Europa, Asia, Estados Unidos y Sudamérica lo que sugiere un reciente problema global (Fagundo, Et al, 2008).

La coincidencia de otros mecanismos de resistencia ocasiona que muchas cepas productoras de BLEE sean resistentes a las combinaciones, como Amoxicilina-Clavulánico o Piperacilina-Tazobactam (que serían activos ante la capacidad del inhibidor para bloquear la BLEE). No obstante, se encuentra documentado que el uso de los betalactámicos administrados junto a inhibidores de las betalactamasas, por su estabilidad a la acción de las BLEE, pueden ser considerados como opción terapéutica solo en algunos casos, sobre todo la Amoxicilina/Clavulanato cuyo uso clínico debe establecerse con base en los resultados del antibiograma. Esta combinación es una

buena opción para el tratamiento de las infecciones urinarias por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, siempre y cuando sean sensibles, ya que no es infrecuente la resistencia a esta combinación por producción simultánea de otras betalactamasas, alteraciones, o en menor medida, la hiperproducción de la propia BLEE (Garcíadiego, 2011; Martínez, 2011; Hernández, Et al, 2009). Sin embargo se debe considerar que a pesar de que estas combinaciones pueden ser activas *in vitro*, su eficacia clínica es discutida y depende de la localización de la infección, particularmente cuando el microorganismo se encuentra en altas concentraciones (Famiglietti, Et al, 2005; Garcíadiego, 2011). Aunque esta documentada la sensibilidad *in vitro* de las cepas productoras de BLEE a Cefoxitina, una Cefamicina, su uso para el tratamiento de este tipo de infecciones no es aconsejable, debido a que la resistencia a este antibiótico aparece rápidamente por la posible mutación en las porinas a través de las cuales entra el antibiótico; por consiguiente las Cefamicinas podrían representar una opción terapéutica para cepas con BLEE que carecen de la producción de enzimas de tipo AmpC o que expresan esta enzima a muy bajo nivel (Navarro, 2005; Garcíadiego, 2011; Matinez, 2011).

En cuanto al uso de antibióticos no betalactámicos para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE, es preciso tener en cuenta la frecuente coexistencia de resistencia a otros antimicrobianos anteriormente mencionada. Este es el caso de las infecciones urinarias producidas por cepas de *E. coli* productoras de BLEE, que en general son multirresistentes, pero que en el caso de ser no complicadas, es posible recurrir al uso de antibióticos para los cuales no se ha reportado resistencia cruzada en cepas con BLEE como son la Fosfomicina (ácido 1,2-epoxipropilfosfónico) y la Nitrofurantoína (Garcíadiego, 2011). En el caso particular de este antibiótico, en un estudio realizado en España se demostró que el 94.4% de las cepas de *E. coli* productor de BLEE fueron sensibles a Fosfomicina, sin embargo, su empleo también requiere ser analizado, ya que la Fosfomicina muestra limitaciones con respecto a *K. pneumoniae*, contra las que tiene peor actividad en comparación con *E. coli*, frente infecciones del tracto urinario no complicadas (Hernández, Et al, 2009).

Planteamiento del Problema

La resistencia de cepas de enterobacterias productoras de BLEE ha sido asociada a sus diversos mecanismos de transmisión en base de diversos elementos genéticos; lo que contribuye a su diseminación. La producción de este tipo de enzimas en diferentes especies y géneros de bacterias ha tenido un aumento importante en diferentes países de Europa, Asia, Norteamérica y Latinoamérica principalmente, convirtiéndose en un problema de atención epidemiológica que debe ser estudiado por área geográfica por las diversas implicaciones clínicas y terapéuticas que conllevan las distintas cepas y los diferentes tipo de población.

En México se ha reportado recientemente una elevada prevalencia de infecciones causadas por enterobacterias productoras de BLEE, como *K. pneumoniae* y *E. coli*, entre otros géneros bacterianos, que se relacionan con el aumento de morbilidad y mortalidad de este tipo de infecciones en los últimos años. Sin embargo han sido limitados los estudios encargados de dilucidar la problemática que representan la producción de BLEE en el ambiente de diversos hospitales. Esta situación es desconocida en el Hospital Infantil de México, donde asiste una gran cantidad de pacientes de diversos puntos geográficos del país, lo que convierte a esta área como un punto de interés epidemiológico.

Justificación

En nuestro país existen limitadas investigaciones epidemiológicas de la problemática que representan este tipo de infecciones en la población mexicana, por lo que no se ha definido por completo la prevalencia de esta enfermedad, especialmente en la población pediátrica, que en general es más propensa a adquirir este tipo de microorganismos con dicho mecanismo de resistencia.

La importancia de realizar estudios de prevalencia en México radica en la creciente necesidad de implementar medidas de control, instruir programas de control para el uso adecuado de antibióticos, así como sistemas de vigilancia de resistencia a antibióticos betalactámicos.

En general contribuiría a planificar los servicios sanitarios y promover la prevención por parte del personal de salud para contrarrestar el impacto tanto epidemiológico y económico de la resistencia bacteriana proporcionada por las BLEE. La prevalencia como índice de morbilidad en la población pediátrica en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, sería un marcador para conocer el impacto de este tipo de infecciones a nivel comunitario y nosocomial, permitiendo anticiparse a los cambios que tengan impacto en la infecciones provocadas por enterobacterias productoras de BLEE y proyectar la realización de proyecciones futuras acciones, obteniendo la prevalencia que permite apreciar la frecuencia de este tipo de infecciones y su proporción en una población conjunta que asiste a los diversos servicios hospitalarios.

La prevalencia podrá proporcionar la información fundamentada en análisis epidemiológicos que serán de utilidad al personal médico dando el valor predictivo de las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos. La aplicación de pruebas diagnósticas a pacientes con una mayor probabilidad de sufrir una infección por cepas de enterobacterias productoras de BLEE constituyen una ventaja para el personal médico, fundando la importancia de la realización de estas pruebas implicadas en la dilucidación de la entidad etiológica, aumentando a su vez el rendimiento de dichas pruebas, optimizando de los costos hospitalarios como consecuencia de la adecuada solicitud de este tipo de ensayos.

El presente estudio de prevalencia tiene la finalidad de obtener el panorama actual de este tipo de infecciones, proporcionando la frecuencia de la enfermedad, las especificidades por servicio hospitalario, las características de los pacientes pediátricos y la proporción de los microorganismos implicados, permitiendo dilucidar el panorama general de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE; generando consecutivamente vez diversos planteamientos sobre posibles relaciones causales y factores de riesgo, diferentes hipótesis experimentales para la investigación fenotípica y genómica específica, con el objetivo primordial de establecer con precisión la propagación y transmisión de las cepas implicadas para brindar finalmente un mejor tratamiento al paciente mejorando su calidad de vida.

Objetivos

a) General

Determinar la prevalencia de las cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez del 2010 al 2011.

b) Particulares

- Describir los principales datos clínicos y microbiológicos de los pacientes con probable diagnóstico de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE del 2010 al 2011.
- Conocer la frecuencia de BLEE en cepas de enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*) colectadas en el periodo de estudio del 2010 al 2011.
- Describir la correlación de los datos clínicos de los pacientes pediátricos y las cepas productoras de BLEE.
- Realizar análisis específico de los servicios hospitalarios con mayor número de cepas de enterobacterias productoras de BLEE.
- Determinar si la prevalencia de infecciones por cepas productoras de BLEE del 2011 es mayor que la del 2010.

Metodología

a) Aislamiento

El procedimiento para el cultivo de las muestras, se llevo a cabo de acuerdo a la metodología del manual de procedimientos del laboratorio de bacteriología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. De acuerdo a:

- 1) *Broncoaspirados*, Manual de procedimientos técnicos, Capítulo 7 y 9 páginas 1-4.
- 2) *Catéter*, Procedimiento Cultivo de Punta de Catéter, páginas 3-12.
- 3) *Espuito*, Manual de procedimientos técnicos, Capítulo 10, páginas 1-5.
- 4) *Faríngeo*, Estudio bacteriológico de secreción faríngea, páginas 2-15.
- 5) *Gastrostomía*, Manual de procedimientos técnicos, Capítulo 5, páginas 1-3.
- 6) *Heces*, Manual de procedimientos técnicos, Capítulo 19, páginas 1-4.
- 7) *Hemocultivo*, Instructivo de trabajo para el estudio bacteriológico de Sangre y Médula Ósea (Hemocultivo y Mielocultivo), páginas 2-20.
- 8) *LCR y Líquido pleural*, Estudio bacteriológico de líquido cefalorraquídeo, pericárdico, pleural y sinovial, páginas 2-15, y
- 9) *Líquido peritoneal*, Estudio bacteriológico de líquido peritoneal y efluentes de diálisis peritoneal, páginas 2-16.
- 10) *Orina*, Estudio bacteriológico de Orina (Urocultivo), páginas 2-20.
- 11) *Secreción*, Manual de procedimientos técnicos, Capítulo 13 y 14, páginas 1-4.
- 12) *Vaginal*, Manual de procedimientos técnicos, Capítulo 6, páginas 1-4.

b) Identificación de enterobacterias

El procedimiento para la identificación bioquímica de las enterobacterias de aislamientos clínicos, se llevo a cabo de acuerdo a la metodología del manual de procedimientos del laboratorio de bacteriología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. De acuerdo a:

- 1) Instructivo de identificación de Microorganismos utilizando el equipo Vitek 2 XL, páginas 2-7.

c) Procedimiento perfil de susceptibilidad a antibióticos y la detección de producción de BLEE

El procedimiento para la obtención del perfil de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos y no betalactámicos, se llevo a cabo de acuerdo a la metodología del manual de procedimientos del laboratorio de bacteriología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. De acuerdo a:

- 1) Instrucción de trabajo para pruebas de Susceptibilidad a antimicrobianos. Sistema Vitek 2 (Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por Microdilución), páginas 2-10.

Este método se empleo para la obtención de los resultados de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos a partir de un aislamiento bacteriano clínicamente significativo. El sistema automatizado VITEK se basa en la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por Microdilución descrita por Mac Lowry, Marsh y Gerlach. La tarjeta para Gram negativos es una técnica de Microdilución. Contiene micropocillos con las concentraciones de antibiótico específico combinado con el medio de cultivo; además de contar con un micropocillo de control de crecimiento de la bacteria. El sistema evalúa cada patrón de crecimiento del microorganismo en la presencia o ausencia de antibióticos hasta por 18 horas. El equipo posee un sistema óptico de transmitancia que utiliza luz visible para medir rectamente el crecimiento del organismo, midiendo la luz inicial y cada 15 minutos. Para calcular la CMI se utilizan varios parámetros en función de las características de crecimiento observadas y a partir del desarrollo de algoritmos se determina el resultado de sensibilidad para todos los antimicrobianos. El equipo tiene un sistema experto avanzado (AES) que utiliza las normas de [CLSI \(2009\)](#) para deducir los resultados de sensibilidad antimicrobiana y la producción de BLEE.

Descripción del ensayo de susceptibilidad:

- I. Elegir colonias aisladas a partir de un cultivo puro y de un medio no selectivo.
- II. Transferir asépticamente 3.0 ml de solución salina estéril (NaCl 0.45 - 0.50% con un pH de 4.5 - 7.0), en un tubo de ensayo.

- III. Preparar la suspensión de microorganismo con una densidad equivalente al patrón de MacFarland 0.5 - 0.63, utilizando el Densicheck de Vitek 2.
- IV. Colocar la suspensión ajustada en el casete y en la posición siguiente un tubo vacío con una tarjeta de sensibilidad.
- V. Insertar un casete en el sistema consola satélite para ver la pantalla "entrada de datos" e insertar la tarjeta AST-GP67.
- VI. Verificar la pantalla de estado de Vitek 2XL S. A. (Deberá estar en "OK") y colocar el casete en el equipo.
- VII. Retirar las tarjetas de test de la estación de residuos y eliminarlas en la bolsa de residuos peligrosos biológico infeccioso (RPBI).
- VIII. Reporte de resultados de Vitek 2. El reporte de producción de BLEE fue cualitativo: positivo y negativo.

- 2) Instrucción de trabajo para pruebas de Susceptibilidad a los antimicrobianos. Método de difusión con disco Kirby-Bauer, páginas 2-7.

Este método se empleó para corroborar la producción de BLEE en los casos donde el Sistema Experto Avanzado (AES) notificó alerta de Cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepima) y cefamicinas (Cefoxitina), por lo que para verificar la presencia de producción de BLEE se empleó el método alternativo de Kirby-Bauer, el cual se basa en el empleo de discos impregnados con diferentes antimicrobianos con base en las concentraciones y condiciones pre-establecidas por la CLSI en la prueba fenotípica de confirmación por difusión con discos (*Screening and Confirmatory Tests for ESBLs in Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Escherichia coli and Proteus mirabilis*, págs: 48 y 49) de la Tabla 2A-S1 del *Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing; Tenth Supplement*, (CLSI, 2009 y 2010).

Descripción del ensayo de susceptibilidad:

Nota: En la obtención de los resultados analizados, se empleó agar Müller-Hinton (MH2) bioMérieux México, S. A. de C. V. y sensidiscos BBL Sensi-Disc (Becton Dickson) de Ceftazidima 30 µg y Ceftazidima-Ácido Clavulánico 30/10 µg, además de los sensidiscos de Cefotaxima 30 µg y Cefotaxima-Ácido Clavulánico 30/10 µg,

d) Diseño del estudio

Estudio retrospectivo, analítico observacional, descriptivo de corte transversal con seguimiento en un periodo de dos años, del 1 de Enero del 2010 al 31 de Diciembre del 2011.

e) Criterios de selección

a) Descripción de la población

- I. Pacientes pediátricos de los diferentes servicios, de la comunidad intra y extra hospitalaria, con edades que van de recién nacidos a hasta 18 años de edad y con diagnóstico previo de ingreso.

b) Criterios de inclusión

- I. Pacientes pediátricos internos y externos con diagnóstico de laboratorio de infección por Enterobacterias productoras o no productoras de BLEE en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- II. Pacientes cuyos cultivos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* fenotipo de producción de BLEE.
- III. Diagnóstico proporcionado en el periodo de estudio.

c) Criterios de exclusión

- I. Pacientes pediátricos internos y externos con diagnóstico de laboratorio de probable infección por bacterias diferentes a las enterobacterias (Gram positivos, bacilos Gram negativos no fermentadores, bacilos anaerobios estrictos, BAAR, etc.).
- II. Pacientes cuyos resultados de identificación ó susceptibilidad a antibióticos inconclusos o incompletos.
- III. Pacientes con diagnóstico extemporáneo.

d) Criterios de eliminación:

- I. Pacientes pediátricos internos y externos con diagnostico de laboratorio de probable infección por enterobacterias productoras de BLEE no pertenecientes a las cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.
- II. Pacientes que rebasen la edad pediátrica.

- III. Pacientes con información insuficiente o incompleta: tipo de muestra, microorganismo, edad y sala.

f) Variables

a) Variables independientes

- Características demográficas de los pacientes pediátricos de la comunidad intra y extra hospitalaria (edad, sexo, etc.). Variable cualitativa nominal.
- Uso previo de antibióticos betalactámicos y no betalactámicos.
- Resistencia previa a antibióticos betalactámicos y no betalactámicos.
- Sitio de adquisición de la infección por enterobacterias productoras de BLEE (ambiente intra o extra hospitalario).
- Sitio anatómico del cual se tomo la muestra.
- Gravedad de la infección bacteriana.
- Ingresos frecuentes al hospital en el periodo de estudio.
- Re-infecciones con enterobacterias productoras de BLEE y no productoras de BLEE.

b) Variables dependientes

- Presencia o ausencia de BLEE en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en los aislamientos procedentes de muestras clínicas de pacientes pediátricos.

g) Análisis estadístico.

a) Modelo estadístico

- Obtención de frecuencias absolutas y relativas, por medio de Microsoft Excel 2007 para el análisis de información a base de elaboración de gráficos de sectores y barras.
- Análisis por medio de la aplicación de estadística descriptiva en base a la distribución de probabilidad correspondiente a las variables aleatorias

continuas nominales *Ji cuadrada* (X^2) para la comparación de la prevalencia del 2010 con respecto a la del 2011.

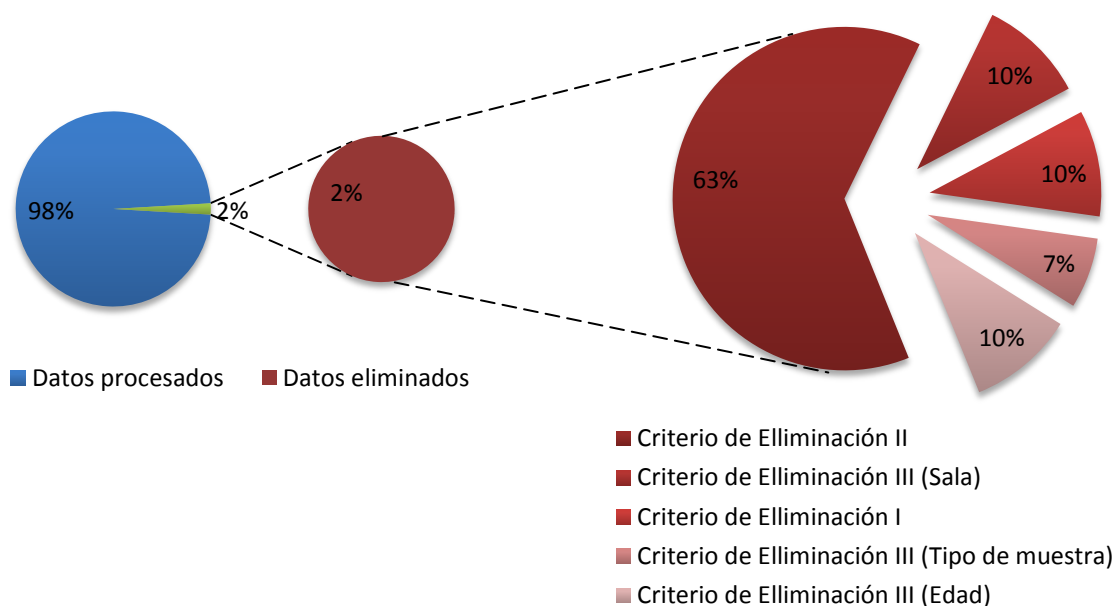
b) Análisis comparativo de las frecuencias absoluta y relativa de:

- Los datos clínicos y microbiológicos obtenidos de los registros del laboratorio de bacteriología del laboratorio clínico central del Hospital Infantil de México Federico Gómez del 2010 y 2011 fueron categorizados exhaustivamente en base a: sala, edad, muestra, área, microorganismo y producción (BLEE positivos) ó no producción BLEE (BLEE negativos), aplicando una clasificación mutuamente excluyente.
- La correlación de los datos clínicos con las cepas productoras de BBLE.
- Los principales servicios hospitalarios con un porcentaje mayor o igual al 50% de cepas de enterobacterias productoras de BLEE.

Resultados

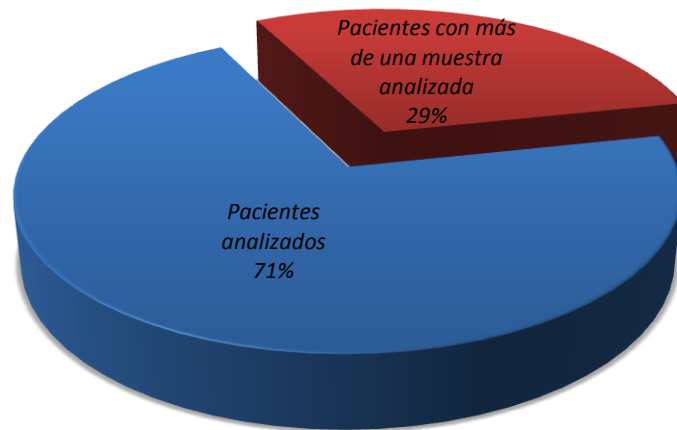
a) Resultados del año 2010

De la población total de estudio (N=1620), 30 fueron los datos excluidos en el análisis, por no cumplir con los criterios de inclusión anteriormente establecidos. Del total de perdidas, la mayor proporción corresponde al criterio de eliminación II (pacientes que rebasan la edad pediátrica ó mayores de 18 años) que corresponde a un 63%, seguida del criterio de exclusión III pertenecientes a pacientes con información insuficiente o incompleta (edad y sala) ambas con un 10%, igual porcentaje corresponde al criterio de exclusión I concerniente a pacientes pediátricos con diagnóstico de laboratorio de probable infección por enterobacterias productoras de BLEE no pertenecientes a las cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. El menor porcentaje (7%) pertenece también al criterio de exclusión III de pacientes con información insuficiente o incompleta (muestra u origen) **Gráfica No. 1.**



Gráfica 1.- Datos fuera de los parámetros de inclusión del análisis de producción de BLEE del 2010

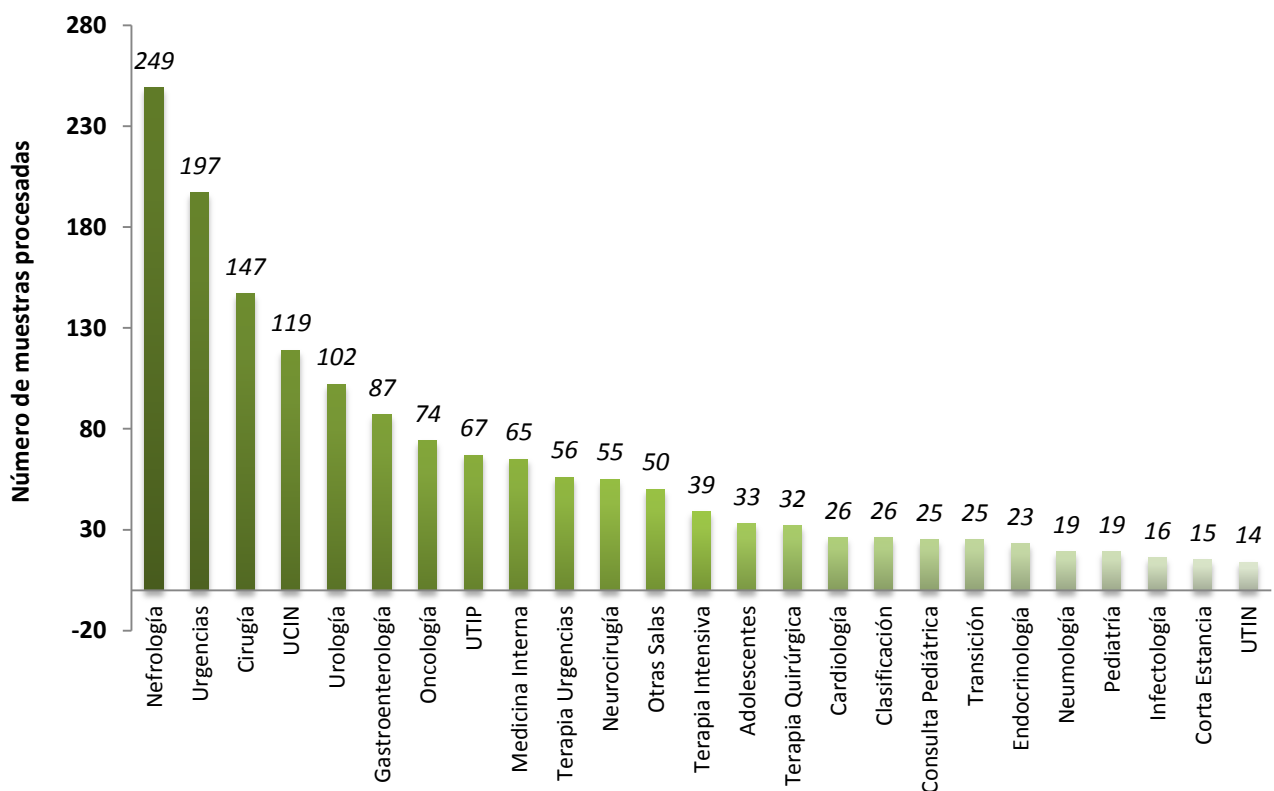
La población total de estudio de este año corresponde a 761 pacientes analizados. Este número de pacientes enviaron distintas muestras que cubren el total de 1590 datos analizados, por lo que el 29% de los datos analizados incluye pacientes analizados para la producción de BLEE con más de una muestra **Gráfica No. 2.**



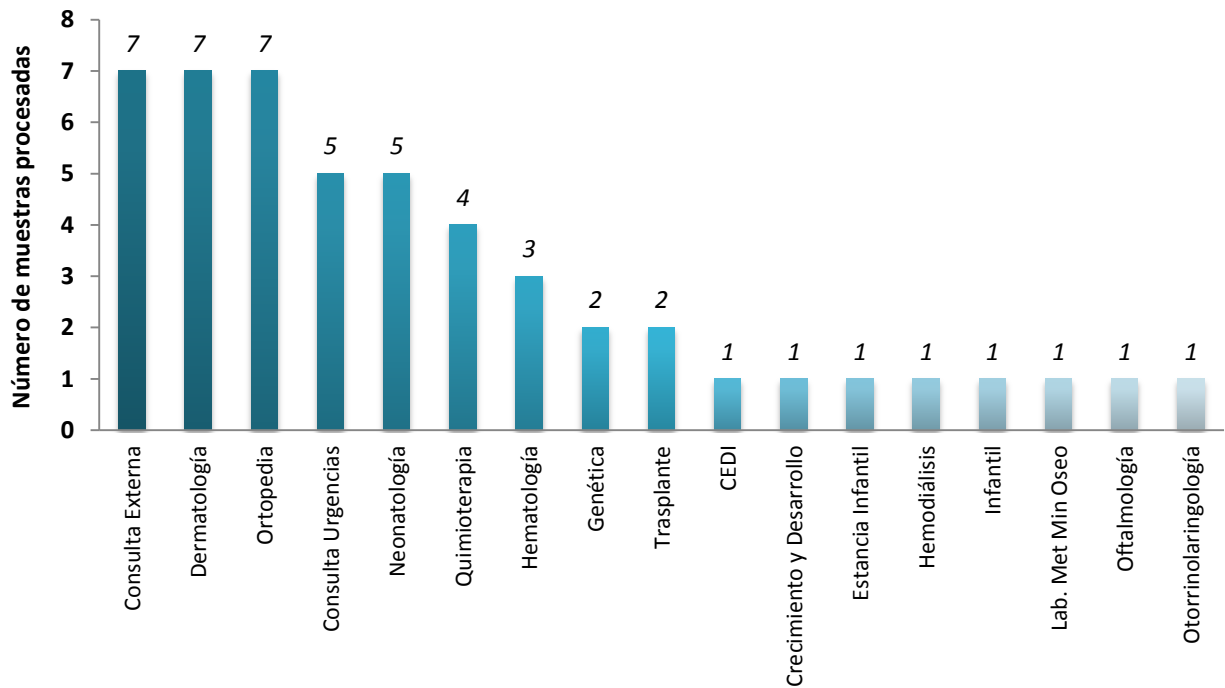
Gráfica 2.- Pacientes analizados referidos al total de datos del análisis de producción de BLEE del 2010

El análisis comprende un total de 42 salas del HIM Federico Gómez, las cuales fueron concentradas en dos grupos en base al número de muestras procesadas para el análisis de producción de BLEE, las salas incluidas en el análisis por año fueron 25 salas que aportaron más de 10 muestras para análisis de laboratorio Gráfica No. 3, la Tabla No. 2 describe el porcentaje de muestras analizadas con respecto al total de datos. Las tres principales salas con mayor porcentaje de muestras analizadas fueron Nefrología

(15.66%) seguida de Urgencias (12.39%) y Cirugía (9.25%). Con fines de estudio las salas con un número menor de 10 datos, fueron agrupadas en la categoría de “otras salas” Gráfica No. 4.



Gráfica 3.- Cantidad de muestras por sala pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2010.

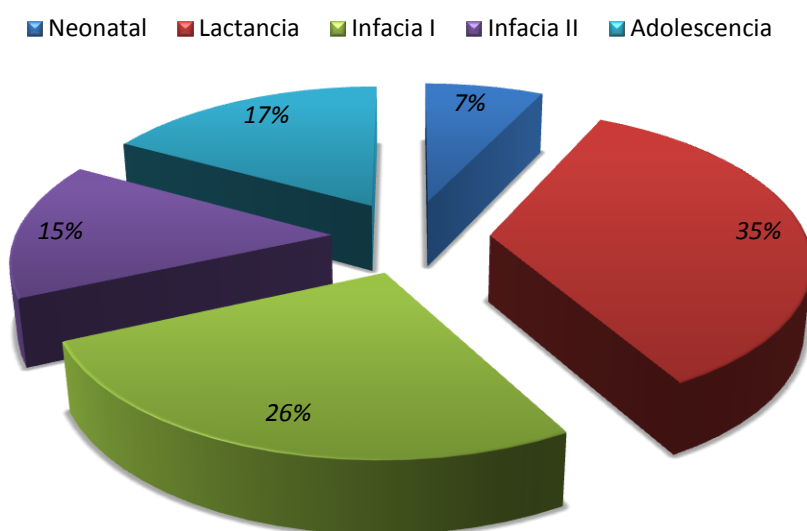


Gráfica 4.- Cantidad de muestras pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2010 que conforman la categoría “Otras salas”

Tabla 2.- Porcentaje de muestras por sala pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2010

Sala	Porcentaje de muestras (%)
Nefrología	15.66
Urgencias	12.39
Cirugía	9.25
UCIN	7.48
Urología	6.42
Gastroenterología	5.47
Oncología	4.65
UTIP	4.21
Medicina Interna	4.09
Terapia Urgencias	3.52
Neurocirugía	3.46
“Otras Salas”	3.14
Terapia Intensiva	2.45
Adolescentes	2.08
Terapia Quirúrgica	2.01
Cardiología	1.64
Clasificación	1.64
Consulta Pediátrica	1.57
Transición	1.57
Endocrinología	1.45
Neumología	1.19
Pediatría	1.19
Infectología	1.01
Corta Estancia	0.94
UTIN	0.88
Reumatología	0.63
Total	100%

El total de la población de estudio fue dividida en 5 grupos de edad, en base a la etapa de desarrollo en los que se de los pacientes pediátricos: [Tabla No. 3](#), [Gráfica No. 5](#). El mayor número de muestras analizadas para producción de BLEE procede de pacientes en la etapa de lactancia (34.78%), seguido de los pacientes en la Infancia a (26.42%), Adolescencia (16.92%), Infancia II (14.78%) y Neonatal (7.11%).

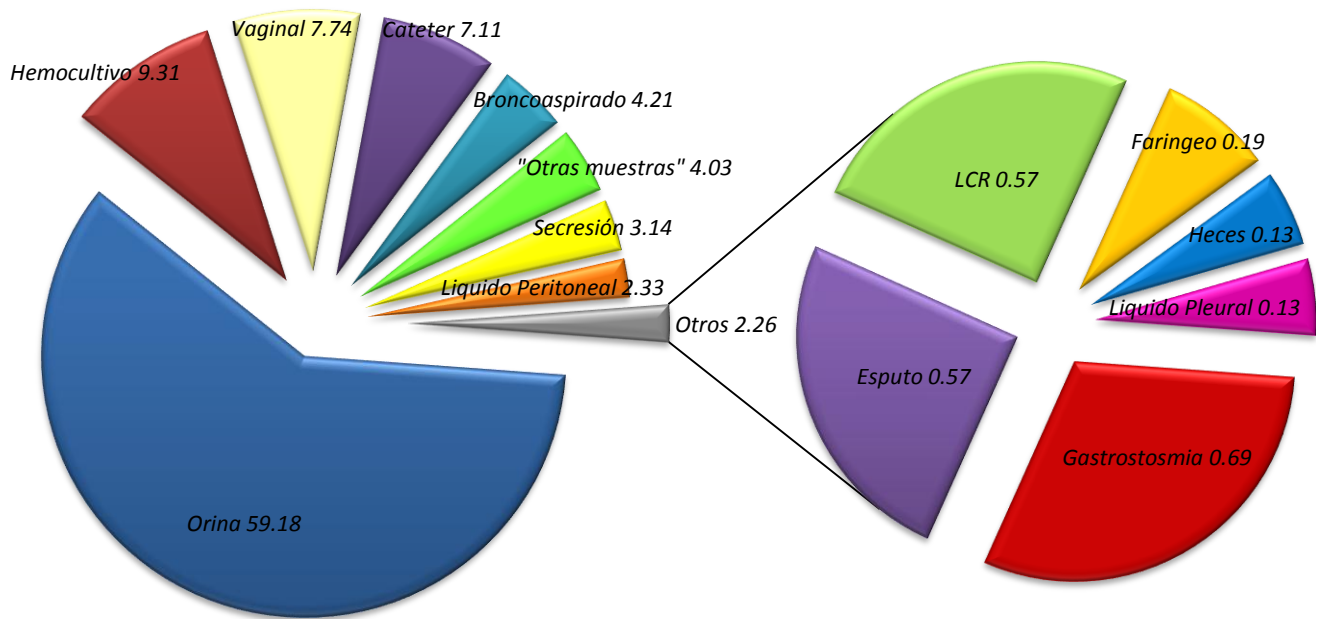


Gráfica 5.- Grupos de edad de los pacientes pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2010

Tabla 3.-Grupos de edad que comprenden el análisis de producción de BLEE del 2010

Grupo de edad	Día, meses y años
Neonatal	1 día a 1mes
Lactancia	2 meses -2 años
Infancia I	3 años a 7 años
Infancia II	8 años a 12 años
Adolescencia	13 años a 18 años

El total de datos corresponde a un total de 30 diferentes muestra analizadas, con fines de análisis, las muestras fueron agrupadas en 14 categorías diferentes [Tabla No. 4](#), teniéndose la orina (59.18%) como principal muestra analizada, seguida de hemocultivo ó sangre (9.31%) y vaginal (7.74%). Las muestras poco frecuentes fueron agrupadas en la categoría “Otras muestras” las cuales comprenden: Absceso, Herida quirúrgica, Tejido, Empiema, Flictema, Líquido cistitis, Parche, Escara y Cánula [Gráfica No. 6](#).

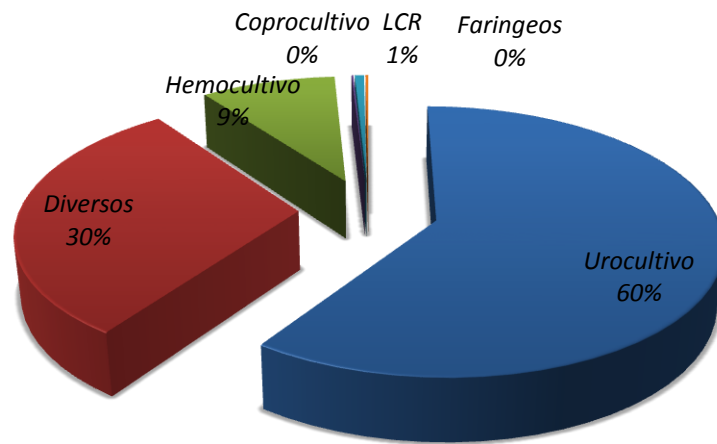


Gráfica 6.- Total de muestras pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2010

Tabla 4.-Cantidad de muestras analizadas para la producción de BLEE en el 2010

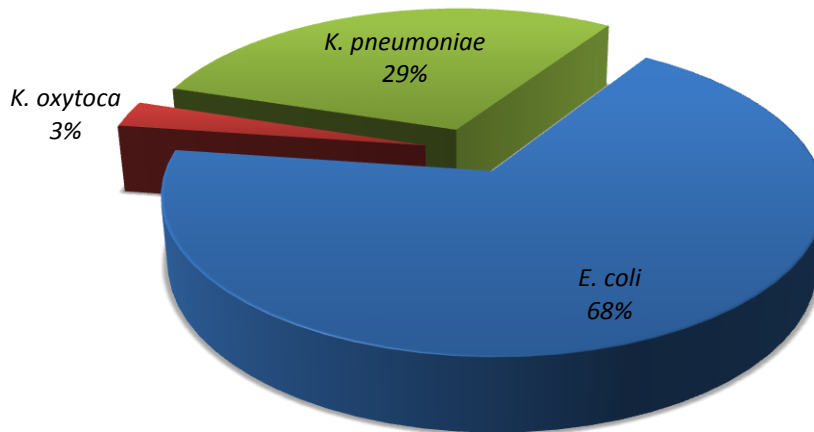
Muestra	Cantidad
Orina	941
Hemocultivo	148
Vaginal	123
Catéter	113
Broncoaspirado	67
Otros	64
Secreción	50
Líquido Peritoneal	37
Gastrostomía	11
Espuito	9
LCR	9
Faríngeo	3
Heces	2
Líquido Pleural	2
Total	1590

Las principales áreas del laboratorio de bacteriología que se encargaron del procesamiento de la muestra, identificación así como emisión de informe fueron 6 Gráfica No. 7. La área que presentó mayor procesamiento fue el área de Urocultivos (59.69%), seguida de el área de Diversos (30.19%) y Hemocultivos (9.18%).



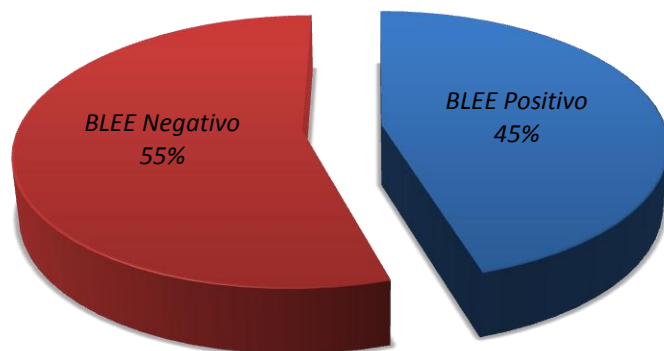
Gráfica 7.- Porcentaje muestras analizadas para la producción de BLEE del 2010 por área del laboratorio de bacteriología

La población manifestó la existencia de las tres enterobacterias estudiadas. En los datos se encontró que la mayor parte de cepas pertenecen a *E. coli* (68.05%), seguida de *K. pneumoniae* (29.18%) y *K. oxytoca* (2.77%) Gráfica No. 8.

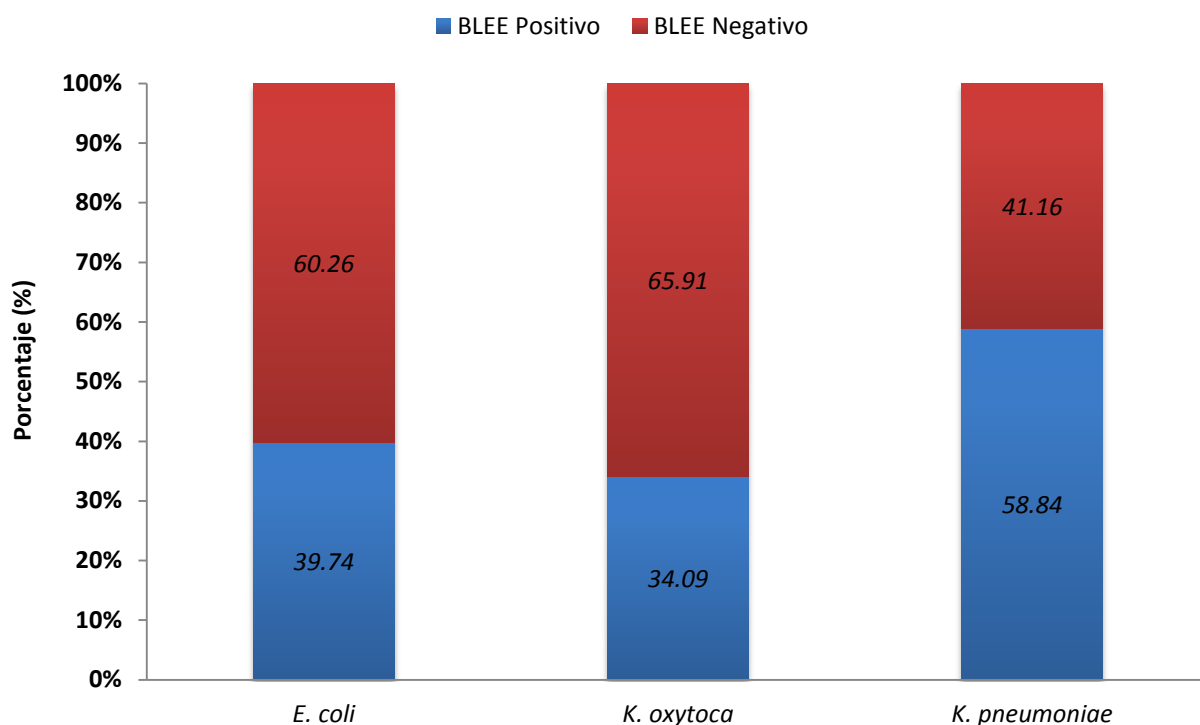


Gráfica 8.- Porcentaje Enterobacterias analizadas para la presencia de BLEE con respecto al total de muestras analizadas del 2010

De los 1590 datos analizados, un 45% (N=718) de los aislamientos fueron confirmados como enterobacterias productoras de BLEE, siendo un 55% (N=872) negativos para la producción de BLEE Gráfica No. 9. El porcentaje correspondiente a cepas productoras de BLEE es equivalente a la prevalencia de infecciones por este tipo de microorganismos en la población de estudio. Entre las cepas productoras de BLEE, *K. pneumoniae* presentó la mayor prevalencia (58.84%), seguido de *E. coli* (39.74%) y *K. oxytoca* (34.09%) Gráfica No. 10. La relación entre cepas productoras de BLEE (BLEE positivos) y las no productoras de BLEE (BLEE negativos) con respecto al total de microorganismos analizados se presenta en la Tabla No. 5.



Gráfica 9.- Total de BLEE negativos y positivos del periodo 2010

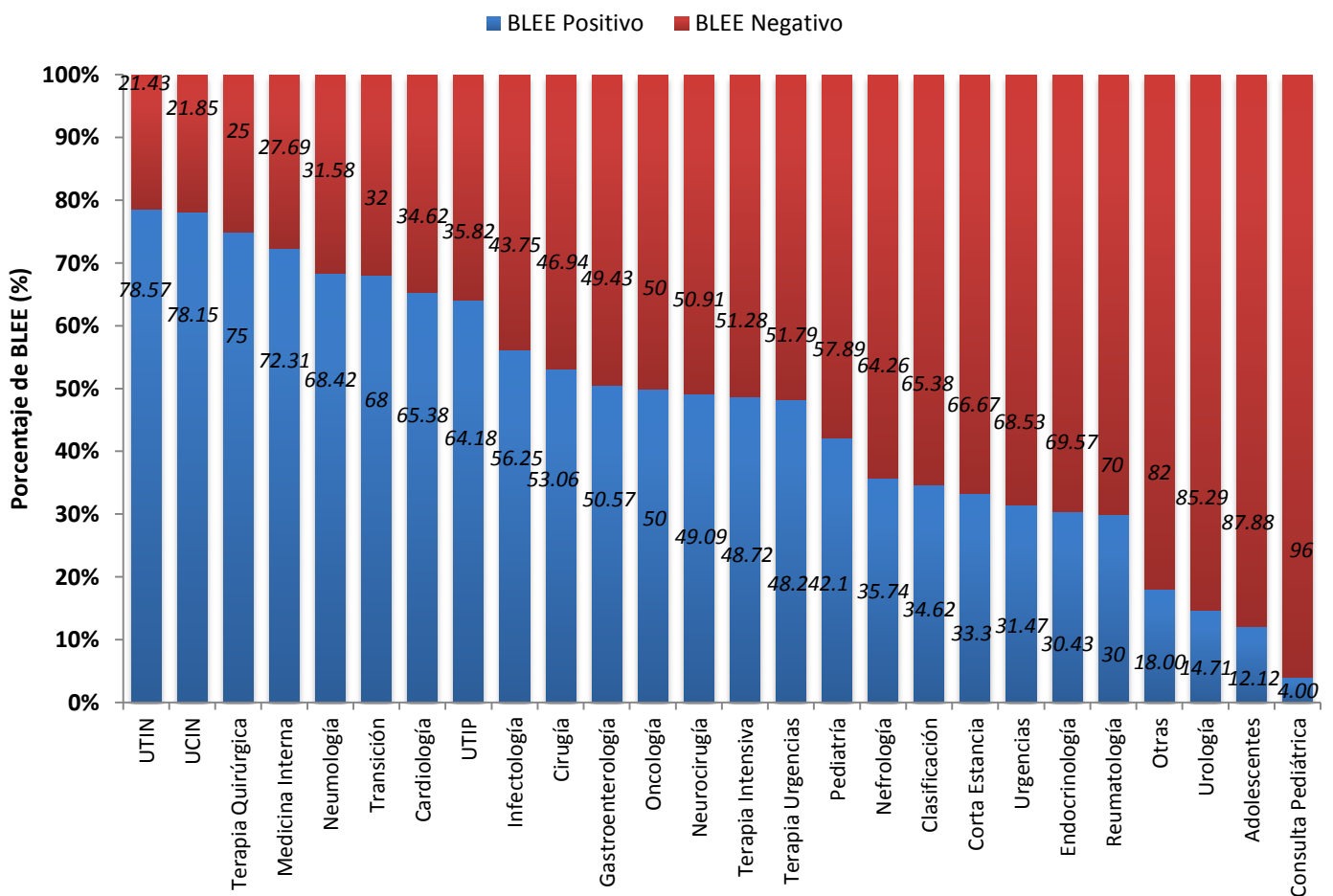


Gráfica 10.- Relación de las diferentes Enterobacterias, en cuanto a la producción o no producción de BLEE del 2010

Tabla 5.- Cantidad y porcentaje de cepas productoras y no productoras de BLEE en relación al total de microorganismos analizados

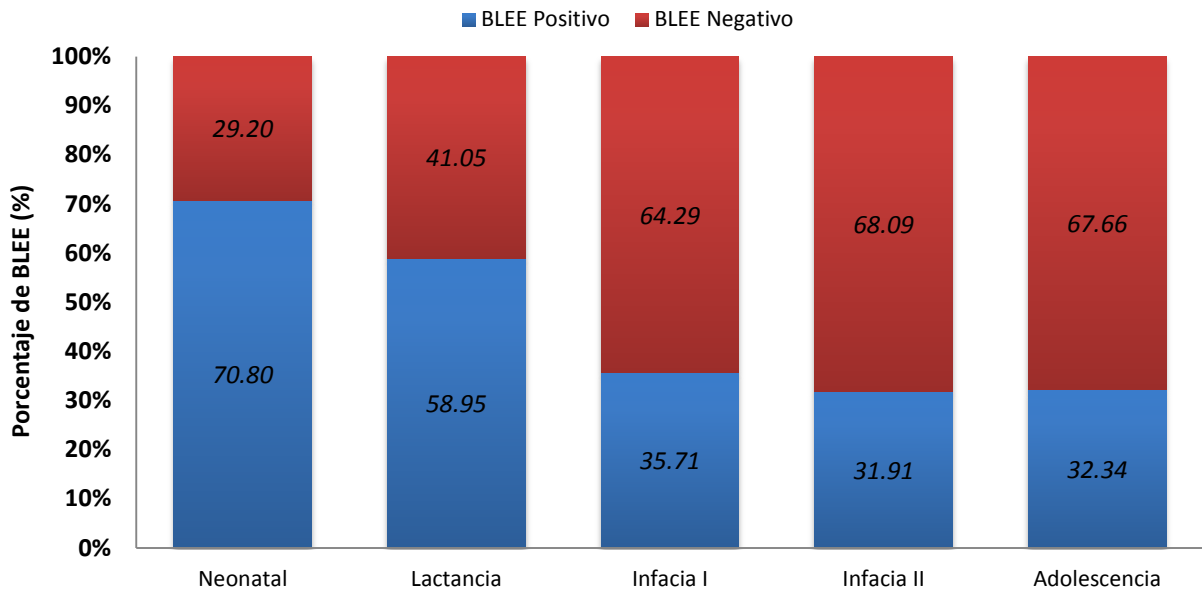
Enterobacteria	Cantidad Positivo	Cantidad Negativo	% BLEE Positivo	% BLEE Negativo
<i>E. coli</i>	430	652	39.74	60.26
<i>K. oxytoca</i>	15	29	34.09	65.91
<i>K. pneumoniae</i>	273	191	58.84	41.16

Al analizar los datos correspondientes a las cepas productoras de BLEE y las no productoras de BLEE con respecto al servicio hospitalario de origen, se obtuvo que el principal servicio hospitalario cuyos aislamientos fueron productores de BLEE es UTIN (78.57%), seguido de UCIN (78.15%), Terapia quirúrgica (75%), Medicina interna (72.31%), Neumología (68.42%), Transición (68%), Cardiología (65.38%), UTIP (64.18%), Infectología (56.25%), Cirugía (53.06%) y Gastroenterología (50.57%). El total de productores y no productores de BLEE por servicio hospitalario se presenta en el Gráfica No. 11.



Gráfica 11.- Producción de BLEE por sala correspondientes al 2010

La relación de cepas productoras y no productoras de BLEE con respecto a el grupo de edad demostró que el grupo de pacientes con mayor producción de estas enzimas es el que se encuentra en la etapa Neonatal (70.80%), seguida de los miembros pertenecientes al grupo de lactantes (58.95%), infantes y adolescentes. La relación específica por grupo de edad puede visualizarse en el Gráfica No. 12.

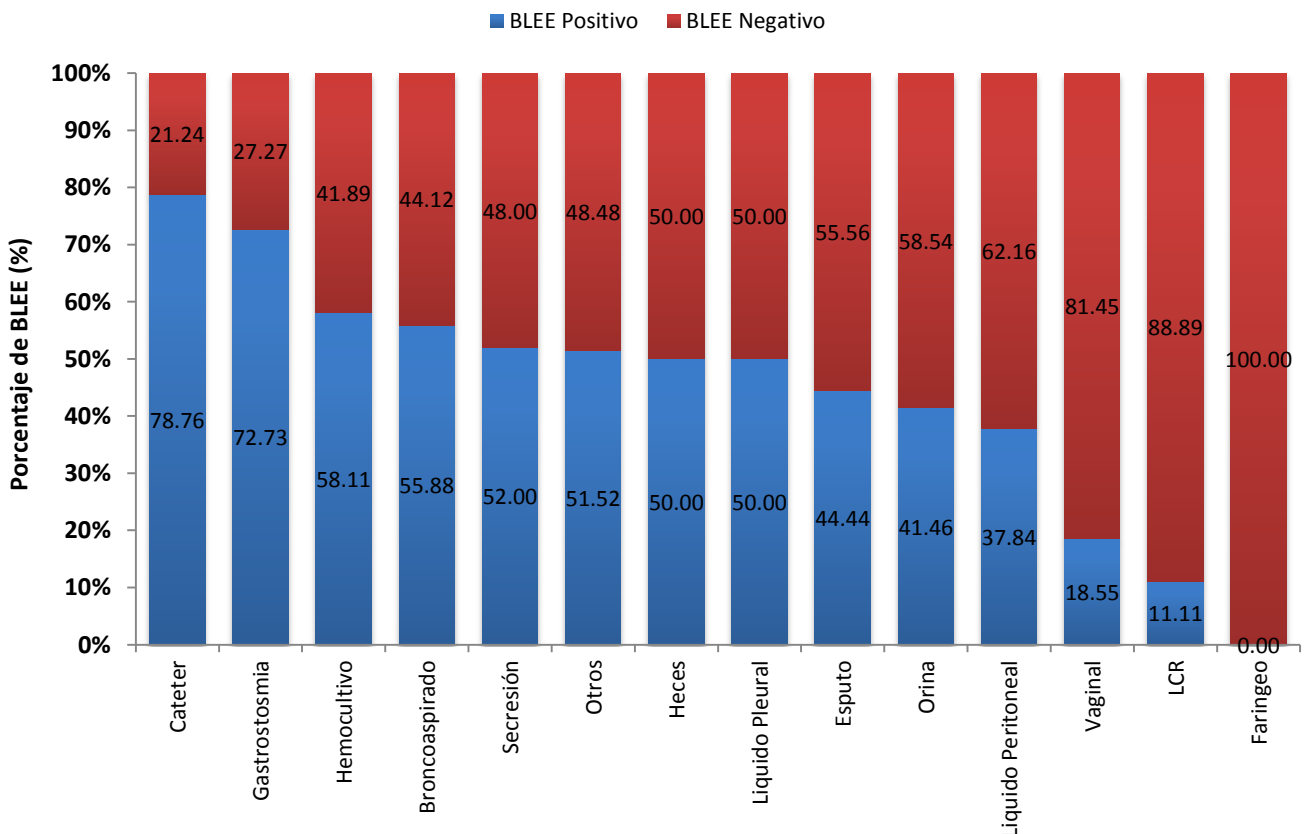


Gráfica 12.- Relación entre los diferentes grupos de edades de los pacientes analizados y la producción de BLEE correspondientes al análisis del 2010

Igualmente se obtuvo la relación de BLEE positivos y negativos por muestra procesada, obteniéndose el Catéter como la principal muestra cuyos microorganismos son productores de BLEE (78.76%), seguido de Gastrostomía (72.73%), Hemocultivo o sangre (58.11%), etc. Esta relación se presenta en su totalidad en el Gráfica No. 13.

Con respecto a la relación de cepas productoras de BLEE y las no productoras de BLEE con respecto al servicio hospitalario, se realizó el análisis por sala teniendo como criterio de selección un porcentaje mayor ó igual al 50% de cepas productoras de BLEE

Gráfica No. 14 a 25 [\(Ver Graficas pág. \)](#)

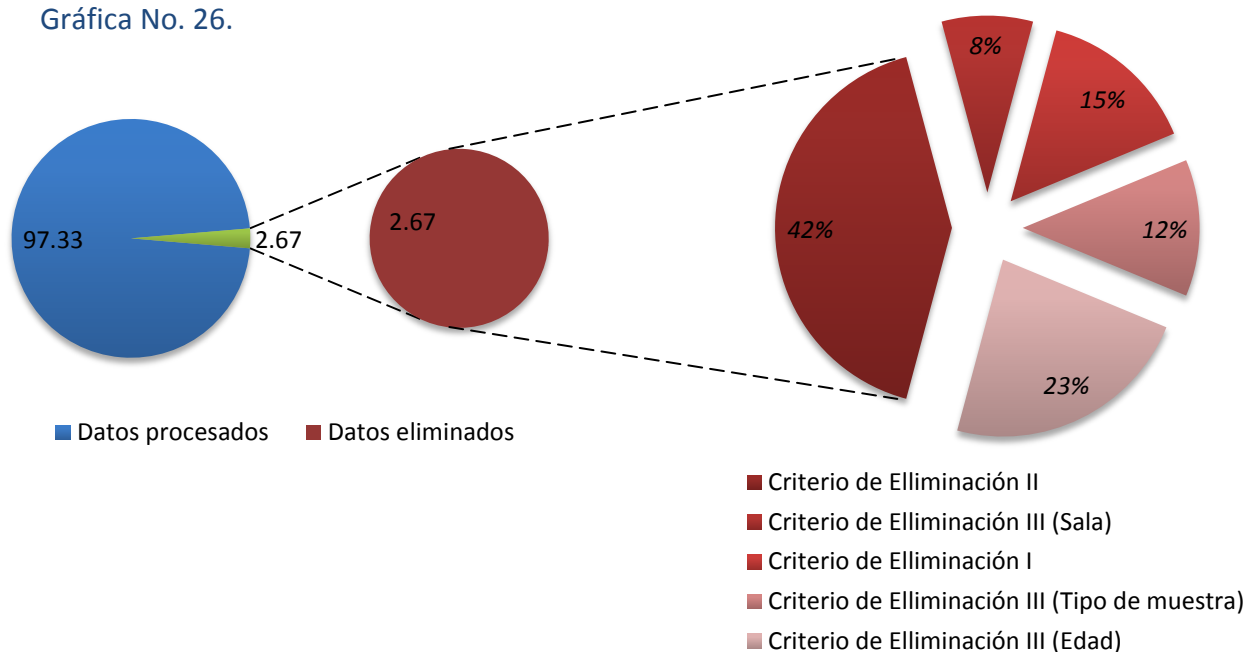


Gráfica 13.- Relación entre las diferentes muestras y la producción de BLEE correspondientes al análisis del 2010

a) Resultados del año 2011

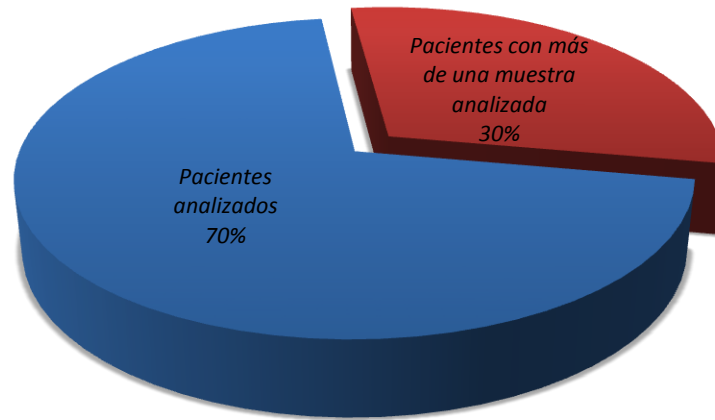
De la población total de estudio (N=1759), 48 fueron los datos no incluidos en el análisis del presente año, ya que estos no cumplieron con los criterios de inclusión anteriormente establecidos. El total de perdidas fue dividido en un Gráfica de sectores el cual denotó que la mayoría de los datos eliminados, al igual que el año anterior, fue la proporción correspondiente al criterio de eliminación II (pacientes que rebasan la edad pediátrica ó mayores de 18 años) que corresponde a un 42%. El criterio de eliminación III favoreció la eliminación de datos con falta de información clínica como son Edad (23%), seguido por los datos eliminados en microorganismos diferentes a los establecidos en el estudio (15%), correspondientes al criterio de eliminación I. Datos que igualmente fueron eliminados del estudio por cumplir con el criterio de eliminación III fueron los correspondientes a falta de muestra (12%) y falta de sala (8%)

Gráfica No. 26.



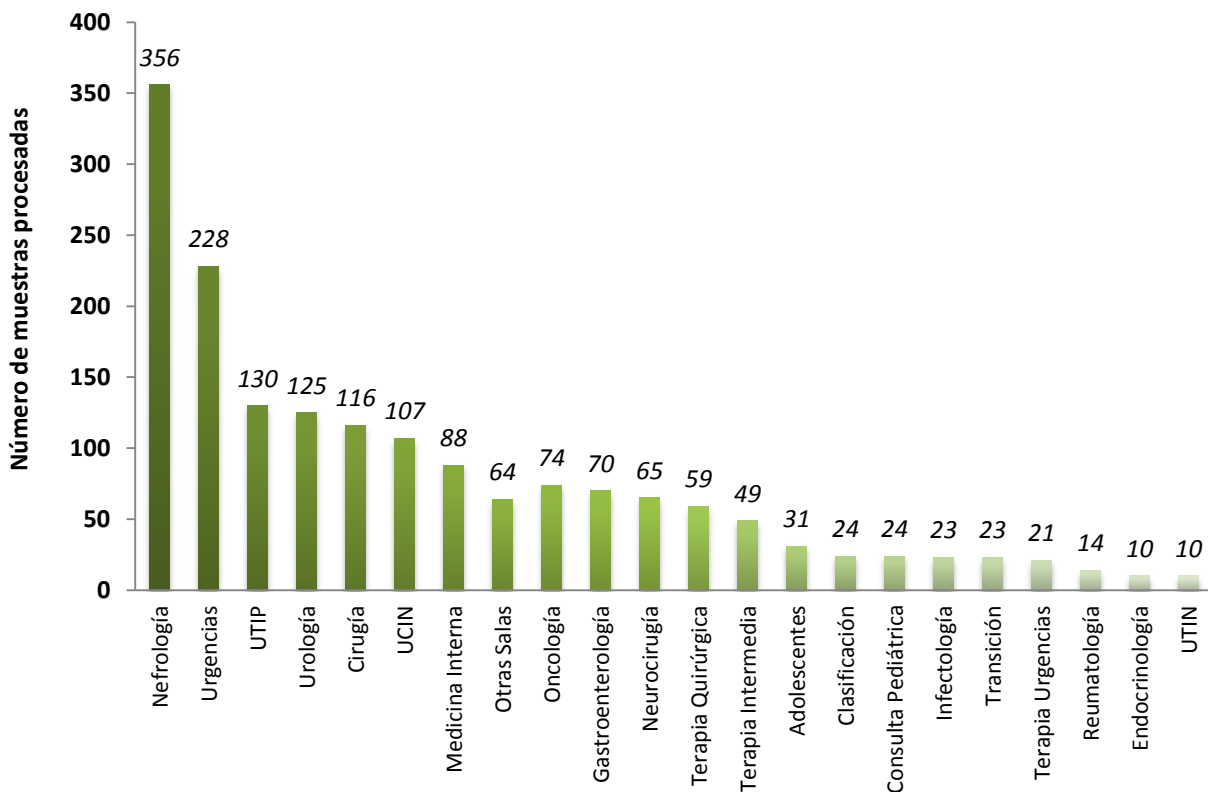
Gráfica 14.- Datos fuera de los parámetros de inclusión del análisis de producción de BLEE del 2011

La población total de estudio de este año corresponde a 736 pacientes analizados (70%, con respecto al total de datos analizados). Este número de pacientes enviaron distintas muestras que cubren el total de 1711, por lo que el 30% de los datos analizados en este año incluye los resultados de pacientes analizados para la producción de BLEE con más de una muestra Gráfica No. 27.

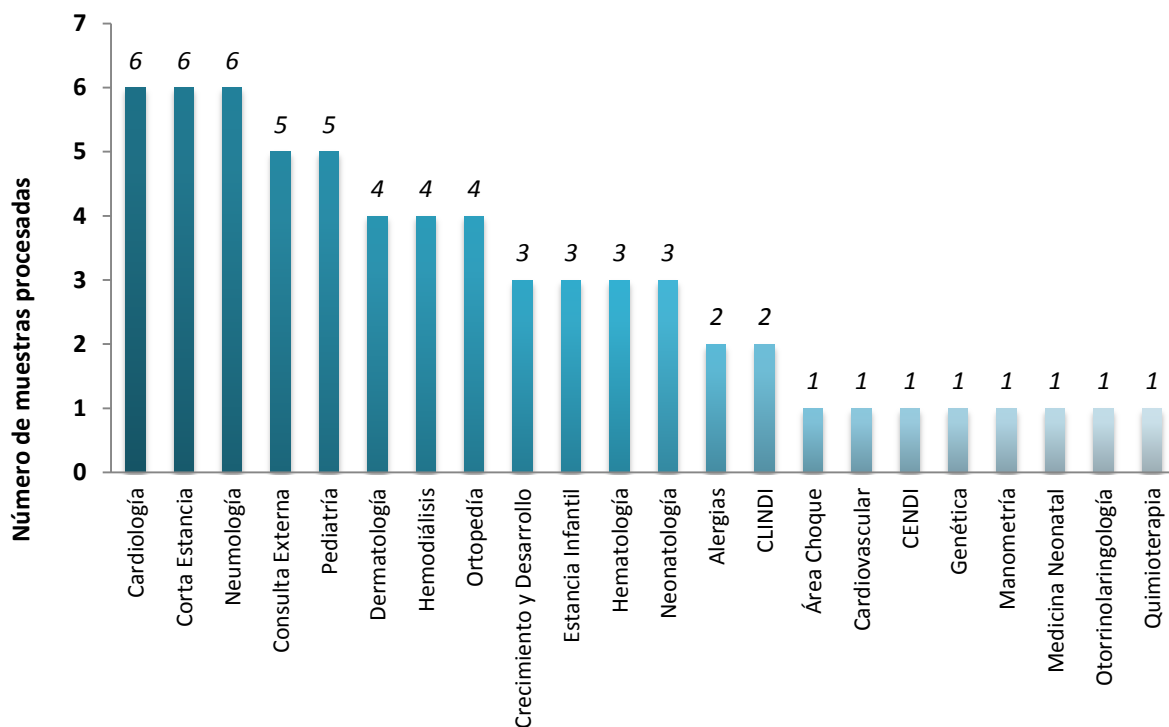


Gráfica 15.- Pacientes analizados referidos al total de datos del análisis de producción de BLEE del 2011

El análisis de salas del HIM Federico Gómez comprende un total de 43 servicios hospitalarios, las cuales fueron concentradas en dos grupos de acuerdo al número de muestras procesadas para el análisis de producción de BLEE. Las salas incluidas finalmente en el análisis por año fueron 22, las cuales que tuvieron más de 10 muestras para análisis de laboratorio de producción de BLEE Gráfica No. 28. La Tabla No. 6 describe específicamente el porcentaje de muestras analizadas con respecto al total de datos totales analizados. Las tres principales salas con mayor porcentaje de muestras analizadas para producción de BLEE fueron Nefrología (20.81%) seguida de Urgencias (13.33%) y Urología (7.31%). Con fines de estudio las salas con un número menor de 10 datos, fueron agrupadas en la categoría de “otras salas” las cuales se muestran en el Gráfica No. 29.



Gráfica 16.- Cantidad de muestras por sala pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2011

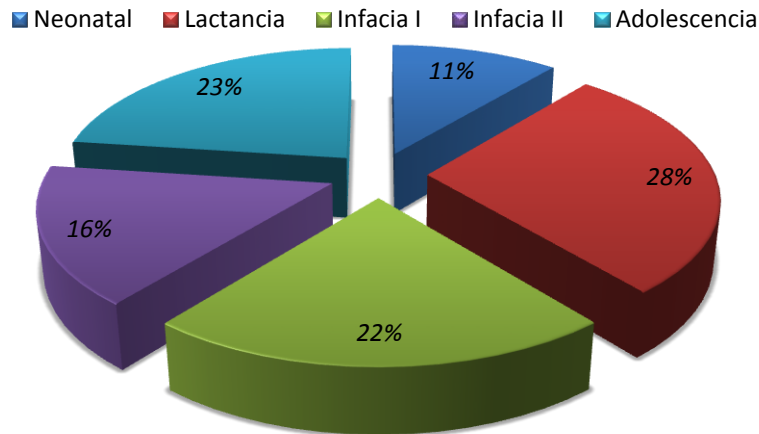


Gráfica 17.- Cantidad de muestras pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2011 que conforman la categoría “Otras salas”

Tabla 6.- Porcentaje de muestras por sala pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2011

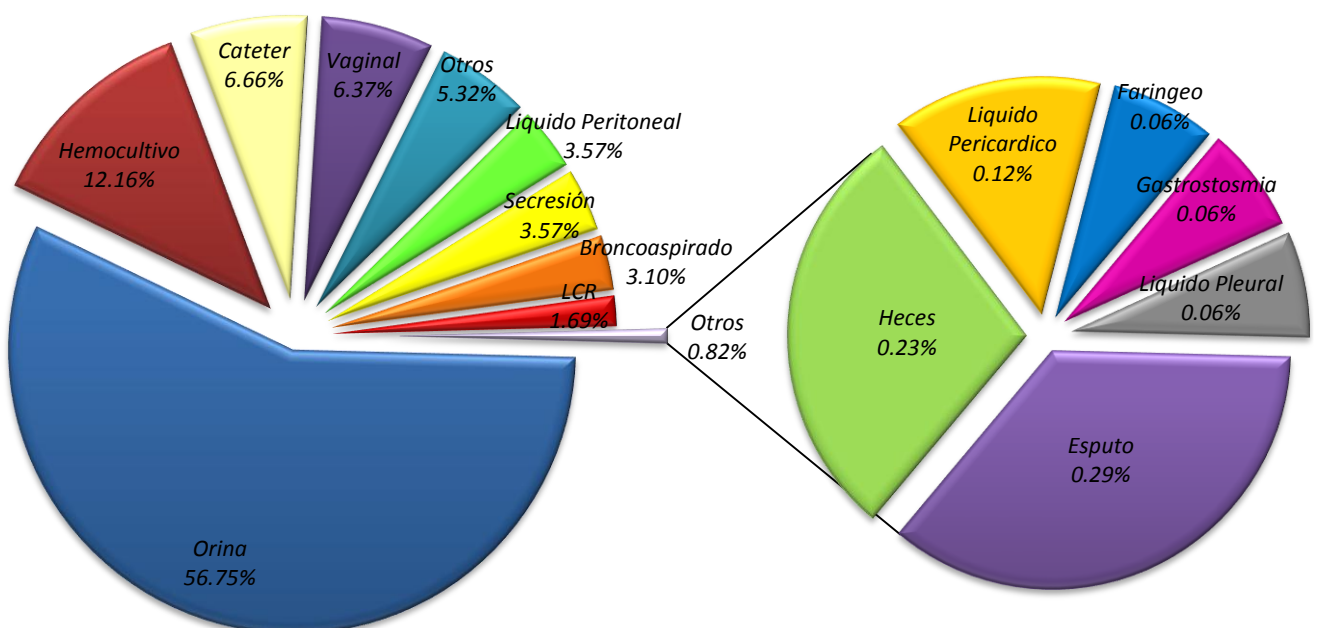
Sala	Porcentaje de muestras (%)
Nefrología	20.81
Urgencias	13.33
UTIP	7.60
Urología	7.31
Cirugía	6.78
UCIN	6.25
Medicina Interna	5.14
“Otras Salas”	3.74
Oncología	4.32
Gastroenterología	4.09
Neurocirugía	3.80
Terapia Quirúrgica	3.45
Terapia Intermedia	2.86
Adolescentes	1.81
Clasificación	1.40
Consulta Pediátrica	1.40
Infectología	1.34
Transición	1.34
Terapia Urgencias	1.23
Reumatología	0.82
Endocrinología	0.58
UTIN	0.58
Total	100%

El total de la población de estudio de año 2011 también fue dividida en 5 grupos de edad, en base a la etapa de desarrollo en los que se de los pacientes pediátricos anteriormente mencionado **Gráfica No. 30**. El mayor número pacientes analizados se encuentra en la etapa de Lactancia (28%), seguido de pacientes en la etapa de Adolescencia (22.91%), Infancia I (21.80%), Infancia II (16.25%) y Neonatal (11.05%).



Gráfica 18.- Grupos de edad de los pacientes pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2011

El total de datos corresponde a un total de 30 diferentes muestras analizadas, con fines de análisis, estas fueron agrupadas en 15 categorías diferentes **Tabla No. 7**, teniéndose la orina (56.75%) como principal muestra analizada, seguida de hemocultivo ó sangre (12.16%), catéter (6.66%) y vaginal (6.37%). Las muestras poco frecuentes, al igual que en el año anterior fueron agrupadas en la categoría “Otras muestras” las cuales comprenden las muestras antes mencionadas y se encuentran descritas en el **Gráfica No. 31**.



Gráfica 19.- Total de muestras pertenecientes al análisis de producción de BLEE del 2011

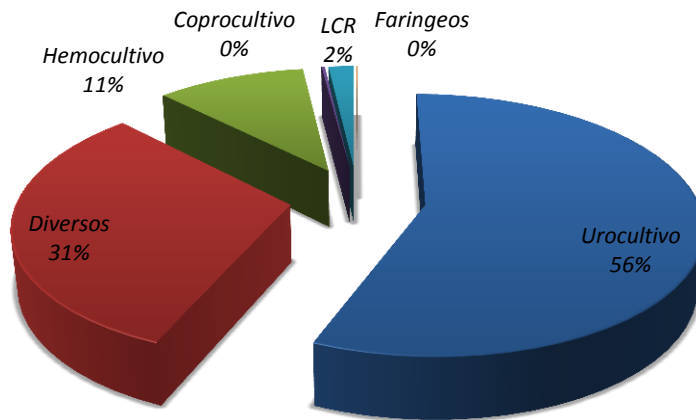
Tabla 7.-Cantidad de muestras analizadas para la producción de BLEE en el 2011

Muestra	Cantidad
Orina	971
Hemocultivo	208
Catéter	114
Vaginal	109
Otros	91
Líquido Peritoneal	61
Secreción	61
Broncoaspirado	53
LCR	29
Espujo	5
Heces	4
Líquido Pericárdico	2
Faríngeo	1
Gastrostomía	1
Líquido Pleural	1
Total	1711

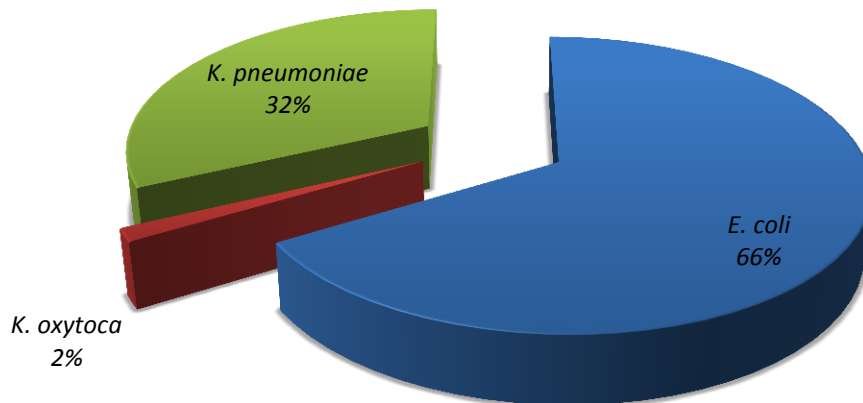
Las principales áreas del laboratorio de bacteriología que se encargaron del procesamiento de la muestra, identificación así como emisión de informe fueron 6 [Gráfica No. 32](#). La área que presentó mayor procesamiento fue el área de Urocultivos (56.28%), seguida de el área de Diversos (31.27%) y Hemocultivos (10.40%).

La población estudiada manifestó la existencia de las tres enterobacterias anteriormente mencionadas. Se encontró que la mayor parte de cepas pertenecen a *E. coli* (66.45%), seguida de *K. pneumoniae* (32.09%) y *K. oxytoca* (1.46%) [Gráfica No. 33](#).

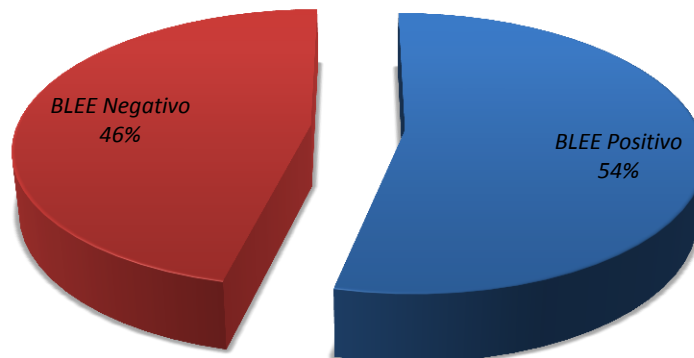
De los 1711 datos analizados, un 54% (N=918) de los aislamientos fueron confirmados como enterobacterias productoras de BLEE, siendo un 46% (N=793) negativos para la producción de dicha enzima [Gráfica No. 34](#). El porcentaje correspondiente a cepas productoras de BLEE es considerado como la prevalencia de infecciones por este tipo de microorganismos en la población de estudio. Entre las cepas productoras de BLEE, *K. pneumoniae* presentó la mayor prevalencia (72.50%), seguido de *E. coli* (45.47%) y *K. oxytoca* (12%); estas se pueden visualizar en el [Gráfica No. 35](#), que también considera los porcentajes de microorganismos no productores de BLEE. La relación entre cepas productoras de BLEE (BLEE positivos) y las no productoras de BLEE (BLEE negativos) con respecto al total de microorganismos analizados se presenta en la [Tabla No. 8](#).



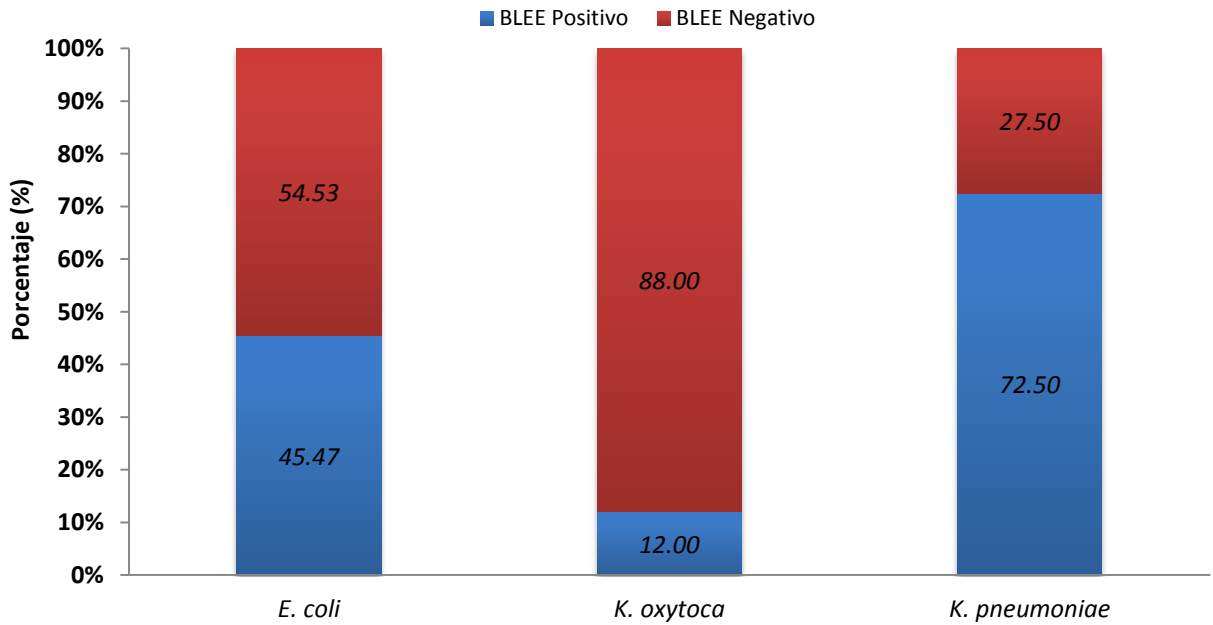
Gráfica 20.- Porcentaje muestras analizadas para la producción de BLEE del 2011 por área del laboratorio de bacteriología



Gráfica 21.- Porcentaje Enterobacterias analizadas para la presencia de BLEE con respecto al total de muestras analizadas del 2011



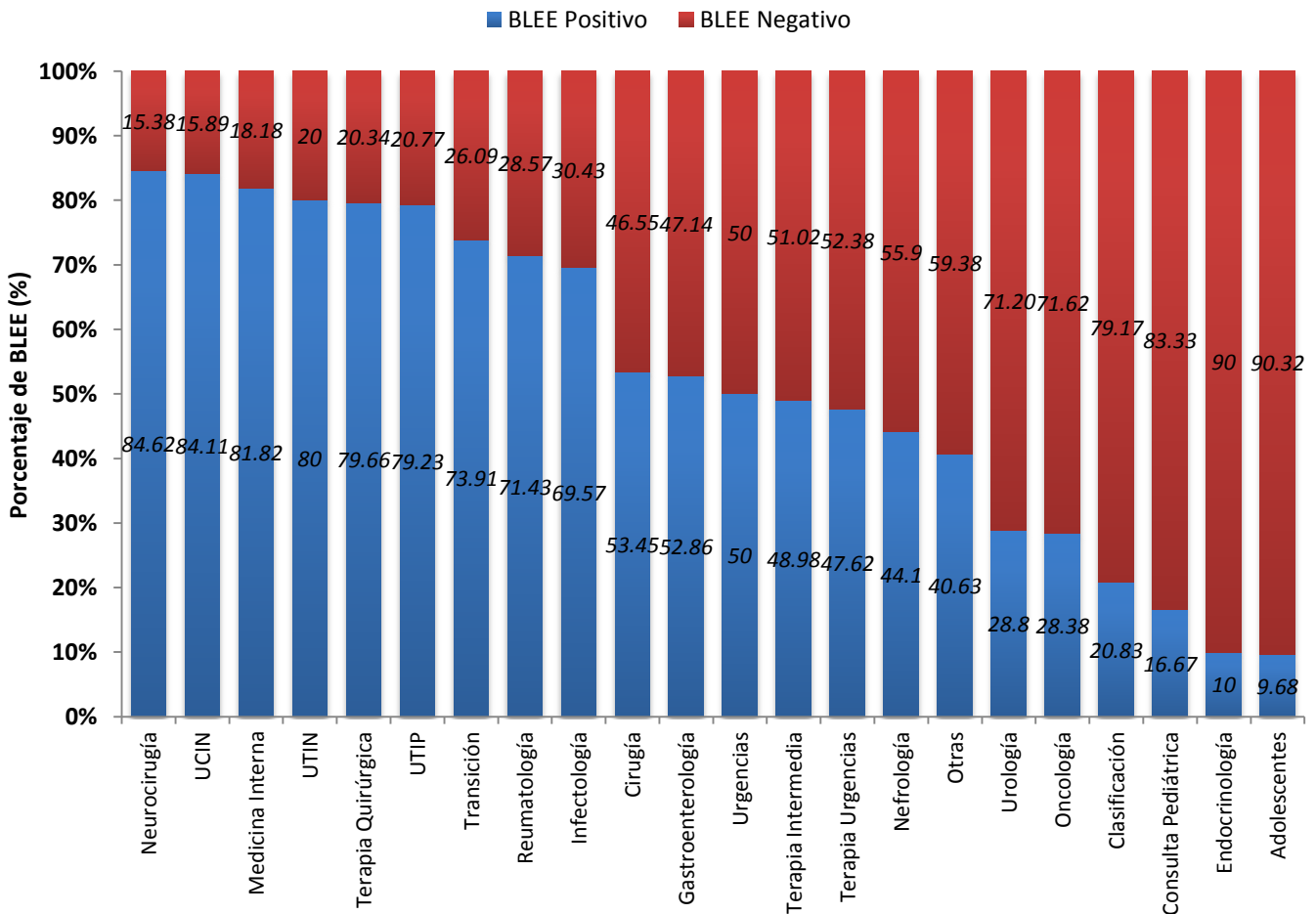
Gráfica 22.- Total de BLEE negativos y positivos del periodo 2011



Gráfica 23.- Relación de las diferentes Enterobacterias, en cuanto a la producción o no producción de BLEE del 2011

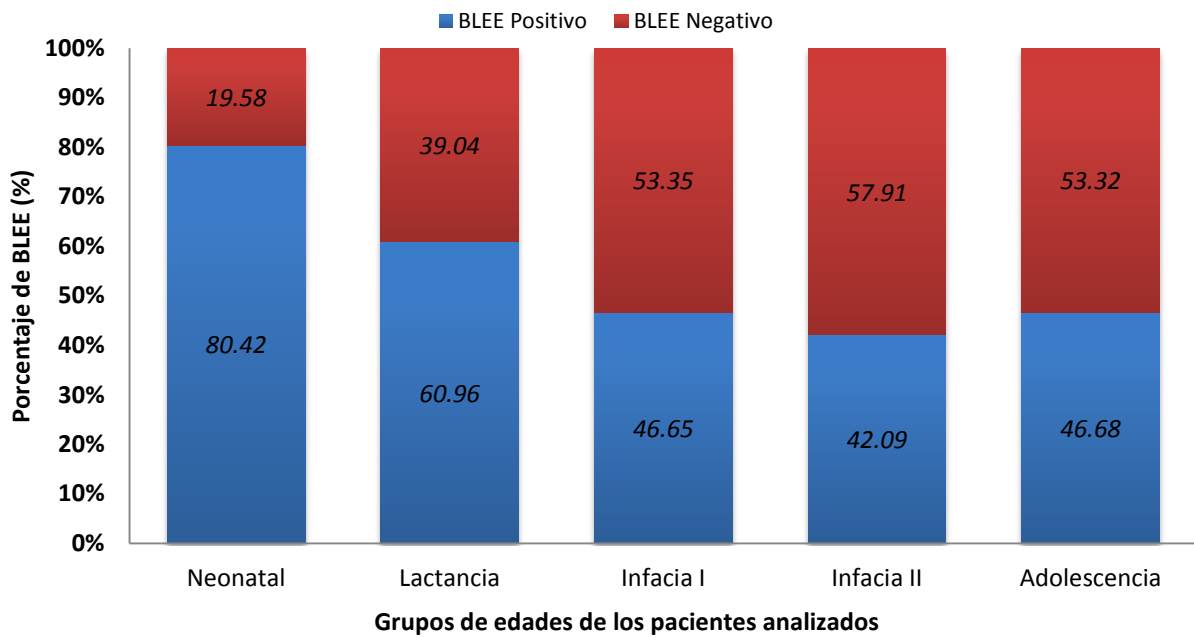
Tabla 8.- Cantidad y porcentaje de cepas productoras y no productoras de BLEE en relación al total de microorganismos analizados

Enterobacteria	Cantidad Positivo	Cantidad Negativo	% BLEE Positivo	% BLEE Negativo
<i>E. coli</i>	517	620	45.47	54.53
<i>K. oxytoca</i>	3	22	12	88.00
<i>K. pneumoniae</i>	398	151	72.50	27.50

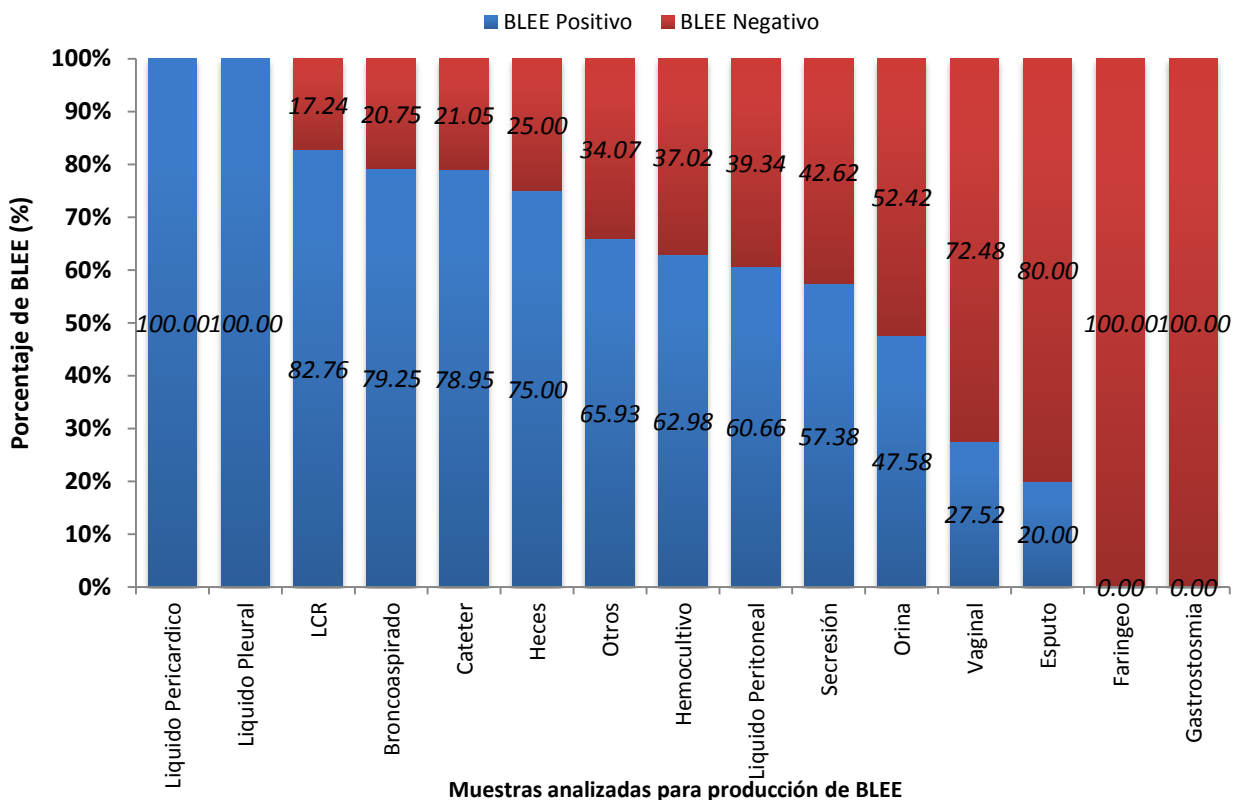


Gráfica 24.- Producción de BLEE por sala correspondientes al 2011

La relación de cepas productoras y no productoras de BLEE con respecto a el grupo de edad demostró en este año que el grupo de pacientes con mayor producción de estas enzimas es el que se encontraron en la etapa Neonatal (80.42%), seguida de los pacientes en la etapa de Lactancia (60.96%), Adolescencia (46.68%), Infancia I (46.65%) e Infancia II (42.09%). La relación específica de BLEE negativos y positivos por grupo de edad puede visualizarse en el Gráfica No. 37.



Gráfica 25.- Relación entre los diferentes grupos de edades de los pacientes analizados y la producción de BLEE correspondientes al análisis del 2011



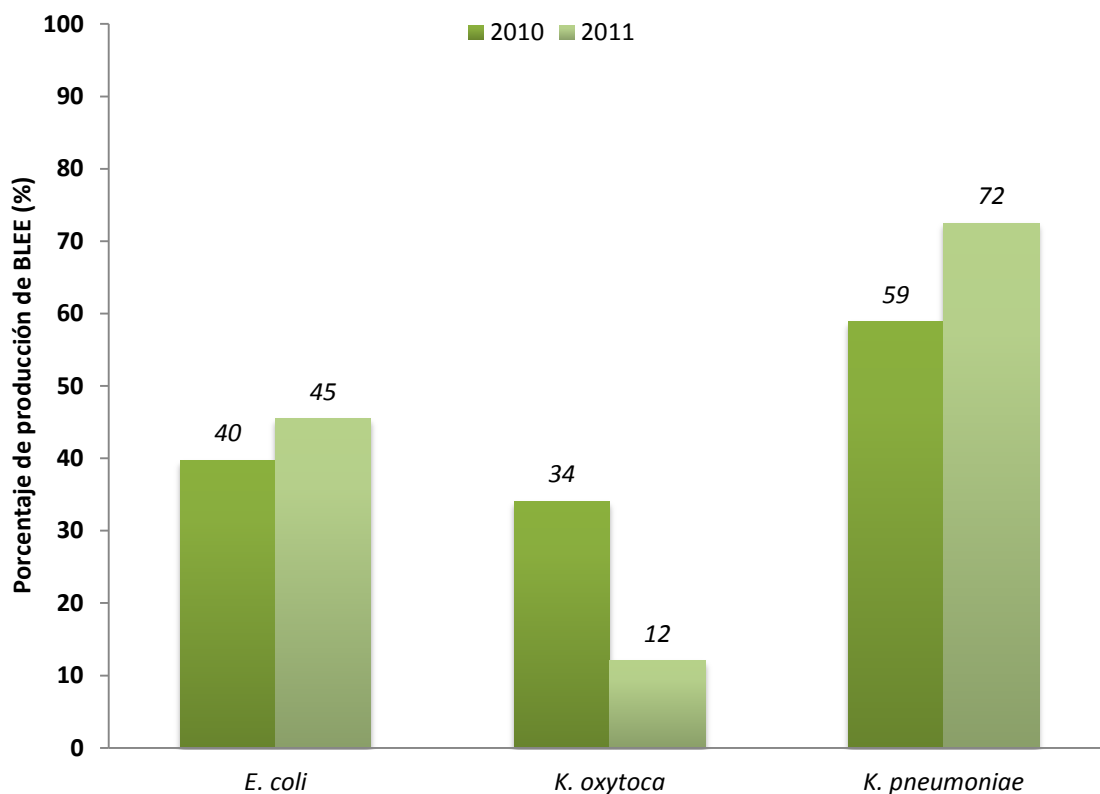
Gráfica 26.- Relación entre las diferentes muestras y la producción de BLEE correspondientes al análisis del 2011

Al obtener la relación de BLEE positivos y negativos por muestra procesada en el presente año, se obtuvo que las principales muestras cuyos aislamientos son productores de BLEE es el Líquido Pericárdico y el Pleural ya que el 100% de los aislamientos genero microorganismos productores de BLEE. Esto se vio seguido del LCR (82.76%), broncoaspirado (79.25%), catéter (78.95%), etc. Esta relación se presenta en su totalidad en el [Gráfica No. 38](#), que muestra la relación de los productores y no productores de BLEE en relación a las muestras comprendidas en este año de estudio.

Con respecto a la relación de cepas productoras de BLEE y las no productoras de BLEE con respecto al servicio hospitalario, se realizó el análisis por sala teniendo como criterio de selección un porcentaje mayor ó igual al 50% de cepas productoras de BLEE [Gráfica No. 39 a la 50](#) [\[Ver Graficas pág. \]](#).

b) Comparativo 2010 y 2011

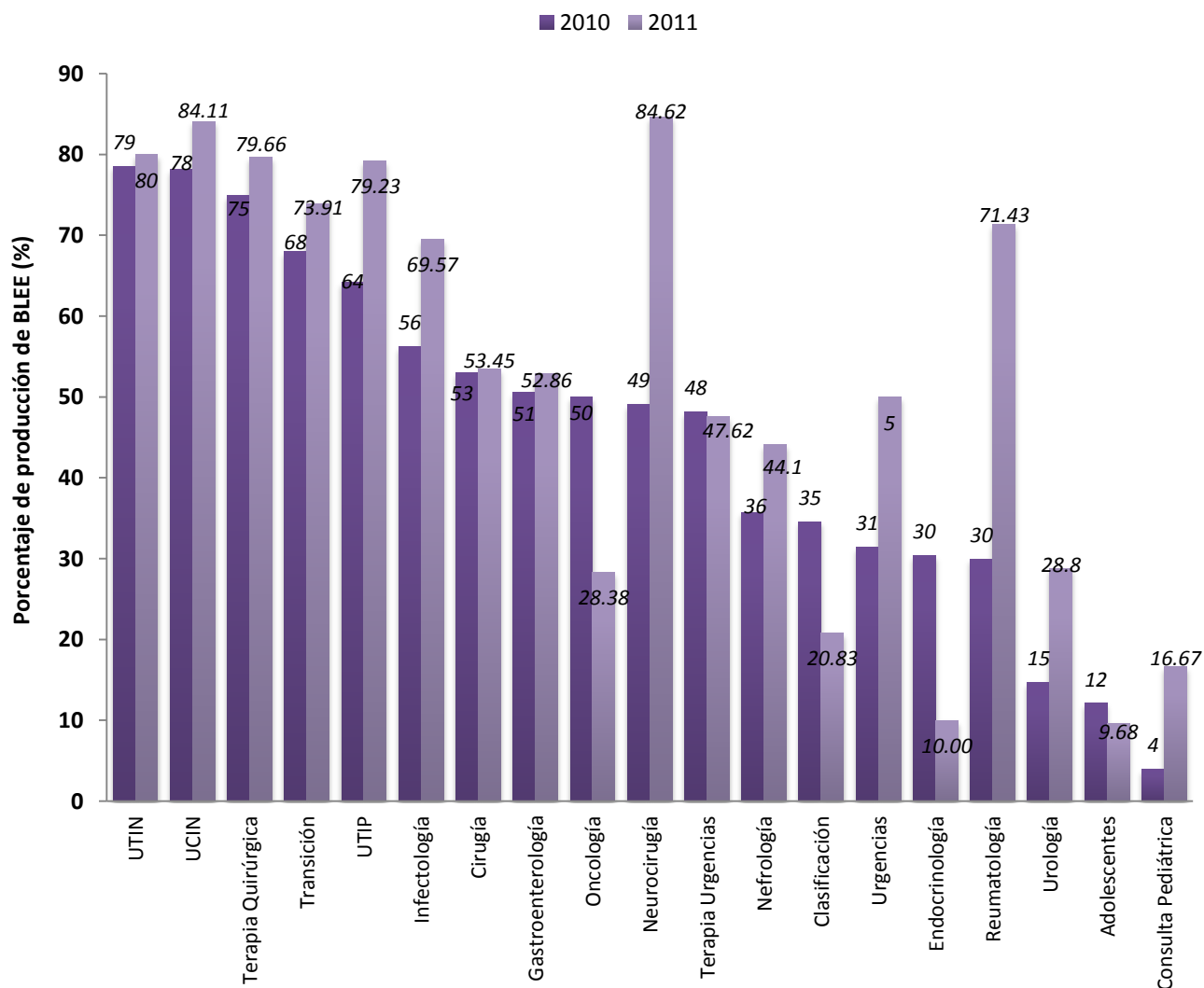
El análisis de ambos años se realizó comparando exclusivamente las cepas productoras de BLEE y los datos clínicos anteriormente mencionados para cada año. Considerando esto se comparó dicha producción de BLEE del 2010 y 2011 con respecto a los tres microorganismos de interés (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*) Gráfica No. 51.



Gráfica 27.- Producción de BLEE por cepas de Enterobacterias del 2010 y 2011

Para comparar la cepas productoras de de BLEE y los servicios hospitalarios anteriormente mencionados, se procedió a un análisis previo de concordancia de salas de análisis, con lo cual se obtuvo 19 salas con análisis compartido entre ambos años Gráfica No. 52.

Asimismo se procedió a la comparación de la producción de estas enzimas con respecto a los grupos de edad concordantes en cada año Gráfica No. 53, y a las muestras. Esta penúltima comparación se realizó comparando únicamente las muestras encontradas en ambos años Gráfica No. 54.



Gráfica 28.- Producción de BLEE por sala del 2010 y 2011

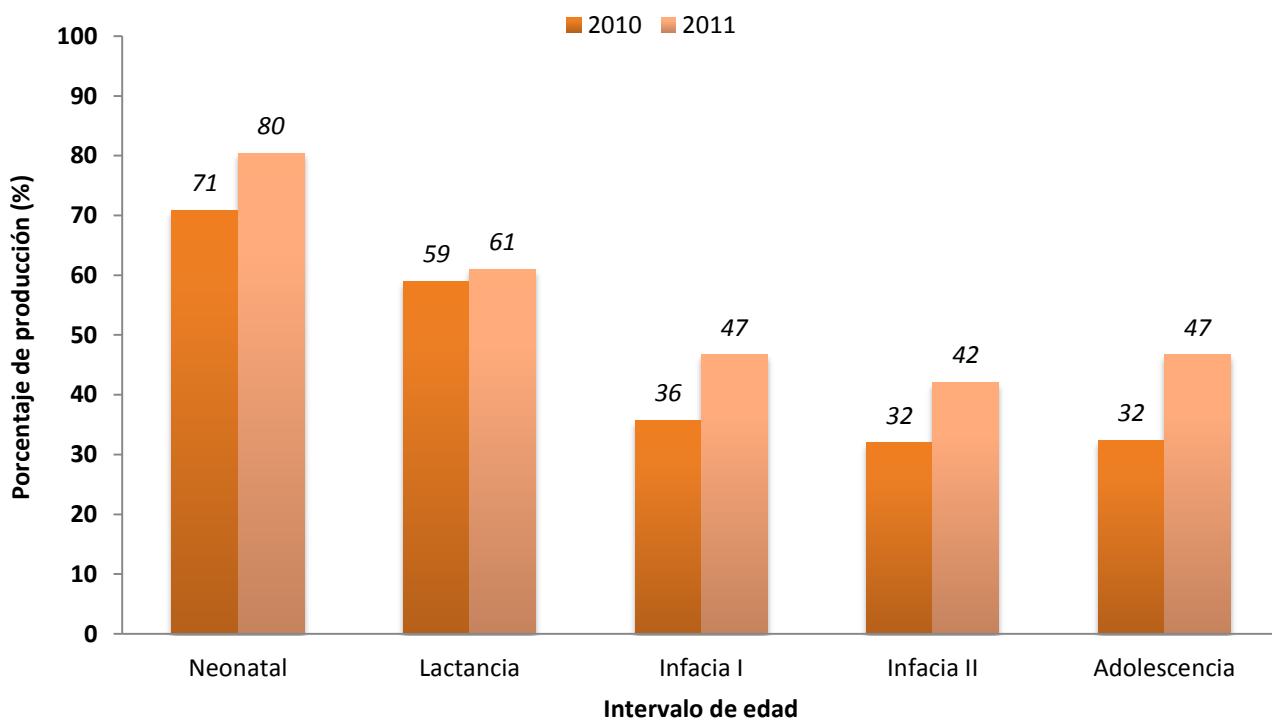
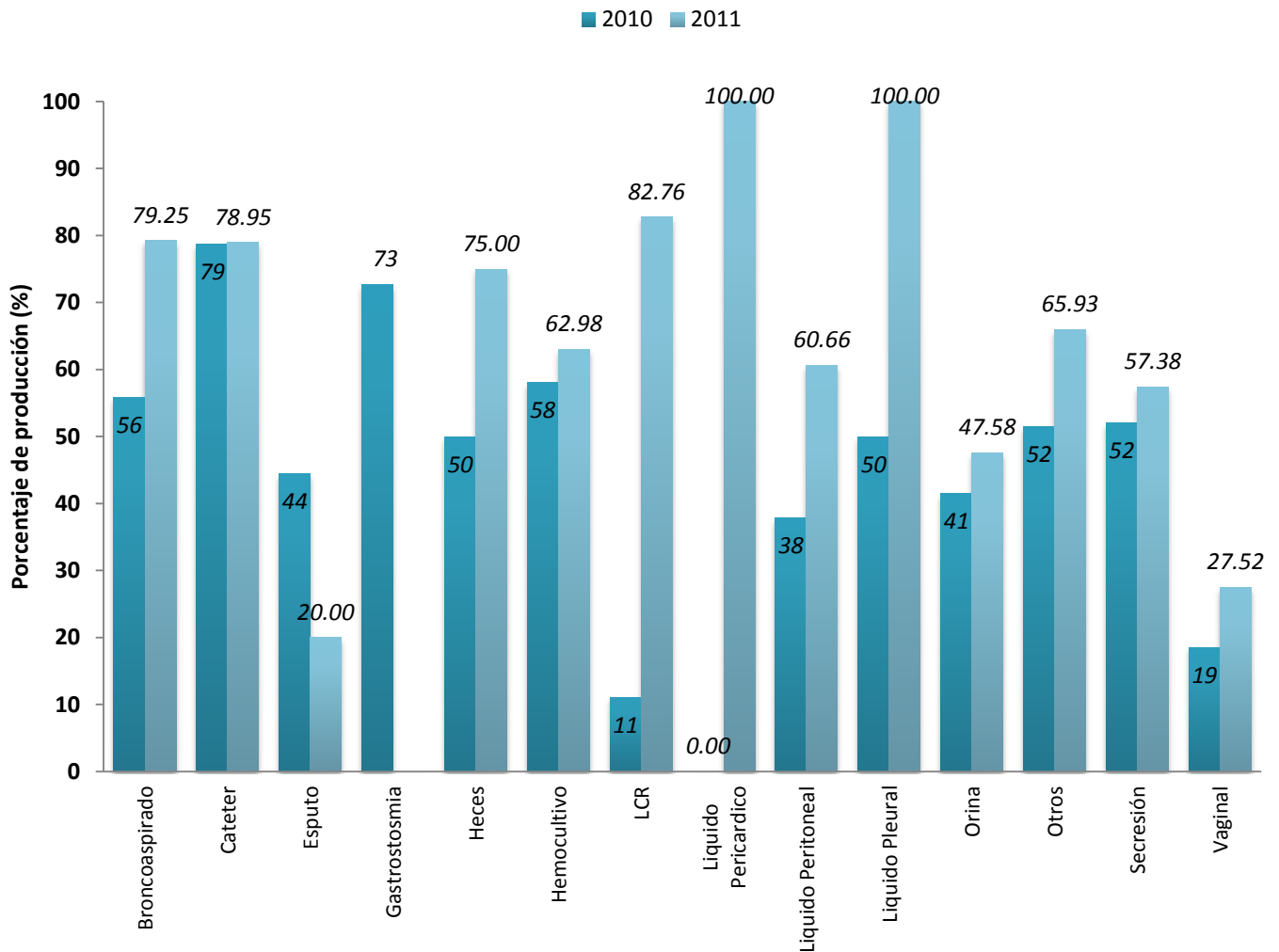
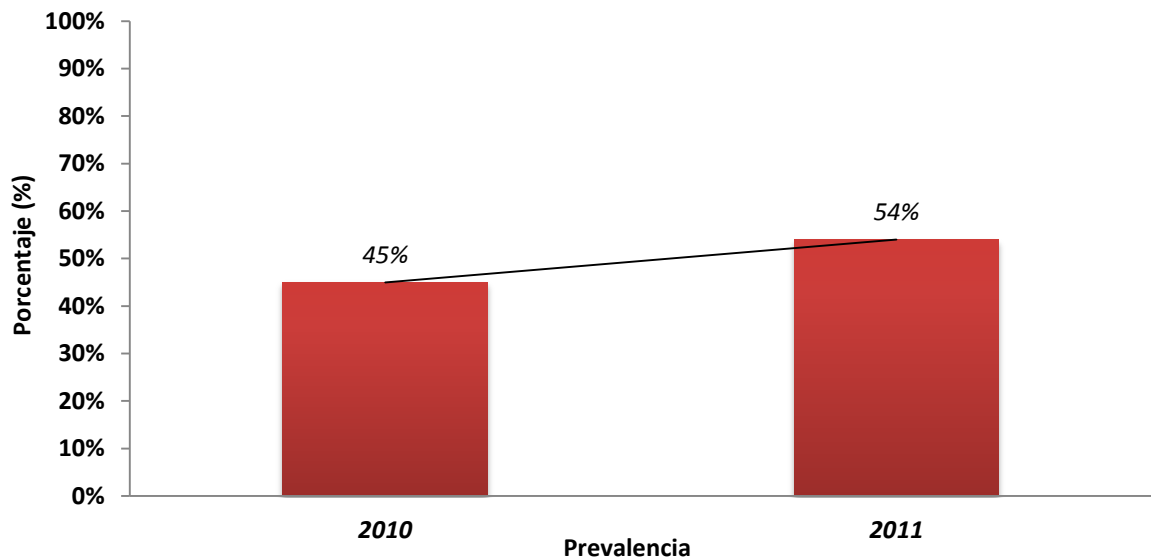


Gráfico 29.- Producción de BLEE por intervalo de edad de pacientes del 2010 y 2011



Gráfica 31.- Producción de BLEE por muestras del análisis del 2010 y 2011

Finalmente se compararon ambas prevalencias de infecciones por cepas productoras de BLEE (45% del 2010 en comparación del 54% del 2011) Gráfica No. 55. Con respecto a la presente comparación, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que la prevalencia de infecciones por cepas productoras de BLEE es mayor que la del 2010 (IC= 99%, N. S.= 0.01%, g. l.= 1, y $X_c^2 = 23.78$).



Gráfica 32.- Prevalencia de BLEE del 2010 y 2011

Discusión de Resultados

Las BLEE son enzimas que son producidas por diferentes géneros de enterobacterias como mecanismo de resistencia a los betalactámicos, especialmente a las Cefalosporinas de tercera generación, que son antibióticos de mayor uso en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. La producción de este tipo de enzimas actualmente constituye un problema epidemiológico, atribuido al constante aumento de su incidencia y prevalencia a nivel comunitario y hospitalario, y continua en crecimiento durante los últimos años en diversos países.

Es debido a esto que el presente estudio tuvo como primordial enfoque el conocer la prevalencia de cepas productoras de BLEE, para lo cual debe establecerse inicialmente la prevalencia que refleja directamente la frecuencia de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE con respecto al total de datos analizados, es decir, este parámetro epidemiológico comprende no solo el total de pacientes analizados ó con una sola muestra sometida análisis (71% en el 2010), sino que además esta dado por datos de pacientes con más de una muestra ó que sus resultados se encuentran más de una vez en los registros (29%). Es primordial señalar que estos porcentajes fueron similares en el 2011 (70% para pacientes analizados y 30% para pacientes con más de una muestra), por lo que puede aseverarse que los datos analizados para ambos años están dados por un número semejante de pacientes, aunque el total de datos analizados para cada año fue distinto (1590 en 2010 y 1711 en 2011).

Para lograr la descripción de la prevalencia, se procedió inicialmente a la descripción específica de los principales datos clínicos y microbiológicos de los pacientes con probable diagnóstico de infecciones de este tipo.

La edad de los pacientes analizados no tuvo variaciones significativas en ambos años ya que en el periodo de estudio establecido la mayor parte de las muestras analizadas para la determinación de presencia de enterobacterias productoras de BLEE procedían de pacientes pediátricos en la etapa de lactancia (35% en el 2010 y 28% en el 2011). Sin embargo este comportamiento no fue igual con respecto a los pacientes en las etapas de infancia I y adolescencia, ya que en el 2010 se tuvo un mayor frecuencia de

análisis de muestras de pacientes en infancia I seguido de pacientes en la etapa de adolescencia, cuando en el 2011 se observó lo contrario, presentándose ligero aumento de análisis de pacientes en la etapa de la adolescencia seguido de los pacientes en la etapa infancia I. A pesar de estas diferencias los pacientes en infancia II y neonatal fueron los menos analizados para la producción de BLEE en ambos años.

En los resultados obtenidos de la comparación de producción y no producción de BLEE con respecto a los diferentes grupos de edad se observa que en ambos años de estudio, esta producción decrece conforme aumenta la edad de los pacientes, esto permite plantear que para ambos años que conforman el periodo de estudio, los pacientes pediátricos que se encuentran en la etapa neonatal presentan un porcentaje elevado de infecciones por cepas productoras de BLEE, a diferencia los grupos de edad restantes (infantes y adolescentes) donde de la presencia de dichas infecciones se vio disminuida.

Al correlacionar con el número de cepas procesadas para análisis de BLEE en relación a los diferentes grupos de edad se puede aseverar que aunque se proceso un menor número de muestras de pacientes en edad neonatal, estas son significativamente importantes ya que fue en esta etapa es donde se encontró, en ambos años, una mayor frecuencia de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE; y aunque las muestras dadas por pacientes en la etapa de lactancia están encabezando el primer lugar de muestras procesadas, se destaca que estas se encuentran en segundo lugar en cuanto la presencia de dichas infecciones. Esto se considera un aspecto epidemiológico clave, ya que ambas etapas del desarrollo humano son consideradas como de mayor riesgo, puesto que existen diversos reportes de infecciones por cepas productoras de BLEE en pacientes en edad pediátrica, como es el caso de un estudio realizado en E. U., donde se estableció a las infecciones por microorganismos productores de BLEE en pacientes pediátricos como un problema emergente, encontrándose principalmente en niños menores de 4 años (50% de los niños menores de 2 años de edad) procedentes de la sala de Urgencias y ambulatorios; rango de edad que cabe señalar se encuentran dentro de la etapa neonatal, lactancia e infancia descritas en el presente estudio de prevalencia. También es importante señalar que el estudio se realizó en un centro médico de tercer nivel donde además se demostró que la tasa de producción de

BLEE aumento del 0.53% en la primera mitad del periodo de estudio hasta el 1.4% (Blaschke, Et al, 2009). Es importante señalar que la investigación antes citada realizada afirmó que los factores de riesgo que fueron asociados al aumento de la incidencia de este tipo de infección son: condición media crónica, existencia de alguna anomalía anatómica, hospitalización prolongada, historial de infecciones recurrentes, bajo peso al nacer o prematuridad, además de que todos los niños en la etapa de lactancia tenían infecciones mortales. Estas condiciones ó características las poseen los pacientes que conforman este estudio de prevalencia ya que son pacientes que también se encuentran en un hospital de tercer nivel, la gran mayoría hospitalizados y con diversas enfermedades previas a dicha infección, sin embargo, no puede asegurarse que pacientes poseen estas características y cuales no ya que en el presente estudio no se están considerando el análisis de dichas características.

La muestra más analizada para la producción de BLEE fue en ambos años la Orina, seguida de las muestra sanguíneas (Hemocultivo) lo que convierte a ambas como las principales especímenes de estudio para la detección de este tipo de enzimas, fenómeno que ha sido observado en diversos estudios a nivel mundial, como lo es el realizado en Taiwán donde ambas muestras señaladas eran las principales muestras analizadas para la presencia de *E. coli* productor de BLEE (Sung, Et al, 2010). A la par otros estudios han reportado la importancia de ambas muestras para el análisis de presencia de estos microorganismos ejemplo de ello es el reporte realizado en Canadá, donde la presencia de *E. coli* productora de BLEE fue analizada en muestras como son la orina, sangre, vías respiratorias y heridas (Baudry, 2009). Asimismo existen otras investigaciones que han destacado la elevada frecuencia de aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE en estas muestras (Turner, 2011; Nedjai, Et al, 2012; Un-In, W., Et al, 2010; Blaschke, Et al, 2009; Trecarichi, Et al, 2009). La siguiente muestra de interés para ambos años fue diferente ya que para el 2010 la muestra en tercer lugar de análisis fueron las muestras de origen Vaginal seguida de los aislamientos provenientes de Catéter, orden que se invirtió en el 2011. Se obtuvo una notable disminución de Broncoaspirados analizados, del 4.21% en el 2010 y del 3.10% en el 2011; esta muestra respiratoria ha sido destacada como una fuente importante de aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE, siendo imprescindible en la

determinación del incremento de este tipo de infecciones tanto a nivel hospitalario como comunitario (Jacobsa, 2009).

Las muestras de Líquido Peritoneal incrementaron del 2010 al 2011 (del 2.33% al 3.57%) igual que el LCR (del 0.57% al 1.69%). Es importante señalar que esta frecuencia de análisis también se debió a factores característicos de cada una de las salas y que además esta frecuencia se ve influenciada por los diversos padecimientos y condiciones de los pacientes. Con relación a lo mencionado anteriormente el área del laboratorio de bacteriología que procesó la mayor parte de cepas en el periodo de estudio fue el área de urocultivos, puesto que en ambos años esta área de laboratorio procesó el mayor porcentaje de muestras, seguido del área de diversos y hemocultivos, lo que se relaciona directamente con las muestras procesadas para cada año y con la frecuencia de análisis de las muestras que se procesan de forma rutinaria en el laboratorio, sin embargo diversos estudios realizados en el país han definido la muestra de orina como el espécimen mayoritariamente analizado para la presencia de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE, siendo por tanto la principal muestra donde se encuentran a este tipo de microorganismos (Silva, Et al. 2011; Garcíadiego, 2011; Navarro, Et al, 2010, Pérez, 2010; Aceves, 2009).

La comparación entre la producción y no producción de BLEE permite observar que en el año 2010 la principal muestra con presencia de cepas productoras de BLEE es la proveniente de Catéter, porcentaje que prácticamente se mantuvo en el 2011. En base a las graficas anteriormente mencionadas, se puede aseverar que en el 2011 existió un aumento de más del 50% en las cepas procedentes de Líquido Pericárdico, LCR, Líquido Pleural, Heces, Broncoaspirado y Líquido Peritoneal con respecto al 2010; observándose por tanto que las principales muestras de las que se aislaron microorganismos productores de BLEE en el 2011 son las el Líquido Pericárdico y el Líquido Pleural, siendo estos aumentos los más significativos ya que pasaron de un 0% de presencia de cepas productoras de esta enzima en el primer año a un 100% en el segundo año de estudio, lo cual ha sido corroborado en diversas investigaciones realizadas a nivel mundial como la reportada por Wen-Chien, quien analizando a diversos pacientes de procedentes países como Europa, China, Corea, Australia y Nueva Zelanda, reportó la presencia de microorganismos productores de BLEE en

muestras procedentes de paracentesis (Wen-Chien, 2009). Además las muestras procedentes de la región abdominal han sido gran punto de interés en investigaciones realizadas en el continente americano, siendo consideradas como importantes fuentes de aislamiento de microorganismos productores de BLEE, lo cual fue afirmado en un estudio SMART realizado en América Latina donde se reportaron altas tasas de enterobacterias productoras de BLEE en muestras procedentes de infecciones intra abdominales, de apéndice, peritoneo, colon, bilis, pelvis y páncreas (Villegas, Et al, 2011). Las muestras de origen pleural también han sido consideradas dentro de los análisis de presencia de estos microorganismos, siendo destacables en cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE en pacientes hospitalizados (Nedjai, Et al, 2012).

Es importante mencionar que aunque en el 2010 las muestras de Gastrostomía tenían un porcentaje significativo de producción de BLEE, este se vio modificado en el 2011 donde todas las muestras analizadas dieron negativo a la producción de esta enzima contribuyendo finalmente a un decremento en la frecuencia de BLEE, fenómeno que también se observó en las muestras de Esputo, muestra que presentó una disminución de casi la mitad de cepas productoras de dicho mecanismo de resistencia. La muestra que presentó un aumento considerable de enterobacterias productoras de BLEE fue el LCR, ya la frecuencia de cepas productoras de BLEE en el 2010 (11.11%) fue menor comparada con la del 2011 (82.76%), llegando a ocupar el tercer lugar en producción de esta enzima de este año, lo que a su vez se corrobora con lo anteriormente establecido, sin embargo dicho aumento en este tipo de muestras es contrario a lo que se reporta en la literatura ya que no solo existen pocos reportes que describan el análisis de presencia de enterobacterias productoras de BLEE en el LCR, sino además los escasos reportes referentes a este tema que a su vez señalan un menor porcentaje de frecuencia de cepas productoras de esta enzima que van de un 8.2% (Silvia-Sánchez, J. Et al. 2011) a 2.31% considerándose el LCR dentro de la categoría “Otras muestras” de acuerdo lo reportado por Garciadiego, 2011. Otras muestras que presentaron un aumento de aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE fueron los broncoaspirados, heces, vaginal, hemocultivo, orina y secreción. Cabe destacar que los exudados faríngeos presentaron un porcentaje nulo de producción de BLEE, manteniéndose en el 2011, por lo cual puede asegurarse que esta fue una de las

muestras que conservo su inexistente presencia de cepas productoras de BLEE en el periodo de estudio. Esto en general demuestra que aunque las muestras más examinadas para la producción de BLEE fueron para ambos años orina y hemocultivo, estas no fueron las principales fuentes de aislamientos productores de BLEE.

En cuanto al análisis de microorganismos, se obtuvieron porcentajes similares en cuanto al procesamiento de cepas de *E. coli* del 2010 (68%) al 2011 (66%), esta frecuencia de análisis fue similar a lo establecido en otros estudios, que afirman que este microorganismo es el de comúnmente analizado para la producción de este tipo de enzima como mecanismo de resistencia a antibióticos (Cordero, 2009; Wen-Chien, 2009). Los microorganismos que mostraron variaciones en su correspondiente frecuencia de análisis fueron *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, ya que el primero mostro un ligero incremento del 3% del 2010 al 2011, siendo el segundo microorganismo el que presentó una disminución del 1% en frecuencia de aislamiento. En general puede aseverarse que la frecuencia de análisis de cepas analizadas para producción de BLEE no presento grandes variaciones.

Tomando en cuenta estas tres enterobacterias y su relación entre la producción y no producción de BLEE, se puede afirmar que las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* incrementaron su correspondiente frecuencia de cepas productoras de BLEE ya que el 2010 mostraron una frecuencia de 39.74% y 58.84%, porcentajes que aumentaron en el 2011 hasta un 45.47% y 72.50% respectivamente, es necesario destacar que estos aumentos de frecuencia de producción de BLEE son significativamente superiores a la frecuencia de análisis anteriormente mencionada, por lo que dicha frecuencia y la producción de BLEE se consideran independientes.

Es por tanto destacable que *K. pneumoniae* es la enterobacteria con mayor producción de BLEE en el periodo de estudio. En este aspecto, existen algunas publicaciones recientes a nivel nacional que indican el aumento en esta proporción Navarro, Et al, 2010, que afirma que *K. pneumoniae* es la enterobacteria productora de BLEE de origen nosocomial con mayor frecuencia de aislamientos (56.0%) en hospitales mexicanos, seguida de *E. cloacae* (29.0%) y *E. coli* (15.0%). También existen reportes nacionales que aseveran que las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE son de

más frecuente aislamiento en los Hospitales de México, ya que en un estudio retrospectivo y multicéntrico realizado en 8 diferentes hospitales del país, la frecuencia de aislamiento de este tipo de microorganismos fue del 56%, a diferencia de las otras enterobacterias analizadas (*E. coli* 35% y *Enterobacter cloacae* 29%) (Silvia-Sánchez, J. Et al. 2011). Inclusive se puede afirmar que este microorganismo sigue siendo el principal productor de este tipo de enzimas en el HIMFG, ya que en un estudio realizado en este mismo hospital, *K. pneumoniae* fue la enterobacteria con mayor porcentaje de producción de BLEE con un promedio de producción de 45.3% y 32.3% para *E. coli*, lo cual confirma a este microorganismo como el principal productor de BLEE en este ambiente hospitalario (Cordero, 2009).

El presente estudio reporta una frecuencia de *K. pneumoniae* productor de BLEE que rebasa lo establecido para este microorganismo en el estudio SENTRY para América Latina, el cual es del 45%. Asimismo existen diversos reportes alrededor del mundo con diferentes frecuencias de *K. pneumoniae*: el proyecto SENTRY que comprendió desde 1997 hasta 1999, señala un mayor porcentaje de BLEE en cepas de *K. pneumoniae* del 25% para el Pacífico y el 20% para Europa; siendo menor en Estados Unidos (8%) y Canadá (5%). Conjuntamente reportes de América latina, Asia y Norte América han establecido que *K. pneumoniae* es el productor de BLEE más frecuentemente aislado de muestras clínicas. Si se consideran los reportes publicados por Colombia en el 2004 que mostraron una prevalencia de cepas productoras de BLEE del 18.6%; donde igualmente la prevalencia de *E. coli* fue de 9.5%, de *K. pneumoniae* 43.5% y *K. oxytoca* del 10.3%, y el reporte publicado en el 2006 en Tailandia donde la prevalencia de BLEE en *K. pneumoniae* fue de 44.4%, *E. coli* 5.1% y *E. cloacae* de 15.4% (Aceves, 2009), la prevalencia de cepas productoras de BLEE reportada en el presente estudio para este microorganismo es mayor a lo establecido en otros estudios realizados a nivel mundial e inclusive rebasa lo establecido anteriormente para el continente americano.

No obstante estas publicaciones no son las únicas que refieren a *K. pneumoniae* como principal productor de BLEE, ya que este es el mismo comportamiento epidemiológico observado a nivel mundial, ejemplo de ello es un estudio realizado en Algeria con cepas recolectadas en el 2009 donde se refiere no solo una aparición de cepas de *K.*

pneumoniae como las principales productoras de BLEE, considerando su comportamiento en comparación con la producción de esta enzima en cepas de *Enterobacter* y *Serratia*; sino que además las infecciones por este tipo de microorganismos se asocian a una tasa de mortalidad del 18.4% y una prevalencia global del 31.4% (Nedjai, Et al, 2012). En un estudio realizado en Taiwán se afirma que en todo el mundo *Klebsiella spp.* Sigue siendo el microorganismo predominante de producción de BLEE (Sung, Et al, 2010). Igualmente el estudio SMART realizado en 2008 que comprendió a países de Latinoamérica como son Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Republica Dominicana, Guatemala, Panamá, Perú, Venezuela y México, afirmó no solo que la prevalencia de infecciones por *K. pneumoniae* (37.7%) es mayor que la de *E. coli* (26.8%) y *K. oxytoca* (20%); sino que además la tasas de producción de BLEE son más altas a comparación de lo reportado en estudios anteriores en la región sudamericana (SENTRY 1997-1998, TEST 2004-2006, MYSTIC del 1998-2003, entre otros estudios que abarcan diversas áreas como son Brasil, Colombia y SMART de Asia y Pacifico). Este mismo reporte asegura que la frecuencia de *E. coli* y *Klebsiella spp.* productoras de BLEE en América Latina es mayor que estudios anteriores: SMART 2003 10% para *E. coli* y 14% para *K. pneumoniae*; y SMART 2004 10% para *E. coli* y 18% para *K. pneumoniae*; por lo cual la frecuencia de producción de BLEE en este continente ha ido en aumento, en especial *K. pneumoniae* (Villegas, Et al, 2011). En base a lo anteriormente expuesto, aunque la prevalencia de cepas productoras de BLEE reportada en el presente estudio para *K. pneumoniae* son elevadas, esta frecuencia sigue las tendencias actuales, que como se ha descrito anteriormente, van en aumento progresivo a nivel mundial.

Las cepas de *K. oxytoca* revelaron una disminución significativa en cuanto a la producción de BLEE ya que en el 2010 mostraron una frecuencia de producción 34.09%, valor que se vio disminuido en el 2011 (12%); considerando este porcentaje, debe mencionarse que resulta mayor a lo anteriormente reportado, puesto que en un estudio retrospectivo publicado por Strenger y colaboradores, se obtuvo una frecuencia del 0.11% en aislamientos de *K. oxytoca* productor de BLEE de materia fecal procedente de neonatos (Strenger, Et al, 2011). Asimismo el estudio retrospectivo

SMART del 2008 anteriormente mencionado reportó una frecuencia de producción de BLEE del 20% para este microorganismo (Villegas, Et al, 2011).

El número de salas analizadas fue similar en ambos años, sin embargo, el número de muestras procesadas con respecto a cada servicio hospitalario fue diferente, es decir, mientras en el 2010 la sala de Nefrología aportó el mayor número de muestras para análisis de cepas productoras de BLEE (N=249), en el 2011 este número se vio incrementado (N=356), hecho que se vio reflejado en el aumento de muestras analizadas para cada año. En este sentido diversos servicios hospitalarios también mostraron un aumento en diferente grado en cuanto al número de muestras a analizar los cuales fueron Urgencias, Urología, UTIP, Medicina Interna, Neurocirugía, Terapia Quirúrgica e Infectología. Las salas que mostraron una disminución de muestras a analizar fueron Cirugía, UCIN, Gastroenterología, Oncología, Terapia de Urgencias, Adolescentes, Clasificación, Consulta Pediatría, Transición y Endocrinología. Las salas que mostraron una disminución de muestras a analizar fueron Cirugía, UCIN, Gastroenterología, Terapia de Urgencias, Adolescentes, Clasificación, Consulta Pediátrica, Transición y Endocrinología. Esta variabilidad es atribuida a la demanda de cada servicio en particular.

Es importante mencionar que la categoría "Otras salas" determinada en el presente estudio también vio incrementado el número de muestras para su análisis, sin embargo se debe considerar que esta categoría está conformada de los datos de diversas salas por lo que su composición no resulta homogénea para cada año del periodo de estudio, lo que convierte a esta categoría en incomparable con respecto a las demás salas, no obstante las salas de Cardiología, Neumología, Pediatría y Corta Estancia vieron reducido el número de muestras a analizar del 2010 al 2011 a tal grado que quedaron comprendidas en la categoría "Otras salas".

Comparando la producción y no producción de cepas productoras de BLEE de los servicios analizados en el 2010 puede observarse que las tres salas con mayor producción de estas enzimas son UTIN, UCIN y Terapia Quirúrgica, contrariamente a lo observado en el 2011 donde los principales servicios hospitalarios fueron Neurocirugía, UCIN y Medicina Interna. En general, la mayoría de las salas mostraron un mayor

número de cepas productoras de BLEE (Reumatología, Neurocirugía, Urgencias, UTIP, Urología, Infectología, Consulta Pediátrica, Medicina Interna, Nefrología, UCIN, Transición, Terapia Quirúrgica, Gastroenterología, UTIN y Cirugía) del 2010 al 2011, pero realizando un análisis específico las salas que mostraron un aumento de más del 15% del 2010 al 2011 fueron los servicios hospitalarios de Reumatología, Neurocirugía, Urgencias y UTIP, y los servicios hospitalarios que presentaron una producción menor a al 15% fueron Urología, Infectología, Consulta Pediátrica, Medicina Interna, Nefrología, UCIN, Transición, Terapia Quirúrgica, Gastroenterología, UTIN y Cirugía. Conjuntamente al aumento de estas cepas, las salas que presentaron disminución en cuanto al aislamiento de cepas productoras de BLEE fueron en orden descendente las salas de Oncología, Endocrinología, Clasificación, Adolescentes y Terapia Quirúrgica.

Considerando el análisis particular de la UTIN del 2010, se observa que el porcentaje de cepas productoras de BLEE se encuentra distribuido en general en todas las muestras remitidas de esta sala para su respectivo análisis, y en el particular caso de los Broncoaspirados se observa que en estos se encontró solamente 2 bacterias (*E. coli* y *K. pneumoniae*) presentándose en ambos un porcentaje equivalente de producción de BLEE (14.29%). Asimismo se observa que la muestra remitida de esta sala correspondiente a Catéter posee ambos microorganismos, sin embargo el mayor porcentaje de productores de BLEE es por parte de *E. coli* (7.14%). La Orina fue la mayor muestra procesada de esta sala, la cual mostró la presencia de los microorganismos antes mencionados, todos productores de BLEE (21.43%) [Gráfica No. 14](#). Con respecto al análisis formulado en el año 2011, se observa que la mayor frecuencia de cepas productoras de BLEE se encuentra en el Hemocultivo (40%), seguida de la muestra de Orina (30%) y Catéter (10%). Es importante señalar que los Hemocultivos no solo poseen la mayor frecuencia de BLEE sino que esta proporción pertenece solamente *K. pneumoniae*, siendo todas las cepas de *E. coli* aisladas de esta muestra no productores de esta enzima. Asimismo se puede observar que las muestras de Orina remitidas de esta sala presentaron cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, a diferencia del 2010, donde se encontró a este microorganismos y a *E. coli* como productores de BLEE [Gráfica No. 42](#). La muestra de Catéter fue una de las muestras

comparables para ambos años, sin embargo en esta se observa que en el 2010 el único productor de BLEE fue *E. coli*, al contrario del 2011 donde se encontró a *K. pneumoniae* como principal productor de esta enzima. La sala de UTI en general ha sido analizada en otras investigaciones, siendo importante en pacientes pediátricos (Blaschke, Et al, 2009) ya que, como se había mencionado anteriormente, la estancia en este servicio hospitalario ha demostrado ser un factor de riesgo en la adquisición de infecciones por cepas de enterobacterias productoras de BLEE. A nivel nacional, en la investigación realizada por Aceves, 2009, se reportó una frecuencia del 40% en cepas de *E. coli* productoras de BLEE, procedentes principalmente de diversos cultivos respiratorios y de urocultivo, muestras que igualmente fueron analizadas en esta sala en el presente estudio. Considerando lo establecido en la investigación citada y de acuerdo al aumento general del 7.43% de cepas productoras de BLEE del 2010 (78.57%) al 2011 (80%) en este servicio hospitalario, puede aseverarse que no solo existe una mayor cantidad de cepas productoras de esta enzima, sino que además contrariamente a lo establecido en la investigación anterior, se tiene a *K. pneumoniae* como principal productor en el año 2011.

En el análisis de producción de BLEE derivado de la sala UCIN, se observa que de este servicio hospitalario se analizaron para el año 2010, fueron 11 diferentes tipos de muestras, teniéndose la muestra de Orina como la mayormente procesada de la cual se encontraron los tres microorganismos de estudio siendo el mayor productor de BLEE *K. pneumoniae* (23.53%), seguido de *E. coli* (11%) y *K. oxytoca* (2.52%), siendo este último productor de BLEE en su totalidad. Las siguientes muestras de las cuales se aisló microorganismos BLEE positivos fueron Catéter y Hemocultivo, de la cual se aislaron únicamente *K. pneumoniae* y *E. coli*, siendo el primero, el principal microorganismo productor de BLEE Gráfica No. 15. Al comparar esta misma sala en el 2011 no solo puede observarse un aumento del 5.96% del 2010 (78.15%) al 2011 (84.11%), sino que además la principal muestra con microorganismos productores de BLEE fue la Orina, al igual que en el 2010, *K. pneumoniae* (25.23%) fue el de mayor productor de esta enzima, seguido de *E. coli* (14.95%), sin embargo se obtuvo una nula presencia de cepas de *K. oxytoca*. Se observó el mismo comportamiento del 2010 y del 2011 en cuanto a las muestras de Catéter y Hemocultivo ya que también se aisló a *K.*

pneumoniae como principal productor de BLEE [Gráfica No. 40](#). Es en base a esto que puede afirmarse que el comportamiento de esta sala fue constante en el periodo de estudio establecido. En general la UCI ha sido un punto clave en la adquisición de infecciones causadas por este tipo de microorganismos, puesto que se ha confirmado en diversas ocasiones a nivel internacional como la principal unidad de la cual se han aislado un mayor número de cepas productoras de BLEE en diversos grupos poblacionales, como lo es el estudio CANWARD efectuado en el 2008 en Canadá, el cual reveló una frecuencia de estos microorganismos del 7.5%, siendo el servicio con mayor porcentaje de aislamientos ([Baudry, 2009](#)). Una investigación efectuada del 2003 al 2006 en Brasil, permitió establecer la importancia de la estancia en esta sala en la adquisición de este tipo de infección en pacientes en la etapa neonatal, pediátrica y adultos ([Wollheim, Et al, 2011](#)). Esta sala posee vital importancia porque existen diversos reportes que confirman aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* con dicho mecanismo de resistencia provenientes de pacientes pertenecientes a esta salas ([Sung, Et al, 2010](#); [Nedjai, Et al, 2012](#)), hecho que es significativo a nivel epidemiológico ya que significa que en este servicio hospitalario se pueden adquirir cepas pertenecientes a diferentes géneros bacterianos, fenómeno que se corroboró en el presente estudio de prevalencia, ya que de esta sala se aislaron cepas productoras de BLEE pertenecientes a estos dos géneros de enterobacterias. Particularmente la sala de UCIN ha sido un punto clave en diversos estudios, ya que como se mencionó anteriormente, esta sala alberga a pacientes con condiciones que son consideradas como factores de riesgo relacionados con este tipo de infecciones, como lo es la investigación realizada por [Blaschke, Et al, 2009](#), anteriormente citada, que menciona la relación estrecha de los pacientes de esta sala con el aumento en la incidencia de este tipo de infecciones pacientes menores de 5 años. A nivel nacional también se ha establecido esta afirmación, sin embargo se han reportado niveles de frecuencia de aislamientos productores de BLEE bajos, en comparación con los porcentajes anteriormente establecidos, ya que en el trabajo de investigación realizado por [Pérez, 2010](#), en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, se señaló una frecuencia de microorganismos productores de BLEE del 3.8%, del cual se reporto un 5% como frecuencia de cepas pertenecientes a *K. pneumoniae* productoras de esta enzimas; porcentajes que son significativamente menores a los establecidos en este estudio.

De forma particular puede asegurarse que la frecuencia de cepas de enterobacterias productoras de BLEE en la sala de Terapia Quirúrgica aumento en un 4.65% del primer año de estudio (75%) al segundo (79.66%). En el análisis de estas sala correspondiente al año 2010, los microorganismos productores de BLEE se encontraron en todas las muestras procesadas, siendo las principales: Orina, Catéter y Hemocultivo; los cuales presentaron mayor cantidad de estas enterobacterias, en este sentido se observa que, en general, *E. coli* fue el principal microorganismo productor de este tipo de enzimas [Gráfica No. 16](#). El análisis específico de la misma sala correspondiente al 2011 reveló en general un aumento de estas cepas en todas las muestras. Es preciso destacar a las muestras de Hemocultivo y Broncoaspirado, donde de ellas se aislaron con mayor frecuencia cepas de *K. pneumoniae* productor de BLEE [Gráfica No. 43](#), lo que es indicativo de que en general en esta sala se dio un aumento en la cantidad de cepas productoras de esta enzima. En ambos años la principal muestra analizada procedente de esta sala fue la Orina, la cual presento a *E. coli* como mayor productor de BLEE, con un porcentaje de producción similar en ambos años, sin embargo en los resultados obtenidos del 2011 se observa no solo una aumento en la presencia de *K. pneumoniae* sino que el porcentaje de cepas no productoras de BLEE se vio disminuido, dando paso a un mayor porcentaje de productores de BLEE ó cepas BLEE positivas. Con respecto a la muestra de Catéter, se observa que en el 2010 esta solo tenia la presencia de *E. coli*, la cual poseía un porcentaje relativamente alto de producción de BLEE, sin embargo para el 2011 la misma muestra presento tanto *E. coli* como *K. pneumoniae*, ambos microorganismos exclusivamente productores de BLEE en su totalidad.

Considerando el análisis de la sala de Medicina Interna respectivo al 2010, se obtuvo que la principal muestra con microorganismos productores de BLEE fue la de Orina de la cual se obtuvieron solo 2 enterobacterias de interés, *E. coli* y *K. pneumoniae*, siendo la primera, el mayor productor de betalactamasas de este tipo (32.31%). De la muestra de Catéter también se aislaron ambos microorganismos, siendo además *E. coli* el principal productor con una frecuencia de 9.23% [Gráfica No. 17](#). Comparando los resultados de ambos años en la misma sala se observa no solo un aumento del número de 9.51% del 2010 (72.31%) al 2011 (81.82%) de este tipo de microorganismos; sino además un aumento en el número y tipo de muestras analizadas el cual fue de 5

categorías en el 2010 a 8 categorías en el 2011, presentándose además en este año un aumento de producción de BLEE en *E. coli* proveniente de Orina, siendo también la muestra con mayor frecuencia de aislamiento de este tipo de microorganismos. Cabe mencionar que la frecuencia de cepas productoras de BLEE del 2011 en las otras muestras se encontró disminuida con respecto a la observada en el 2010 fenómeno que destaca aun más la variación en cuanto al número de muestras analizadas [Gráfica No. 41](#); además es imprescindible revelar que no existen publicaciones con análisis de estas cepas en esta sala por lo cual solo se disponen de los datos anteriormente expuestos como base para un análisis tanto particular como global.

En el análisis de producción de BLEE proveniente de la sala de Transición para el 2010 se observó al igual que en los servicios hospitalario anteriores, que la principal muestra fue la Orina en la cual se observó un mayor porcentaje de producción de BLEE por parte de *K. pneumoniae* (32%), seguido de *E. coli* (16%), este ultimo microorganismo con un porcentaje mayor de no productores de BLEE (20%). Para este año todas las muestras analizadas procedentes de esta sala demostraron ser productoras de BLEE, excepto las muestras de secreciones de la que solo se aisló *E. coli* no productor de BLEE [Gráfica No. 19](#). Considerando la misma sala en el segundo año de estudio puede confirmarse un incremento general de este tipo de cepas del 5.91%, puesto que en el 2010 se presento una producción del 68% siendo en el 2011 del 73.91%. En cuanto a la muestra de Orina para el 2011, se observó una disminución en el porcentaje de producción de la enzima en cuestión, sin embargo puede afirmarse que la producción de esta enzima por *E. coli* y *K. pneumoniae* fue equivalente (8.70%) en esta muestra en el año mencionado. La presente sala también presentó en este año de estudio una exclusiva producción de este tipo de enzimas en las muestras de Catéter, Hemocultivo y Líquido Peritoneal, llegando a presentar en la primera muestra mencionada ambos microorganismos con un elevado porcentaje de frecuencia (13.04% y 17.39% respectivamente) [Gráfica No. 45](#) a comparación del 2010 (4% y 0% respectivamente), además se puede observar la aparición en el análisis de Líquido Peritoneal el cual mostró la presencia de *E. coli* exclusivamente productor de BLEE. Al igual que el servicio hospitalario anteriormente descrito, esta sala no cuenta con descripciones en

cuanto a la frecuencia de las enterobacterias de estudio, por lo que los datos presentados no pueden ser comparados con los expuestos.

Con respecto al análisis del 2010 correspondiente a la sala de UTIP, manifestó no solo una presencia de cepas productoras de BLEE aisladas de todas las muestras remitidas en el año de estudio, sino además una elevada cantidad de cepas de *E. coli* productoras de esta enzima procedentes de los Broncoaspirados de los pacientes remitidos de este servicio (frecuencia de 11.94%). Inclusive cabe destacar que las muestras procedentes de Catéter presentaron en este año a los tres microorganismos del estudio, todos productores de esta enzima en su totalidad. De forma contraria a lo reportado en otras salas, las muestras de Orina presentaron un mayor porcentaje de cepas no productoras de BLEE, presentándose en menor frecuencia los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de la enzima [Gráfica No. 21](#). En el análisis del año 2011 en la misma sala reportó aumento del 15.05% en las cepas productoras de BLEE (79.23%) con respecto al primer año de estudio (64.18%); aumento que se vio reflejado con más énfasis en la muestra de Orina, de la cual se aisló *K. pneumoniae* como principal productor (15.38%); inclusive puede corroborarse una disminución en las cepas no productoras de BLEE [Gráfica No. 44](#). Es en este análisis aparece un tipo diferente de muestras no analizadas para el año 2010: el LCR, el cual presentó como principal productor de BLEE a *K. pneumoniae*; asimismo se observó un aumento de cepas *E. coli* productoras de BLEE en el Líquido Peritoneal. El comportamiento de los Broncoaspirados fue significativo, ya que en 2011 mostró únicamente aislamientos productores de la enzima de estudio. La frecuencia de cepas productoras de BLEE reportada para esta sala en el Hospital Medica Sur de México fue de forma global del 67% [Aceves, 2009](#), siendo este porcentaje relativamente mayor descrito en el presente estudio realizado, no obstante el estudio anteriormente citado fue realizado incluyendo muestras de Hemocultivo, de la cual se aisló principalmente *E. coli* como principal productor de BLEE, hecho que no difiere de los resultados anteriormente discutidos, puesto que de esta sala se aisló de hemocultivo a *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de la enzima en ambos años de estudio, frecuencia que aumentó del 2010 al 2011.

El análisis de las sala de Infectología del 2010 manifestó una mayor presencia de cepas de *E. coli* productor de BLEE en las muestras de Orina remitidas de esta sala (25%), seguida de las muestras procedentes de Catéter la cual presentó además la presencia de *E. coli* (12.5%) y *K. pneumoniae* (6.25%) como productores exclusivos de BLEE, comportamiento que fue similar a las muestras vaginales, las cuales presentaron exclusivamente cepas de *K. pneumoniae* productoras de la enzima [Gráfica No. 22](#). Comparando los resultados de frecuencia general de producción de BLEE puede afirmarse que esta aumento un 13.32% en del 2010 (56.25%) con respecto a la obtenida en el 2011 (69.57%); este aumento significativo se vio reflejado en todas las muestras analizadas para este ultimo año ya que estas denotaron un incremento en cuanto cepas de productoras de BLEE, frecuencias que sobre todo aumentaron en la muestra de Hemocultivo, presentando cepas de *E. coli* (13.04%) y *K. pneumoniae* (17.39%) productoras de BLEE [Gráfica No. 47](#); además se dio un aumento en cuanto a las categorías de análisis ya que apareció la muestra de Líquido Peritoneal el cual mostro un único porcentaje de *E. coli* productor de BLEE. Esta sala posee un papel importante ya que alberga pacientes con condiciones infecciosas de especial interés, si embargo ha sido escasa la información publicada de las infecciones por BLEE en este ambiente hospitalario, por lo cual ha sido referida únicamente en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, en el estudio realizado por [Pérez, 2010](#), quien proporcionó una frecuencia del 3.3% en cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE procedentes de este servicio hospitalario.

La sala de Cirugía es una de las más importantes para el análisis de producción de estas enzimas, ya que como se ha mencionado anteriormente, la estancia en esta ha sido considerada como un factor de riesgo ([Nedjai, Et al, 2012](#); [Baudry, 2009](#)). Inicialmente, el grado de complejidad en cuanto a producción de BLEE se destaca por su elevado número de tipos de muestras remitidas, las cuales se atribuyen a la diversidad de padecimientos de los pacientes que alberga dicho servicio hospitalario. El análisis de esta sala en el 2010 denoto una mayor frecuencia de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE en muestras de Orina, Hemocultivo Catéter y Secreciones, donde este ultimo microorganismo mostro una mayor producción a comparación de las primeras cepas mencionadas. El comportamiento contrario se observó en las muestras

de Líquido Peritoneal, donde se observó una mayor producción de BLEE por parte de cepas de *E. coli*. También es importante destacar que las muestras vaginales presentaron únicamente cepas no productoras de BLEE [Gráfica No. 23](#). Cotejando las frecuencias con las obtenidas en el 2011 se observa un porcentaje relativamente alto de producción de BLEE por parte de cepas de *K. pneumoniae* en muestras como son los Broncoaspirados, Catéter y Orina, manteniéndose un porcentaje relativamente similar de producción en las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los Hemocultivos; esto en comparación a los resultados del 2010 [Gráfica No. 48](#). El porcentaje de cepas de *E. coli* productoras de BLEE incremento significativamente del 2010 al 2011 en las muestras de Catéter, Orina, Secreción y Vaginal, por lo que puede destacarse el comportamiento contrario a las salas anteriormente analizadas donde se describió en general un aumento de dichas cepas en *K. pneumoniae*. En general ambos análisis confirman que la frecuencia de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE aumento en menor grado que en otras salas (0.39%), lo cual se refleja directamente en el aumento global de cepas productoras de dicha enzima del 2010 (53.06%) al 2011 (53.45%). La frecuencia de cepas de enterobacterias productoras de BLEE en la sala de cirugía ha sido descrita ampliamente en diversas investigaciones tanto a nivel nacional como a nivel internacional, destacando su importancia en dichas infecciones en base a los procedimientos a los que son sometidos los pacientes pertenecientes a este servicio hospitalario, como lo señala el estudio de [Baudry, 2009](#) anteriormente mencionado, el cual reportó una frecuencia de cepas productoras de BLEE del 4.1% para esta sala. Igualmente se ha destacado la presencia de cepas de *K. pneumoniae* en pacientes de cirugía de emergencia ([Nedjai, Et al, 2012](#)). El estudio de casos y controles realizado en pacientes infecciones por enterobacterias con producción de β -lactamasas de espectro extendido del Hospital general "Dr. Manuel Silva" de Morelia Michoacán reportó que el segundo servicio hospitalario con mayor importancia en cuanto a estas cepas fue la sala de cirugía general ([Chora, 2010](#)). Asimismo el porcentaje de cepas productoras de BLEE reportado por [Pérez, 2010](#), para las salas de Cirugía, Oncología y Medicina interna fue del 2%. En base a esto y considerando la producción total de BLEE de este servicio hospitalario, puede afirmarse que dicha producción de BLEE se encuentra aumentada considerablemente con respecto a lo referido en otros estudios citados anteriormente.

La frecuencia total de cepas de enterobacterias productoras de BLEE en la sala de Gastroenterología del 2010 (50.57%) al 2011 (52.85%) aumento un 2.28% pudiéndose destacar que en el primer año en cuanto a las muestras de Orina la principal cepa productora de BLEE fue *E. coli* siendo este microorganismo el mayor productor a comparación de *K. pneumoniae*, no obstante, se debe referir que existió una mayor cantidad de cepas no productoras de BLEE por parte del primer microorganismo indicado [Gráfica No. 24](#). El análisis de la sala en el 2011 mostró un aumento, en cuanto a cepas productoras de BLEE, en las muestras de Catéter y Hemocultivo observándose un incremento por parte de las cepas de *K. pneumoniae* y de *E. coli*, destacándose al igual que en otras salas, un aumento de cepas productoras de BLEE en *K. pneumoniae* [Gráfica No. 49](#). Se debe indicar que el número de cepas no productoras de BLEE en la muestra de Orina aumento a comparación del 2010, teniéndose a la par una disminución en cepas productoras de este tipo de enzimas. Al igual que las salas de Medicina Interna, Transición y Terapia Quirúrgica, esta sala no cuenta con investigaciones anteriores realizadas en otros centros de salud; por lo que los datos expuestos no pueden ser comparados con lo encontrado en otros estudios.

La sala de Neumología únicamente fue analizada a profundidad en el 2010, ya que el número de datos obtenidos de esta sala no alcanzo el límite promedio para ser considerada en un análisis independiente ($\geq 50\%$ de cepas productoras de BLEE), sin embargo si se realizó un análisis específico de la misma donde se observó un mayor porcentaje de cepas productoras de BLEE en las muestras de Orina, de la cual se aisló principalmente *E. coli* (26.32%), seguido de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en igual frecuencia de producción (5.26%). Cabe destacar que las muestras de Gastrostomía y Catéter denotaron únicamente la presencia de cepas productoras de BLEE. El porcentaje de producción de BLEE por parte de *K. pneumoniae* fue similar al obtenido en las muestras de Catéter y Esputo [Gráfica No. 18](#). Otra sala que fue analizada únicamente para el 2010 fue el servicio hospitalario de Cardiología, que presentó un alto porcentaje de *K. pneumoniae* (23.08%), *E. coli* (7.69%) y *K. oxytoca* (3.85%) productores de BLEE en la muestra de Catéter; las dos primeras enterobacterias también fueron aisladas de las muestras de Orina y Hemocultivo. Las muestras de Orina generaron aislamientos productores de dicha enzima en cepas de *K. pneumoniae*

(11.54%) y *E. coli* (7.69%), destacando además un mayor porcentaje de cepas no productoras de BLEE. Las de Hemocultivo generaron únicamente cepas de *K. pneumoniae* (7.69%) [Gráfica No. 20](#). La sala de Oncología fue también excluida de dicho análisis comparativo, sin embargo el análisis realizado de forma individual reveló, al igual que otras salas antes descritas, que la mayor parte de cepas productoras de BLEE fue aislada de la muestra de Orina, siendo el principal microorganismo *E. coli* (25.68%), seguido de *K. pneumoniae* (6.76%); los hemocultivos generaron aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, siendo la primer enterobacteria mencionada el mayor productor de este mecanismo de resistencia a antibióticos (8.11%) [Gráfica No. 25](#). Esta sala fue analizada en la investigación de [Pérez, 2010](#) en el HIES donde reportaron una frecuencia del 10.5% en cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, contrario a lo establecido anteriormente donde se señala que la principal enterobacteria productora de esta enzima es *E. coli*, y donde además la frecuencia proporcionada por *K. pneumoniae* en todas las muestras se encuentra por debajo a lo establecido en el estudio del HIES. Sin embargo un estudio realizado en Italia por [Trecarichi, Et al, 2009](#), que informó de los casos de bacteremia por *E. coli* en las unidades oncológicas y de neoplasia hematológica, reportó una frecuencia del 41.9% para dicho microorganismo, porcentaje que es mayor al obtenido de esta enterobacteria en hemocultivos del presente estudio.

En el año 2011 también se presentaron salas cuyos datos no pudieron ser comparados, como es el caso particular de la sala de Neurocirugía, siendo representativa al ser el primer servicio con mayor frecuencia de cepas productoras de BLEE. En esta sala se observa que todas las cepas aisladas de los diferentes tipos de muestra son productoras de BLEE, siendo el mayor productor *E. coli* procedente de LCR (21.54%). Es imprescindible señalar que este tipo de muestra junto con las aisladas de Líquido Pericárdico, Peritoneal y Secreciones produjeron solo cepas de enterobacterias productoras de BLEE, aunque su frecuencia de producción fue relativamente baja (3.08%) [Gráfica No. 39](#). Otra sala que solo fue analizada para el 2011 fue el servicio hospitalario de Reumatología, donde todas las muestras generaron aislamientos productores de BLEE, siendo las muestras de Hemocultivo las que presentaron mayor producción por parte de las cepas de *E. coli* (28.57%). Las muestras de secreción y

orina también generaron a este tipo de microorganismo pero con menor frecuencia (7.14%). Las muestras de Catéter generaron únicamente cepas de *K. pneumoniae* con el mismo porcentaje de producción de BLEE. [Gráfica No. 46](#). La sala de Urgencias se encontró dentro de las condiciones descritas anteriormente por lo cual solo fue analizada de forma particular para el 2011, obteniéndose al igual que en salas anteriores, un mayor número de cepas productoras de la enzima en las muestras de Orina remitidas por pacientes en dichos servicios, de la cual el principal microorganismo aislado, productor de BLEE, fue *E. coli* (21.93%) seguido de *K. pneumoniae* (10.69%). Es importante mencionar que el resto de las muestras remitidas de dicho servicio hospitalario ostentaron un porcentaje de producción de BLEE menor al 3.1% [Gráfica No. 50](#). Esta última sala también fue incluida en el estudio del HIES anteriormente citado, reportando una frecuencia del 5% en cepas productoras de BLEE para los servicios de Urgencias e Infectología, porcentaje que se encuentra por debajo de la frecuencia en Orinas reportada para dicha sala del presente estudio de prevalencia, sin embargo, este porcentaje es mayor para el resto de las muestras remitidas por dicho servicio.

Como se mencionó anteriormente las salas antes mencionadas han sido corroboradas como los ambientes hospitalarios de mayor presencia de cepas productoras de BLEE, ya que de acuerdo a lo establecido en diversas investigaciones, estos servicios son una importante fuente de cepas productoras de estas enzimas llegándose a considerar su estancia en las mismas como un factor de riesgo en la adquisición de este tipo de infecciones, esto ha sido confirmado por diversos estudios como la investigación retrospectiva realizada en Taiwán anteriormente citada, donde se estableció que la estancia en la UCI y UTI es un factor de riesgo en la adquisición de infecciones por *E. coli* productor de BLEE ([Sung, Et al, 2010](#)). Inclusive se ha afirmado que en este tipo de servicios hospitalarios, como lo es la UCI, las enterobacterias productoras de BLEE como *E. coli* forman reservorios pudiendo ser un factor importante en la adquisición de este tipo de microorganismos ([Reinthalder, Et al. 2010](#)). Igualmente esta condición ha sido relacionada con la hospitalización prolongada y el sometimiento a procedimientos invasivos (cateterismo urinario, colocación de gastrostomía, sonda nasogástrica, catéter central y venoso, además de ventilación mecánica),

considerándose estas características como factores de riesgo (Un-In, W., Et al, 2010). En este sentido el HIMFG, siendo un hospital de tercer nivel atiende a pacientes que requieren servicios hospitalarios especializados y de alta especialidad pediátrica, además de que en su gran mayoría los pacientes transcurren por una serie de procesos patológicos específicos complejos que requieren de equipo e instalaciones especiales, muchos de ellos forman parte de los diversos factores de riesgo descritos anteriormente, por lo que el estadio de los pacientes dentro de las servicios hospitalarios anteriores podría constituir un elemento clave en la adquisición de este tipo de infecciones. Igualmente la estancia en las diferentes salas del presente hospital involucra además de los procedimientos invasivos antes mencionados, el uso de antibióticos betalactámicos, como Cefalosporinas de tercera generación debido no solo a la posibilidad de infecciones asociadas a dichos procedimientos, sino además a la implementación de guías de abordaje diagnóstico y terapéutico de los padecimientos infecciosos, que conllevan el uso de este tipo de antibióticos lo que ha sido considerado como un factor de riesgo al formar parte de una presión selectiva, la cual ha sido señalado por diversos autores, (Reinthal, Et al. 2010; Nedjai, Et al, 2012; Guzmán, 2009; Silvia-Sánchez, J. Et al. 2011; Garcíadiego, 2011). En este sentido también se debe mencionar que el HIMFG aplica también una terapia empírica inicial la cual se fundamenta principalmente en la sintomatología clínica y posteriormente se modifica el tratamiento por una terapia de desescalación de acuerdo a los resultados de sensibilidad; con base a un plan de manejo estandarizado para los pacientes pediátricos establecido por el Departamento de Infectología, el cual fundamenta el uso de este tipo de antibióticos en los resultados de susceptibilidad y los patrones de infección de las bacterias aisladas en este ambiente hospitalario.

Diversas investigaciones a nivel mundial han confirmado esta situación como factor de riesgo, como lo es un estudio realizado en Sudáfrica donde se estableció que la estancia en UTI favorecía la infección por este tipo de microorganismos en abscesos intraabdominales, por cirugía intraabdominal y quemaduras (Peirano, Et al, 2011). También Un-In, W., Et al, 2010, establecieron que la estancia prolongada en la UCI favorecía la bacteremia por *E. coli* productor de BLEE. En Israel, los aislamientos microbiológicos de pacientes ambulatorios demostraron que el 1.25% eran

uropatógenos, siendo *K. pneumoniae* productor de BLEE, además de que diversos estudios realizados en E. U. que demuestran que hay mayor prevalencia de BLEE en áreas críticas como la Terapia intensiva, TIN, TIP y Unidad Coronaria, lo que se correlaciona con el análisis por sala anteriormente descrito. (Aceves, 2009). En Canadá en el 2008 se reportó que los aislamientos BLEE positivos se encontraban en las siguientes salas: área clínica 2.2%, sala de cirugía 4.1%, sala de emergencias 5.9%, sala médica 6.9% y UCI 7.5% (Baudry, 2009). En México, en el estudio realizado en HIES dio la descripción de la frecuencia de productores de BLEE por sala informándose una mayor prevalencia en UCIP, seguido de las salas de Urgencia, Infectología, UCIN, Consulta externa, Cirugía, Oncología, Medicina Interna y Neonatología (Pérez, 2010).

Para lograr una mejor comparación entre las categorías pertenecientes a los datos clínicos estudiados y los aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE se realizó un análisis comparativo de ambos factores. En general esta comparación aportó que en cuanto a microorganismos estudiados, *E. coli* y *K. pneumoniae* aumentaron su frecuencia su respectiva producción de este tipo de enzimas, lo cual no fue así para *K. oxytoca* Gráfica No. 51, esto se correlaciona con el análisis individual de cada sala y con el análisis por microorganismo donde se estableció un notable aumento de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Esto en general se relaciona con el Gráfica de cepas productoras de BLEE por sala en cada año del periodo de estudio Gráfica No. 52, donde se observa el aumento de la frecuencia total de las infecciones causadas por estas enzimas en prácticamente todos los servicios hospitalarios, exceptuando Oncología, Terapia de Urgencias, Clasificación, Endocrinología y Adolescentes. A pesar de que las frecuencias de la producción de BLEE de acuerdo a los grupos de edad han manifestado diversas variaciones antes señaladas, el Gráfica global que compara las cepas productoras de BLEE del 2011 y del 2010 con respecto a la edad de los pacientes señala que en general la frecuencia de la producción de este tipo de enzimas aumento siendo destacable todas las etapas de la edad pediátrica analizadas Gráfica No. 53. Comparando la frecuencia de cepas productoras de BLEE con respecto a las muestras analizadas en común en ambos años se puede observar un aumento de presencia de estas enzimas procedentes de las muestras de Broncoaspirado, Heces, Hemocultivo, LCR, Líquido Pericárdico, Líquido Peritoneal, Líquido Pleural, Orina, Secreción y Vaginal

Gráfica No. 54, donde se observa además un considerable aumento en la frecuencia de estas cepas en las muestras de LCR y Líquido Pleural, siendo el Esputo la única muestra que presento una disminución desmedida de dicha frecuencia.

El aumento de prevalencia de este tipo de infecciones del 45% en el 2010 al 54% en el 2011 (diferencia 9%) Gráfica No. 55. Un posible factor que debe ser considerado para la explicación de este aumento de la prevalencia en este tipo de infecciones es, como se señalo anteriormente para cada sala en particular, el comportamiento mundial y nacional que en general han presentado este tipo de cepas ya que como se señalo, la frecuencia de dichos aislamientos no solo es más cuantiosa sino que además se ve influenciada por la gran variabilidad genética que presentan dichas enzimas la que además es atribuida a su diseminación por medio de diversos elementos genéticos (plásmidos, integrones, transposones, etc.).

Conclusiones

Con base en el análisis retrospectivo se logró establecer la prevalencia de las cepas de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en las muestras de los pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, la cual aumento significativamente de un 45% en el 2010 un 54% en el 2011.

Se logró describir los principales datos clínicos y microbiológicos de los pacientes con probable infección por enterobacterias productoras de BLEE, lo que permitió conocer la frecuencia de producción de estas enzimas en relación a las cepas de enterobacterias de acuerdo al periodo de estudio, de acuerdo a esto se concluye que el microorganismo con mayor producción de BLEE en ambos años fue *K. pneumoniae* (de 58.84% en el 2010 a 72.50% en el 2011), seguido de *E. coli* de (39.74% en el 2010 a 45.47% en el 2011). *K. oxytoca* fue el único microorganismo cuya frecuencia disminuyo (de 34.09% en el 2010 a 12% en el 2011).

La descripción de la correlación entre los datos clínicos y las cepas productoras de BLEE permitió el análisis específico de los servicios hospitalarios con mayor número de cepas productoras de BLEE con lo cual se afirma que las principales salas con mayor porcentaje son UTIN, UCIN y Terapia quirúrgica para el año 2010 y Neurocirugía, UCIN y Medicina Interna para el 2011.

Sugerencias de acuerdo a los resultados del estudio

En el presente estudio comprende datos hospitalarios que en general, por lo que debe subrayarse que se requieren registros más completos para realizar los estudios epidemiológicos, debido a que estos datos son dependientes de los ingresos hospitalarios, siendo selectivos en función de las características personales, la gravedad de la enfermedad ya sea de base o infección por enterobacterias productoras de BLEE, los trastornos médicos asociados y las normas de ingreso que varían en los diferentes servicios del hospital. Se confirmó que los registros hospitalarios requieren un diseño para la investigación y para realizar un análisis con registros completos y holgados en información para disminuir desviaciones por registros ilegibles o inexistentes, evitando así la exclusión de los datos implicados en el presente análisis de prevalencia. Asimismo asegurar un registro para realizar un recuento selectivo para los diversos grupos de la población los cuales pertenecen a un grupo independiente a los pacientes pediátricos del presente hospital. Es por esto que el HIMFG se encuentra actualmente implementando un sistema electrónico de registro lo que no solo permitirá realizar posteriores estudios epidemiológicos con mayor eficacia, rapidez y veracidad sino que evitara los problemas cotidianos que presenta el laboratorio clínico al enfrentarse a dichos problemas.

Los registros presentaron diversidad en la calidad diagnóstica generando diferencias entre médicos y servicios, lo que genera diferencias significativas que se vieron reflejadas en los resultados obtenidos, los cuales únicamente están referidos a los datos encontrados en las bitácoras del laboratorio de bacteriología del laboratorio clínico central. Igualmente no se están considerando las diferentes características epidemiológicas de los pacientes ya que no se separaron en comunidad hospitalaria o externa, grupos étnicos, ni por área geográfica, esto a causa de la inexistencia de áreas de captación definidas que exijan que todas las personas de una región dada se hospitalicen en una sala o área particular y que nadie de fuera de esa área de captación sea ingresada en el presente hospital; es por esto que la prevalencia descrita define a la población que asiste al hospital y que es diagnosticada únicamente por el laboratorio de bacteriología.

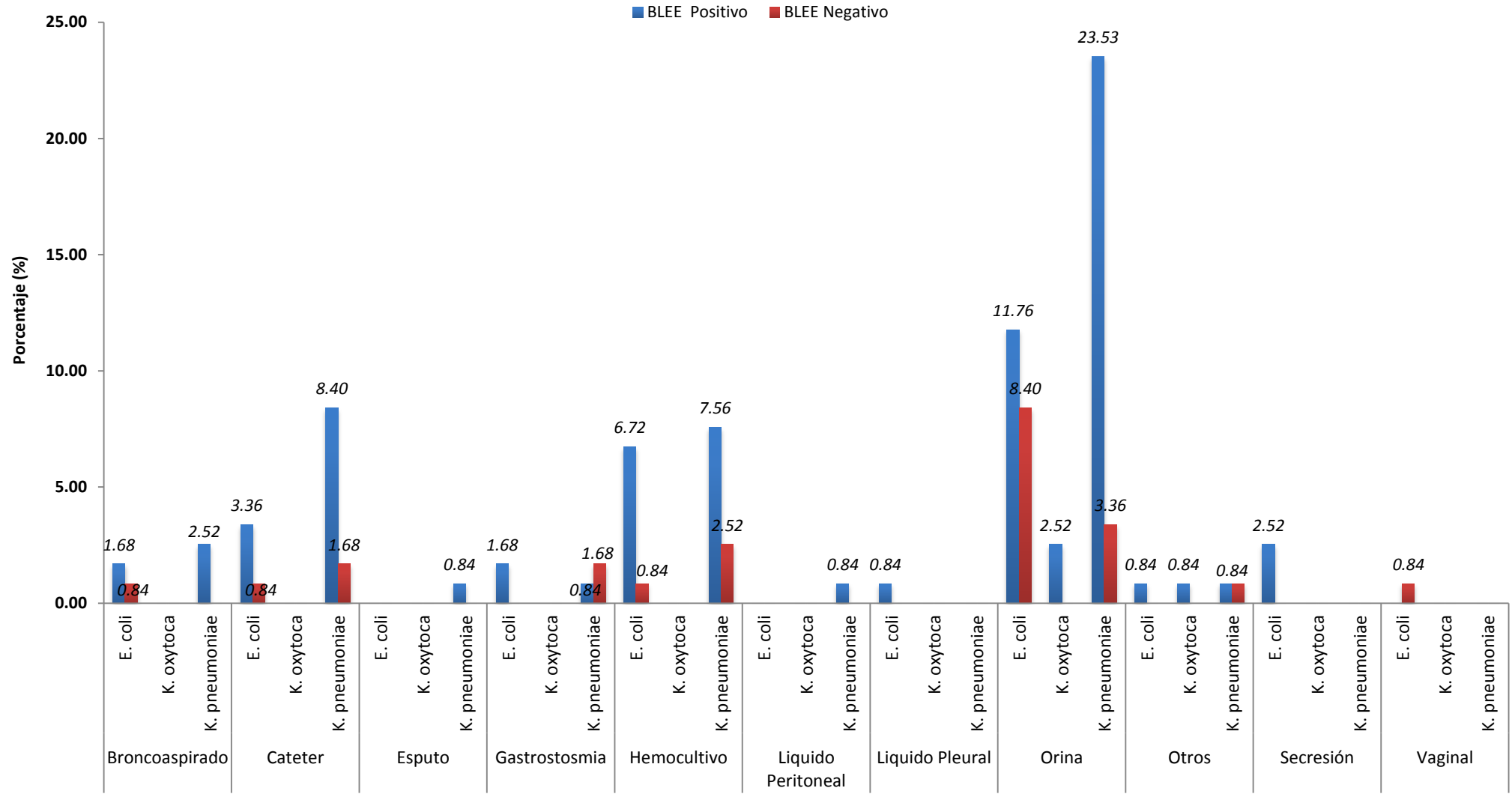
Debido a que la prevalencia puede verse como un corte de la población en un momento dado en el cual se determina quien tiene la enfermedad y quien no la presenta, no se está determinando cuando se produjo la enfermedad ni la duración de la misma, en consecuencia la prevalencia antes descrita comprende una mezcla de personas con diferentes duraciones de enfermedad y posibles reinfecciones, y por tanto se requiere mayor información para obtener una medida de riesgo atribuible a la infección por este tipo de microorganismos. Por lo cual se sugiere calcular la incidencia en los diferentes tipos de pacientes involucrados en el estudio, porque al contrario de la prevalencia, comprende solo casos nuevos en un periodo especificado durante el cual se producen las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE, considerando además el número de casos representativos. Igualmente debe considerarse la relación entre prevalencia, incidencia y la duración de la infección por enterobacterias productoras de BLEE, e identificar cualquier factor que aumente la duración de la enfermedad o del hallazgo clínico en un paciente, aumentando las probabilidades de que dicho paciente sea detectado en un estudio de prevalencia.

Cabe señalar que la prevalencia de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE obtenida en este estudio difícilmente puede extrapolarse a otros ambientes hospitalarios del país, ya que como se expuso anteriormente la variabilidad genética y la diseminación de las cepas productoras de este tipo de enzimas representan una situación diferente en cada área geográfica, lo que ha sido demostrado a nivel nacional e internacional. Debido a la gran variabilidad tanto de las cepas de enterobacterias como la de los diferentes tipos de BLEE que se encuentran distribuidos en el país, así como a la gran diversidad de sensibilidad de los diferentes microorganismos a los antibióticos betalactámicos, lo que a su vez es heterogéneo tanto en el ambiente comunitario como en el hospitalario.

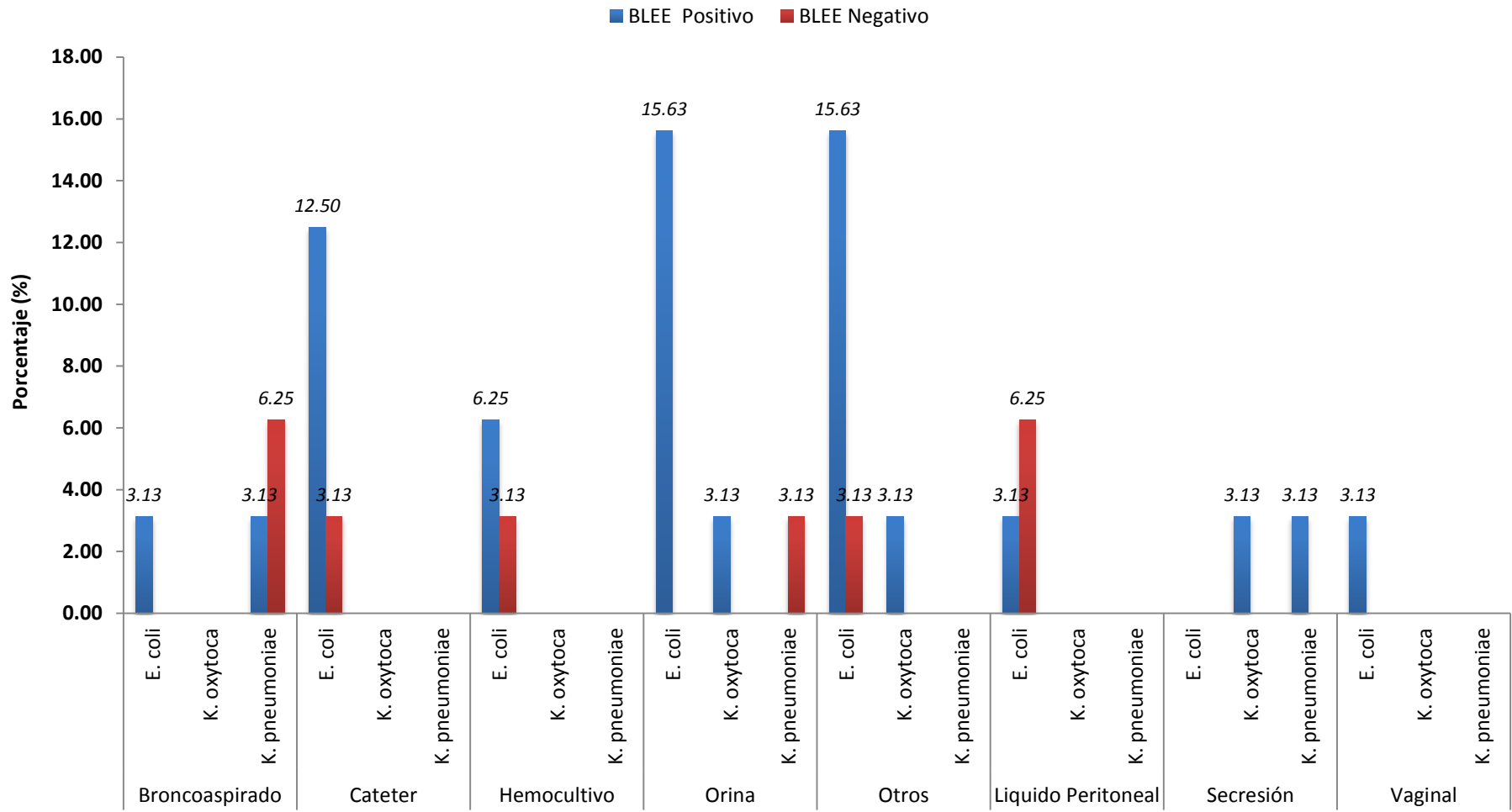
Un aspecto relevante a mencionar es que los resultados fueron obtenidos según los criterios y los puntos de corte establecidos para las Cefalosporinas y Aztreonam para los miembros de *Enterobacteriaceae* por la CLSI en el 2009, criterios de interpretación que cambiaron drásticamente para *E. coli* de ese año a lo establecido en el 2010 y 2011, (Wang, P., Et al, 2011) que son los años que comprenden el periodo de estudio de la presente investigación.

Igualmente como sucede en otros estudios relacionados, la detección exacta de la prevalencia de BLEE se ve limitada por la falta de técnicas moleculares además de otras técnicas confirmatorias adicionales establecidas por la CLSI para la detección eficaz de este tipo de microorganismos, es debido a esto que se sugiere la implementación y estandarización de este tipo de técnicas a nivel laboratorio para la detección de este tipo de bacterias, las cuales no solo contribuirían a la realización de estudios epidemiológicos posteriores que promuevan la vigilancia de este tipo de infecciones, sino que además se lograría el establecer un diagnóstico aun más preciso de este tipo de enterobacterias mejorando la calidad de vida del paciente, al otorgar mayor información para la toma de decisiones terapéuticas acertadas para el médico, con la obtención y generación de resultados epidemiológicos más exactos en cuanto al tipo de BLEE, disminuyendo el tiempo de estancia hospitalaria y las probables reinfecciones y colonizaciones, lo que finalmente traería consigo la disminución del costo que implica este tipo de infecciones relacionadas con los microorganismos productores de BLEE.

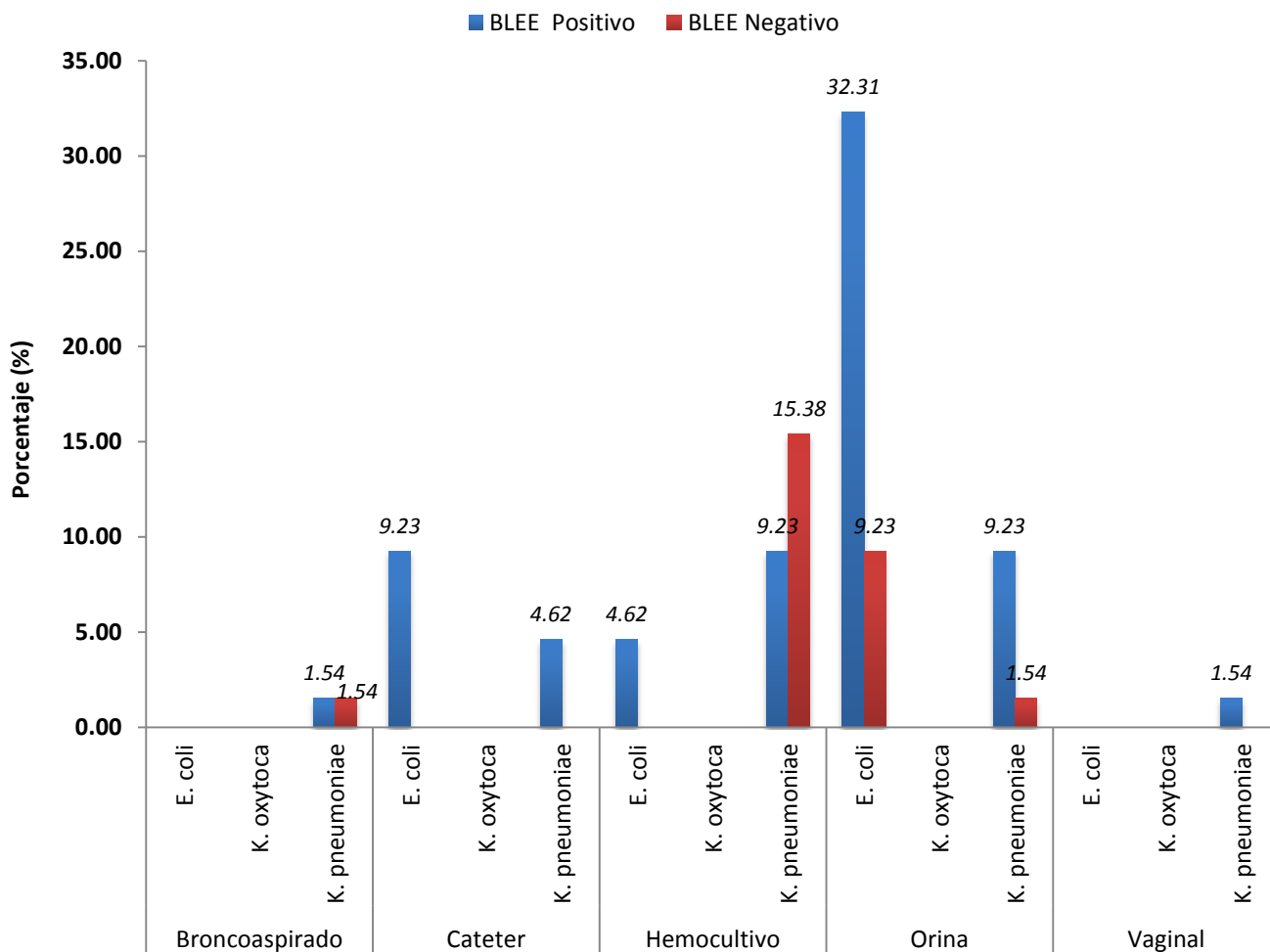
Gráficas



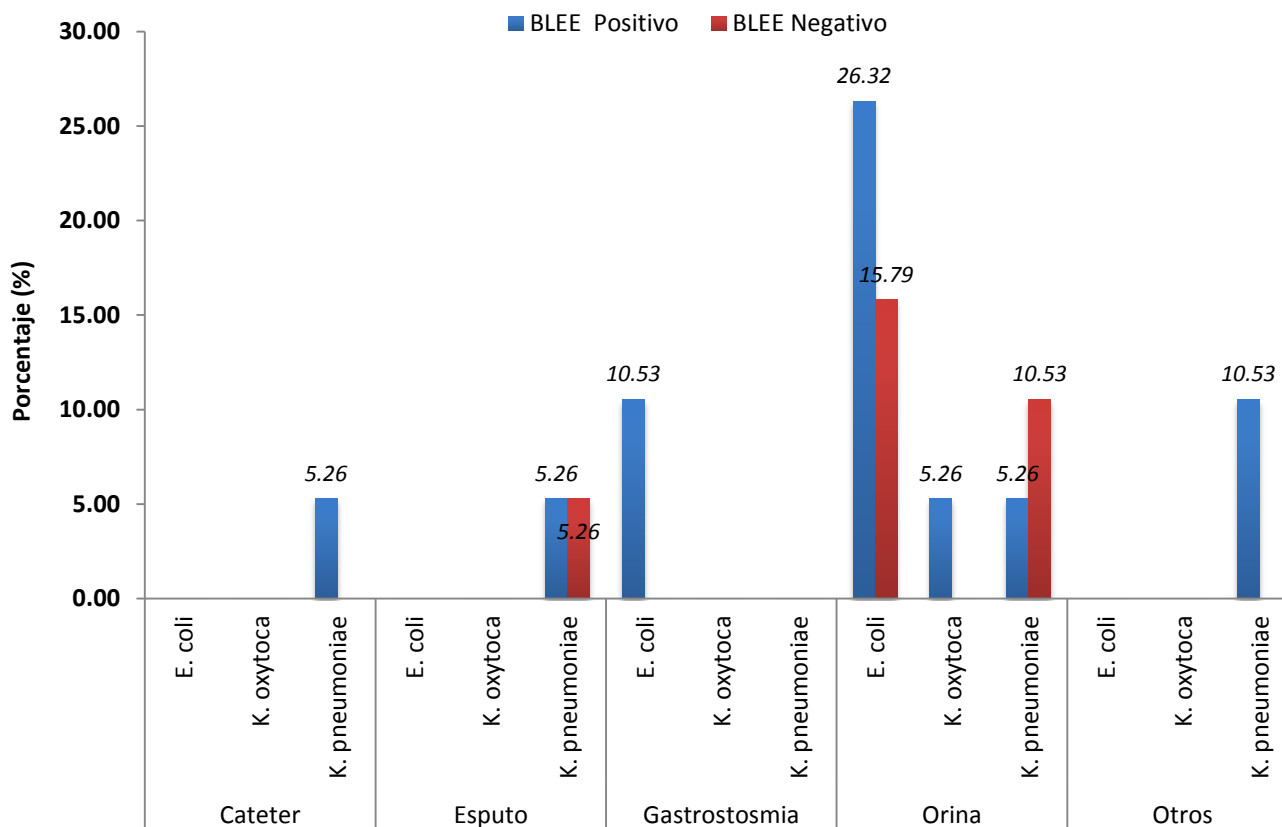
Gráfica 33.- Resultados de la sala UCIN del análisis de producción de BLEE del 2010



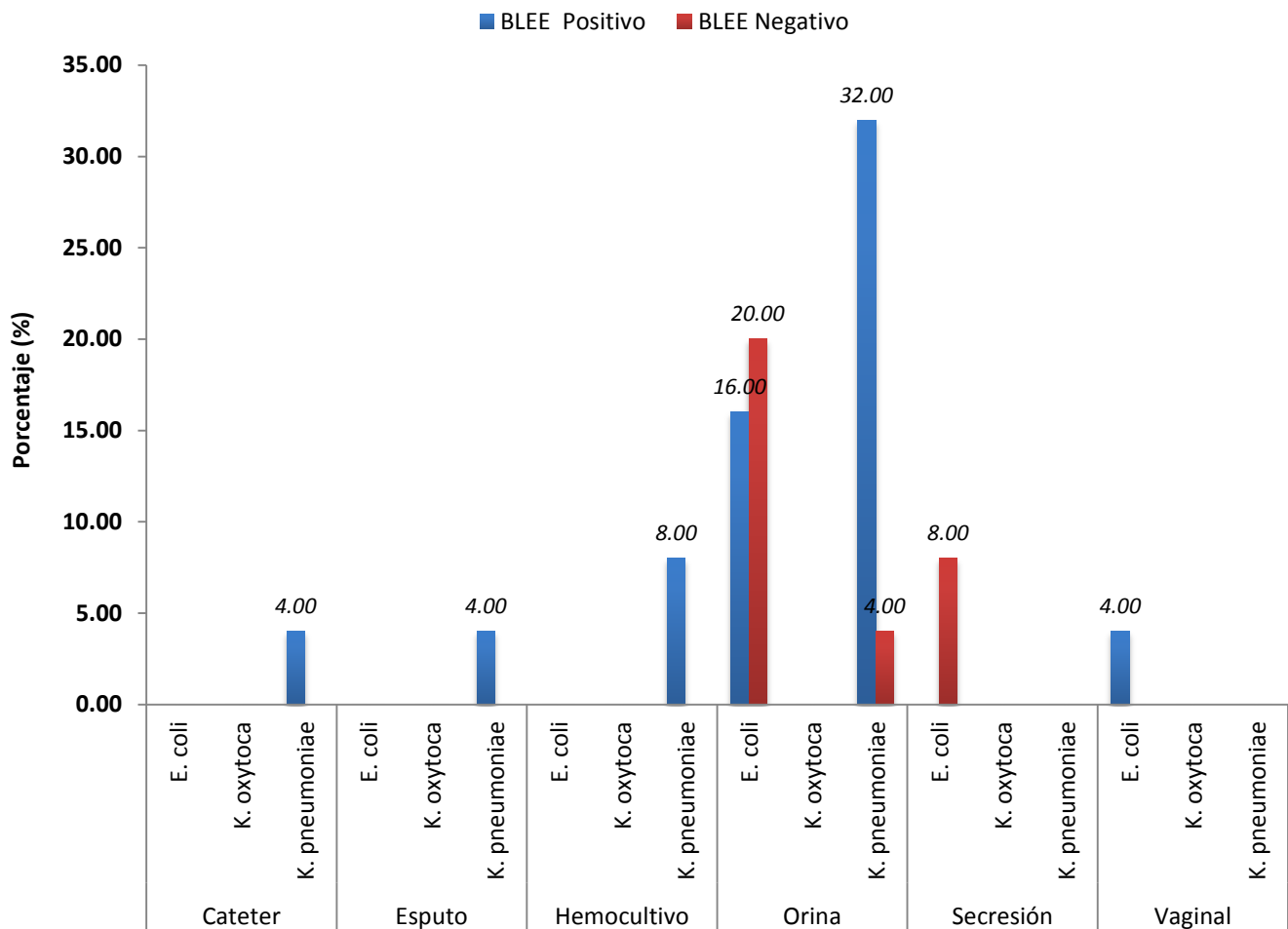
Gráfica 34.- Resultados de la sala de Terapia Quirúrgica del análisis de producción de BLEE del 2010



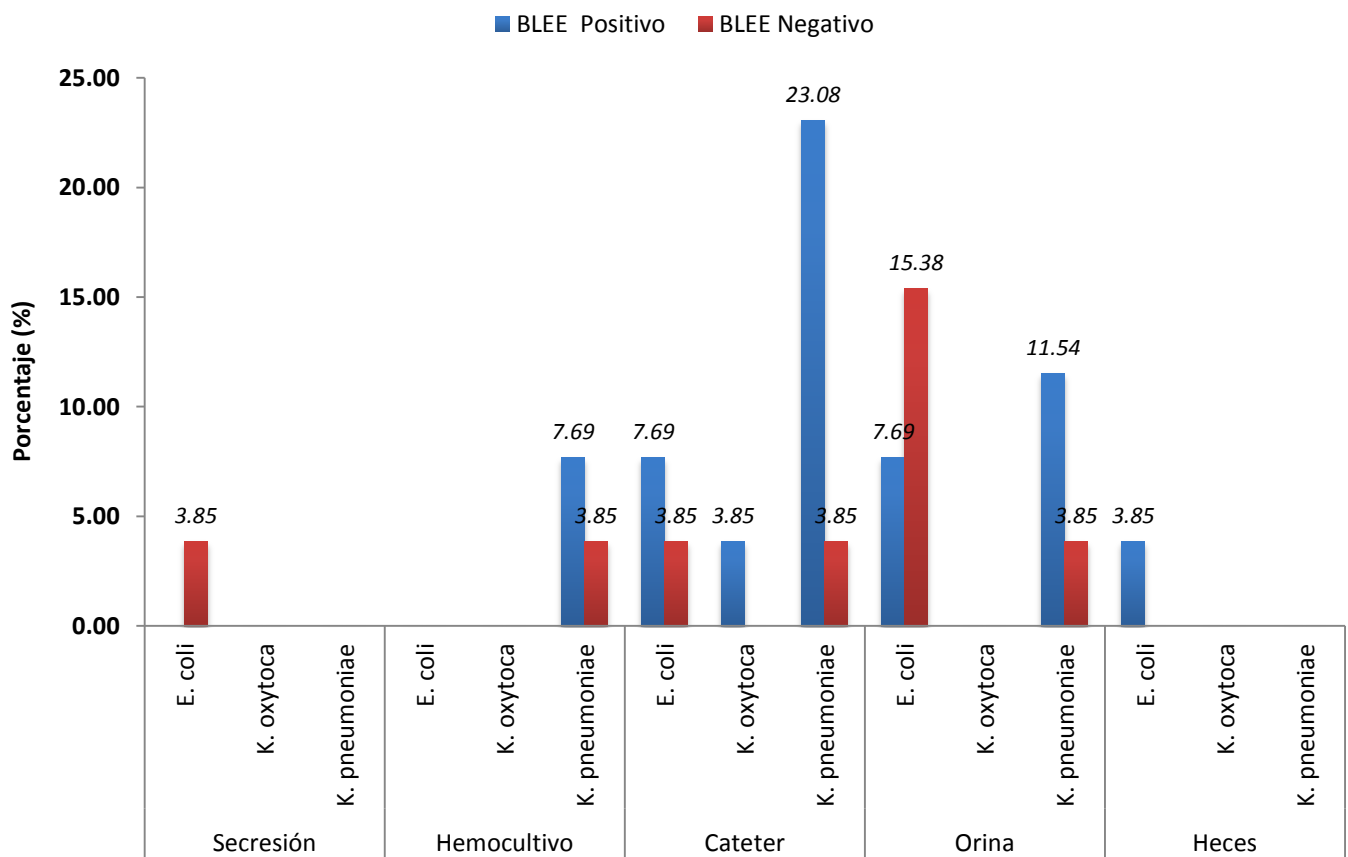
Gráfica 35.- Resultados de la sala Medicina Interna del análisis de producción de BLEE del 2010



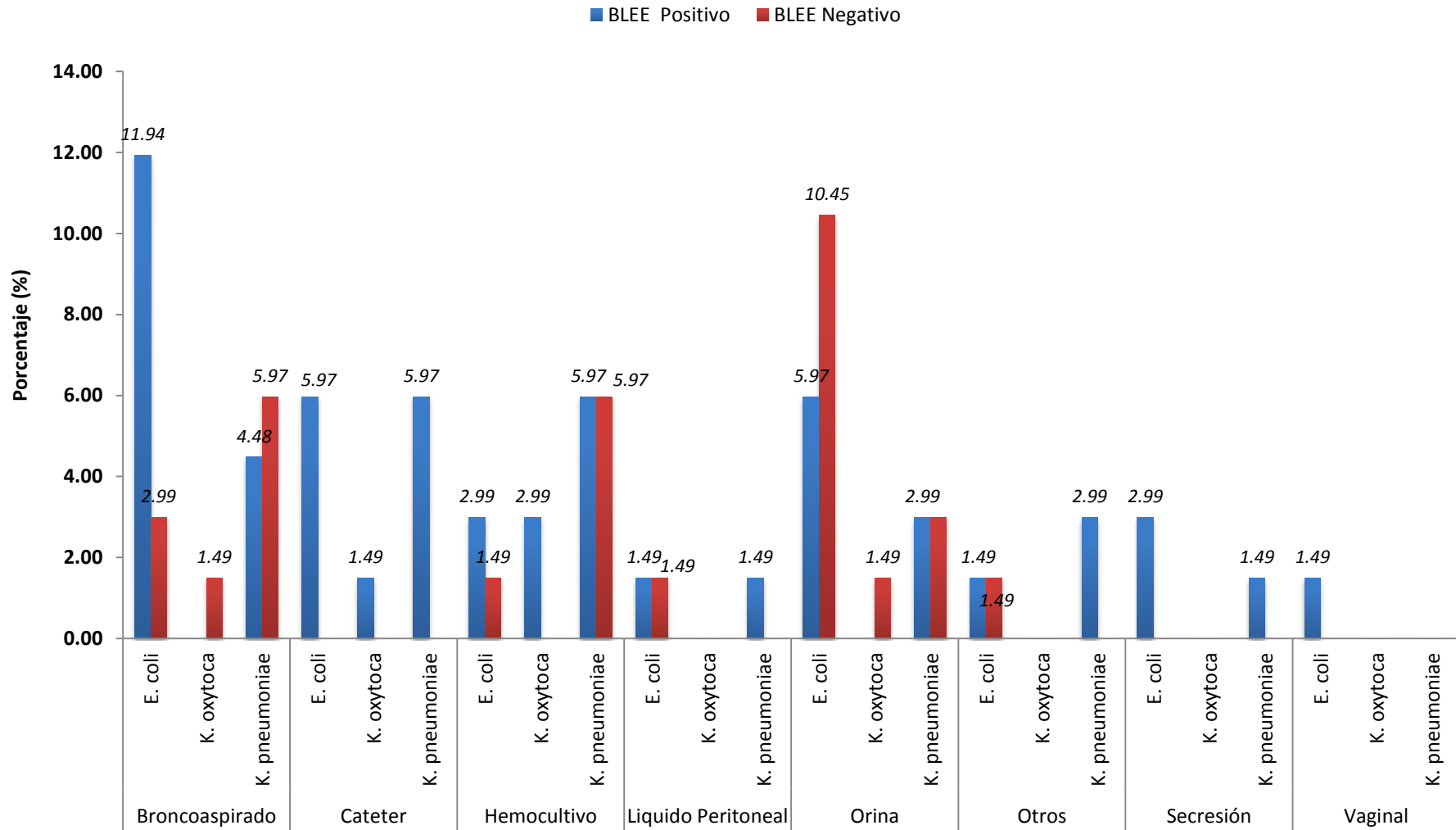
Gráfica 37.- Resultados de la sala Neumología del análisis de producción de BLEE del 2010



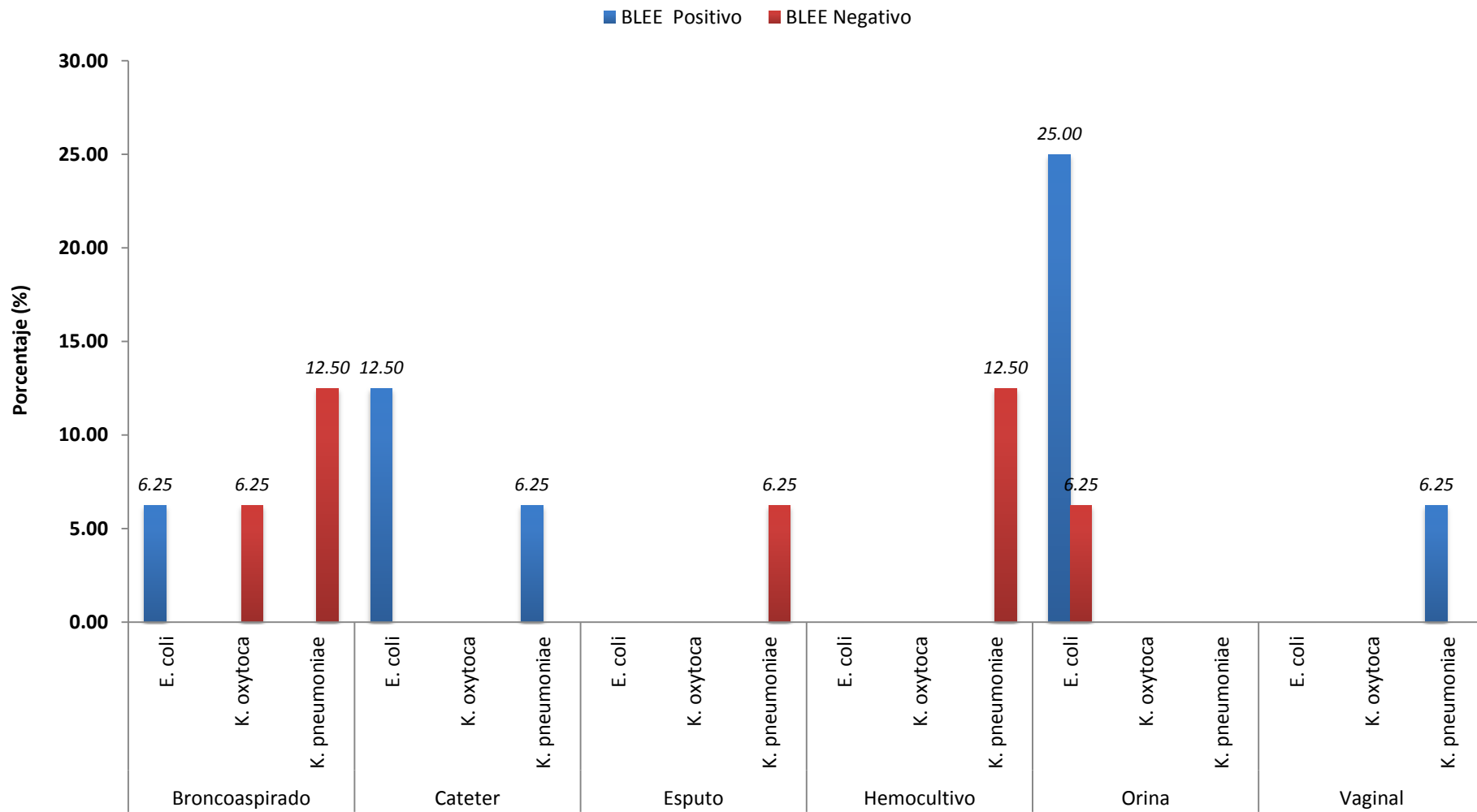
Gráfica 40.- Resultados de la sala de Transición del análisis de producción de BLEE del 2010



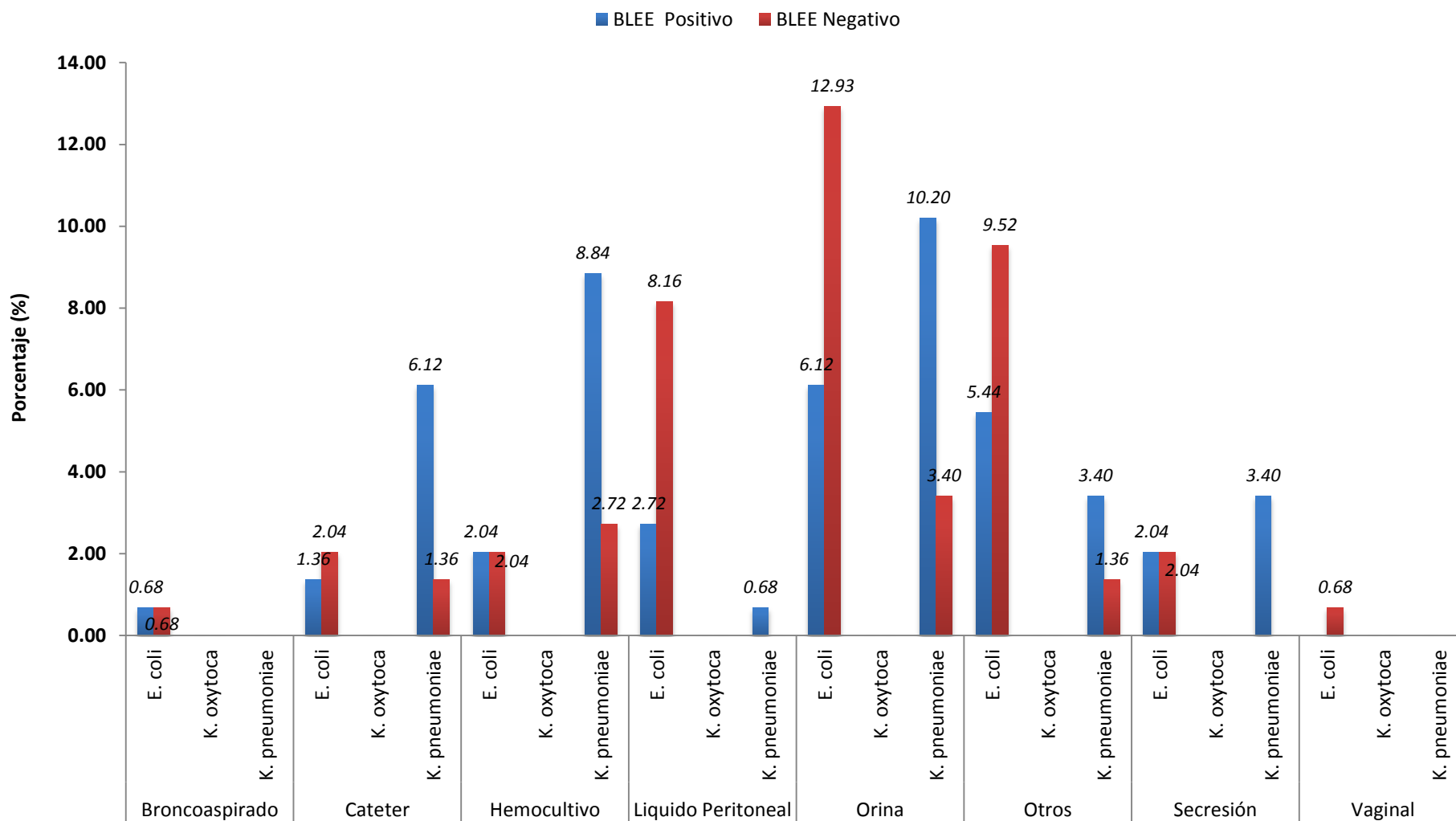
Gráfica 39.- Resultados de la sala de Cardiología del análisis de producción de BLEE del 2010



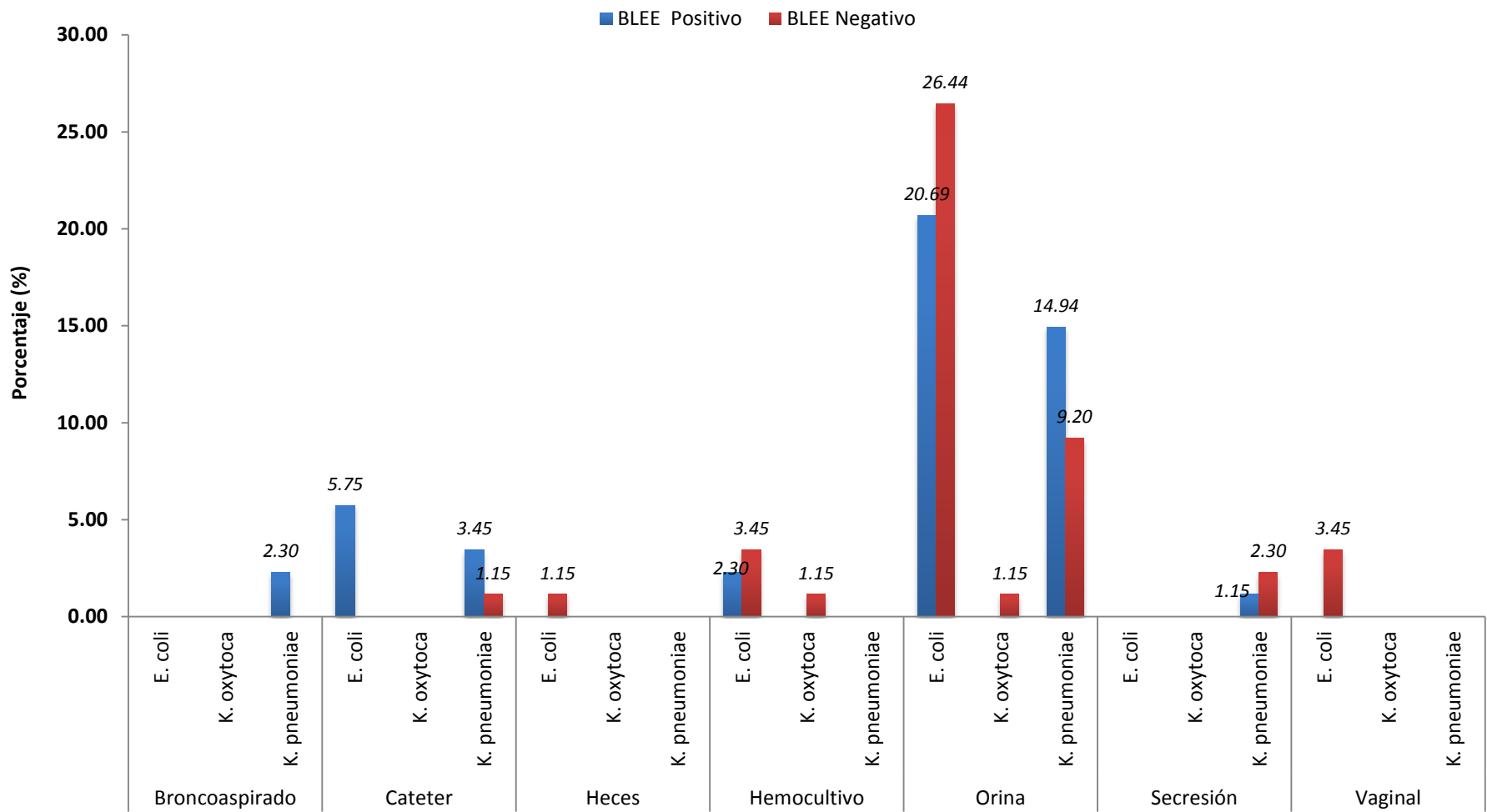
Gráfica 41.- Resultados de la sala UTIP del análisis de producción de BLEE del 2010



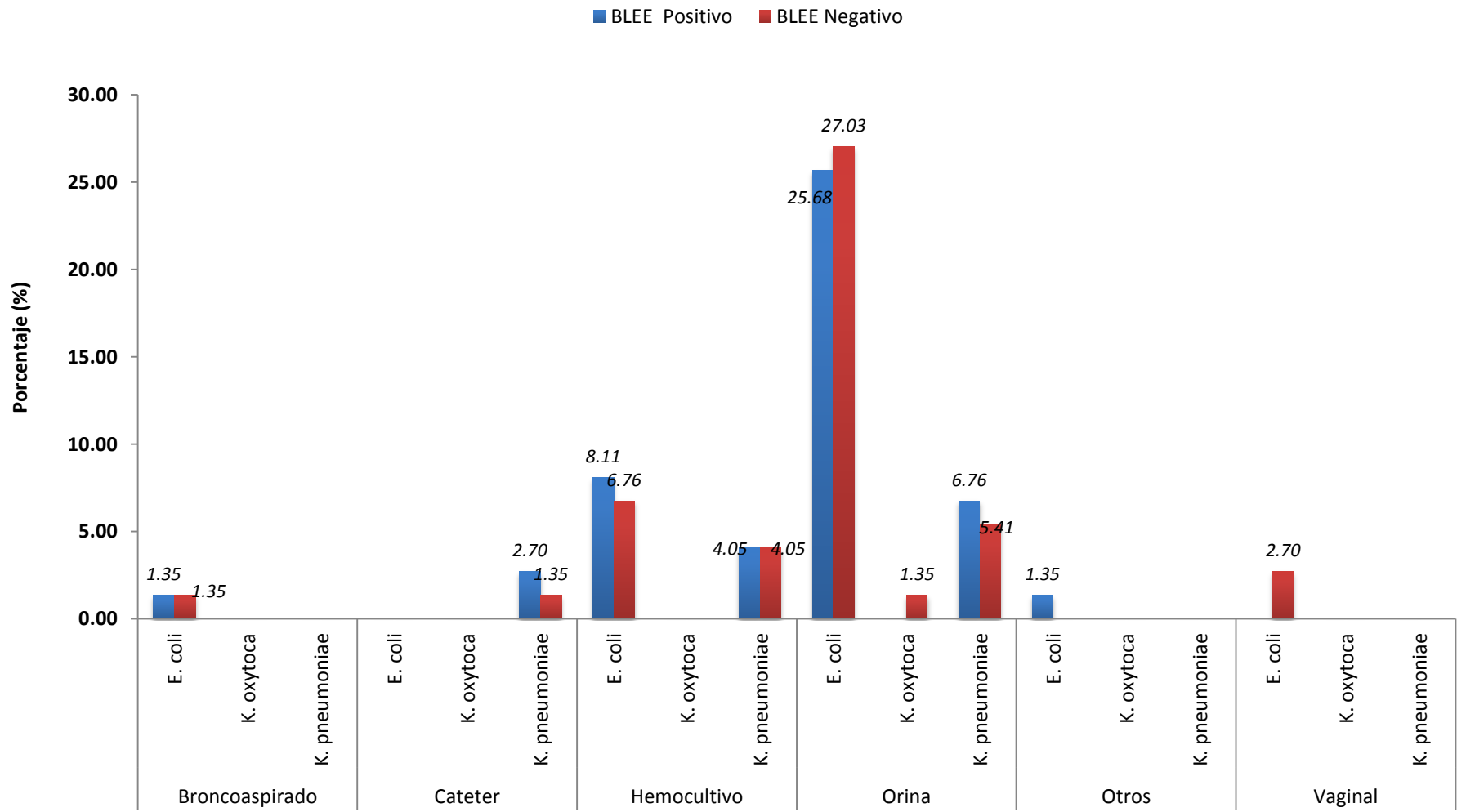
Gráfica 42.- Resultados de la sala Infectología del análisis de producción de BLEE del 2010



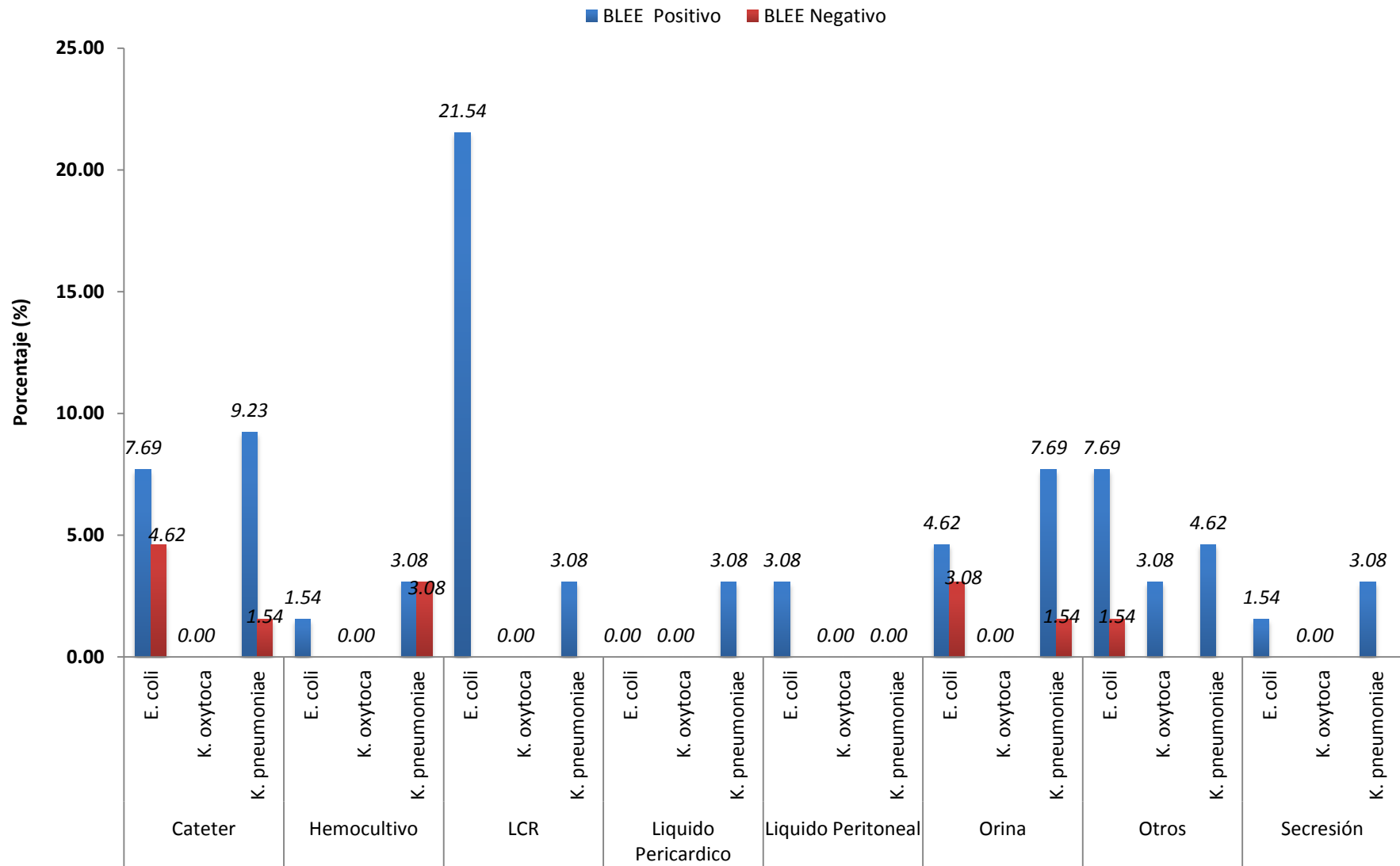
Gráfica 43.- Resultados de la sala Cirugía del análisis de producción de BLEE del 2010



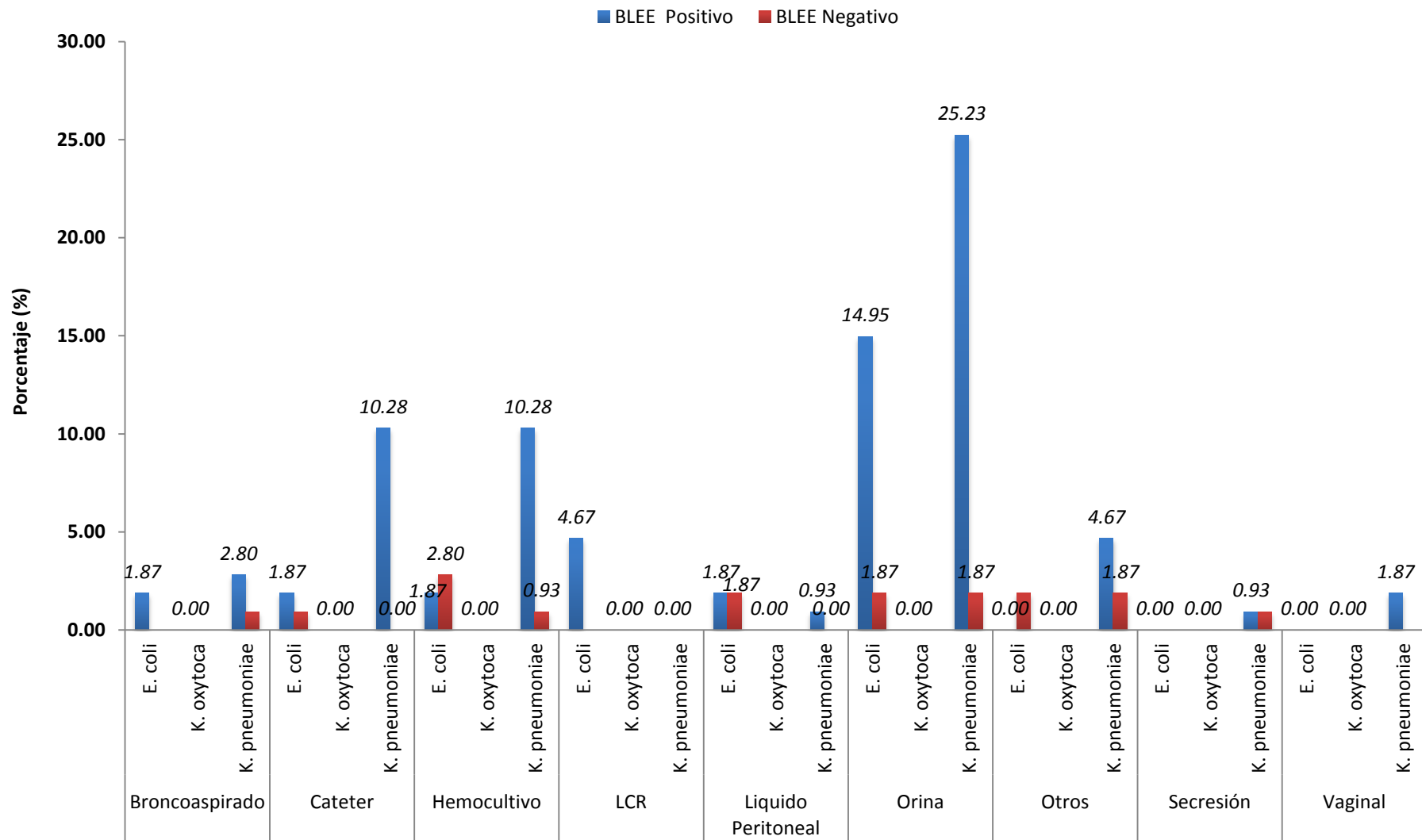
Gráfica 44.- Resultados de la sala Gastroenterología del análisis de producción de BLEE del 2010



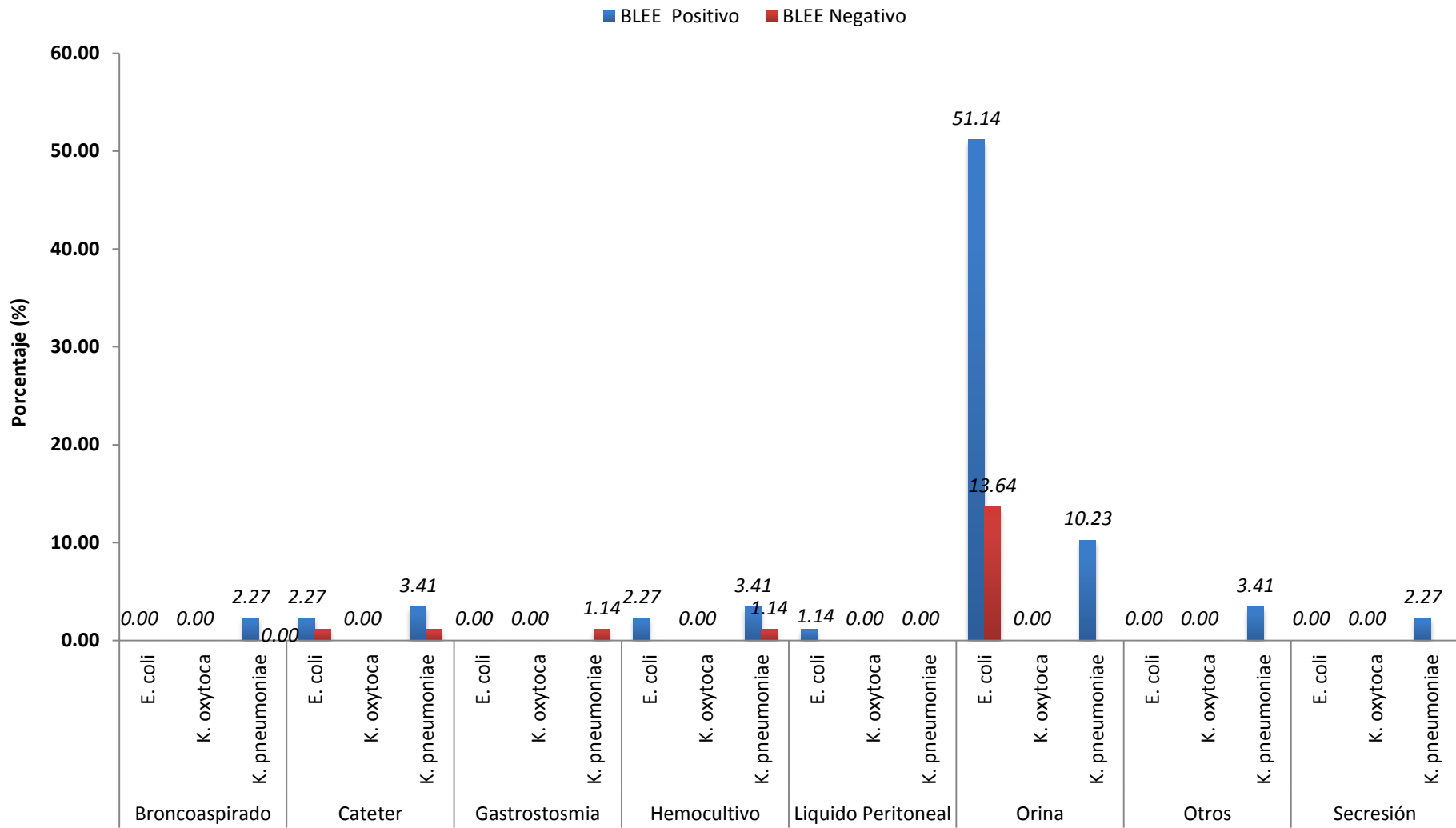
Gráfica 45.- Resultados de la sala de Oncología del análisis de producción de BLEE del 2010



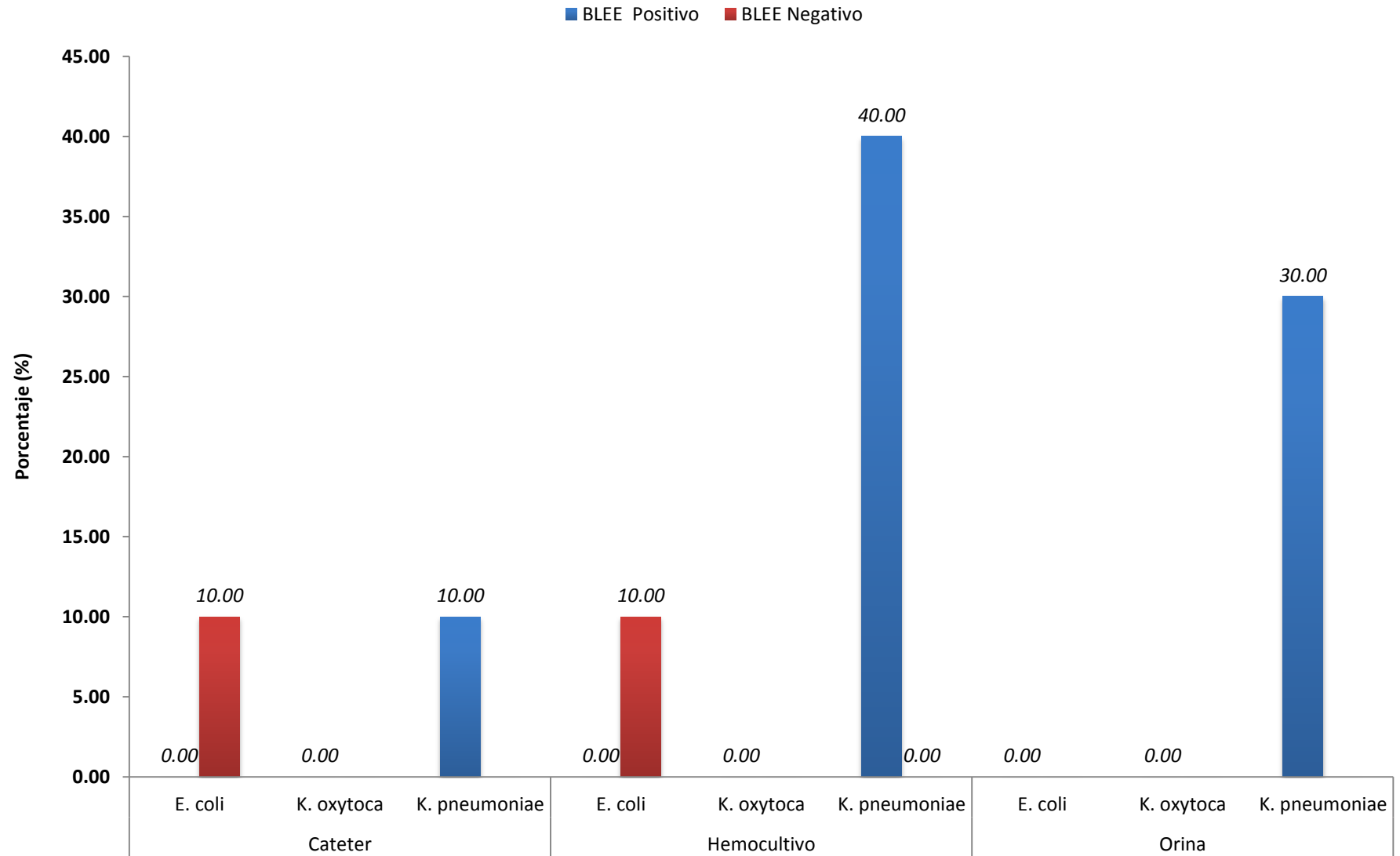
Gráfica 39.- Resultados de la sala de Neurocirugía del análisis de producción de BLEE del 2011



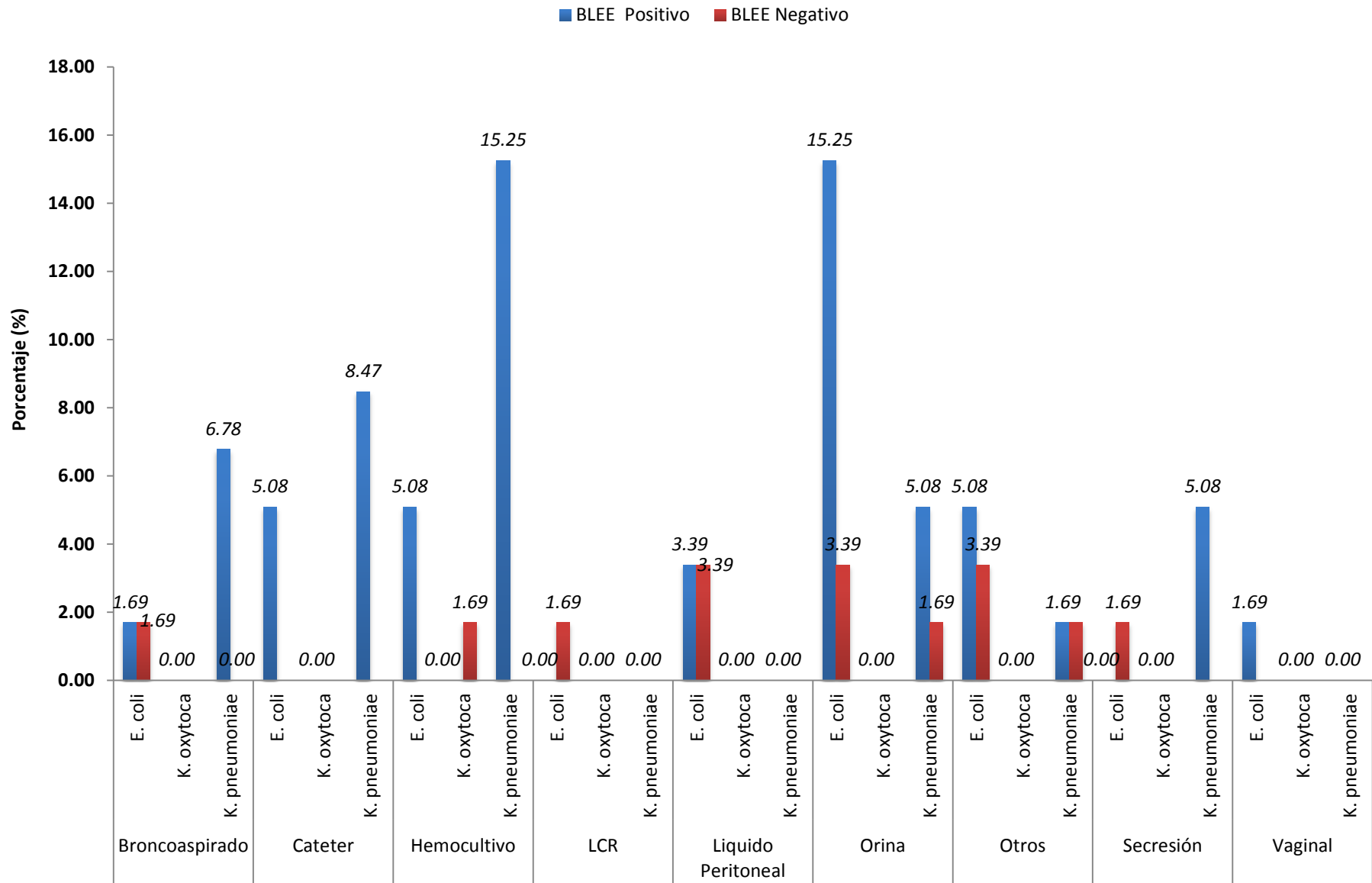
Gráfica 46.- Resultados de la sala UCIN del análisis de producción de BLEE del 2011



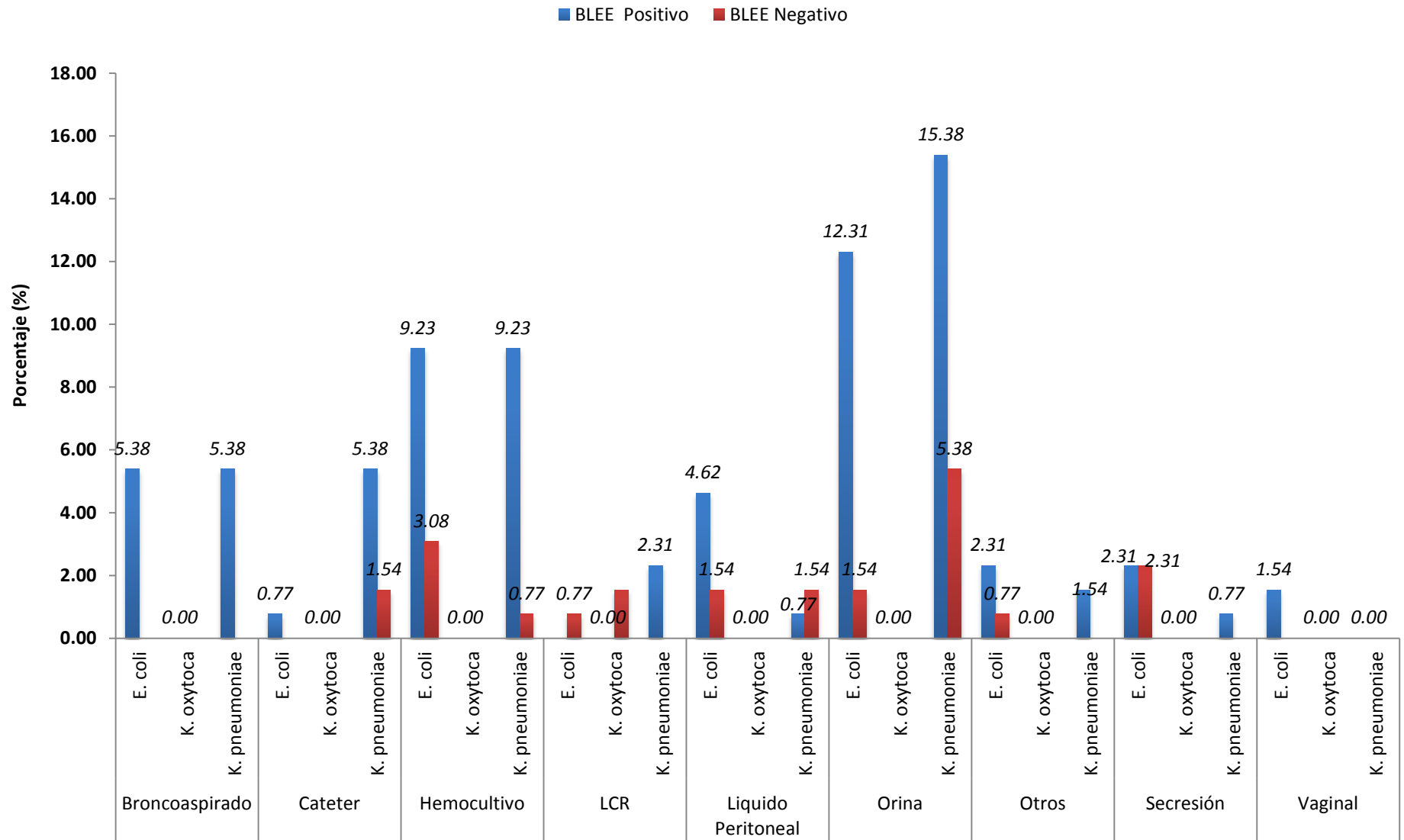
Gráfica 47.- Resultados de la sala Medicina Interna del análisis de producción de BLEE del 2011



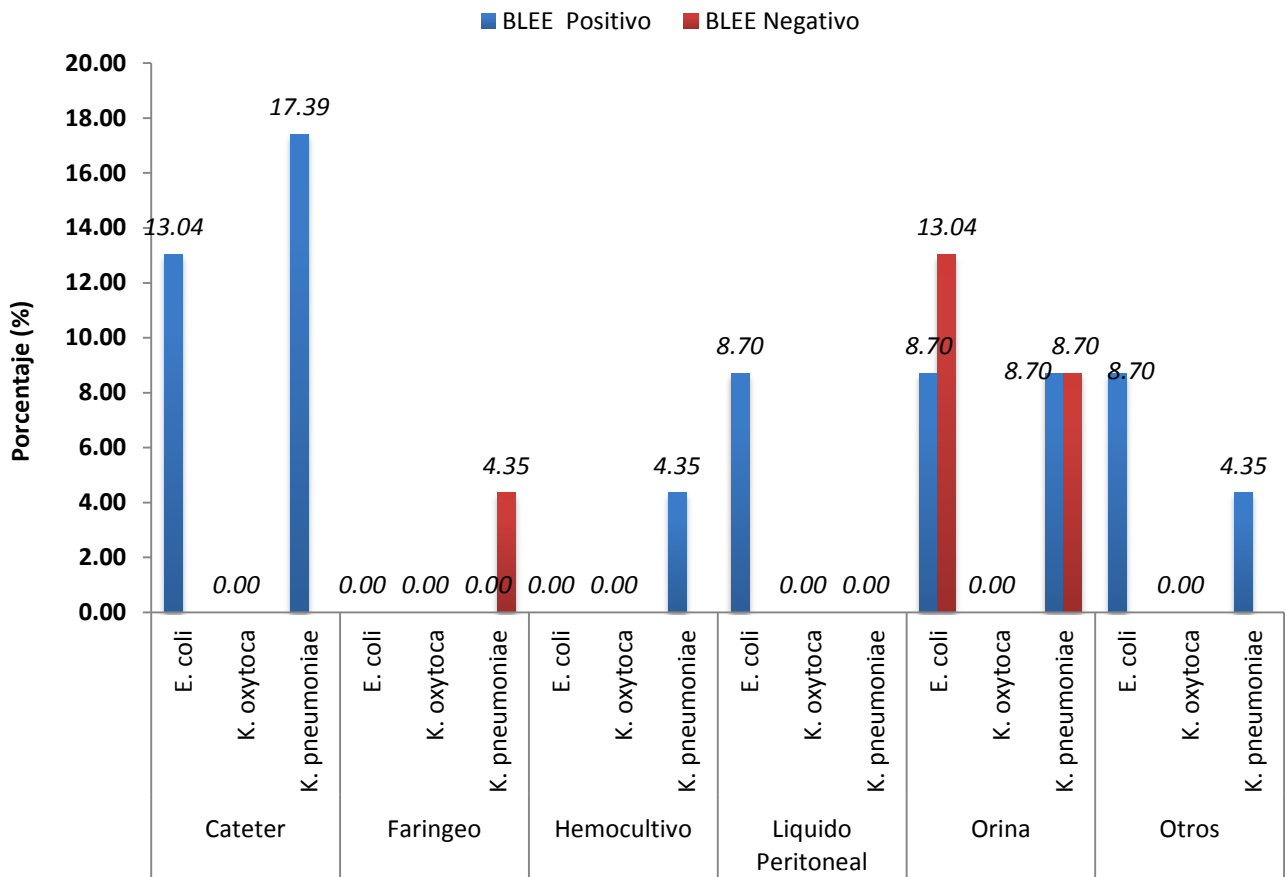
Gráfica 42.- Resultados de la sala de UTIN del análisis de producción de BLEE del 2011



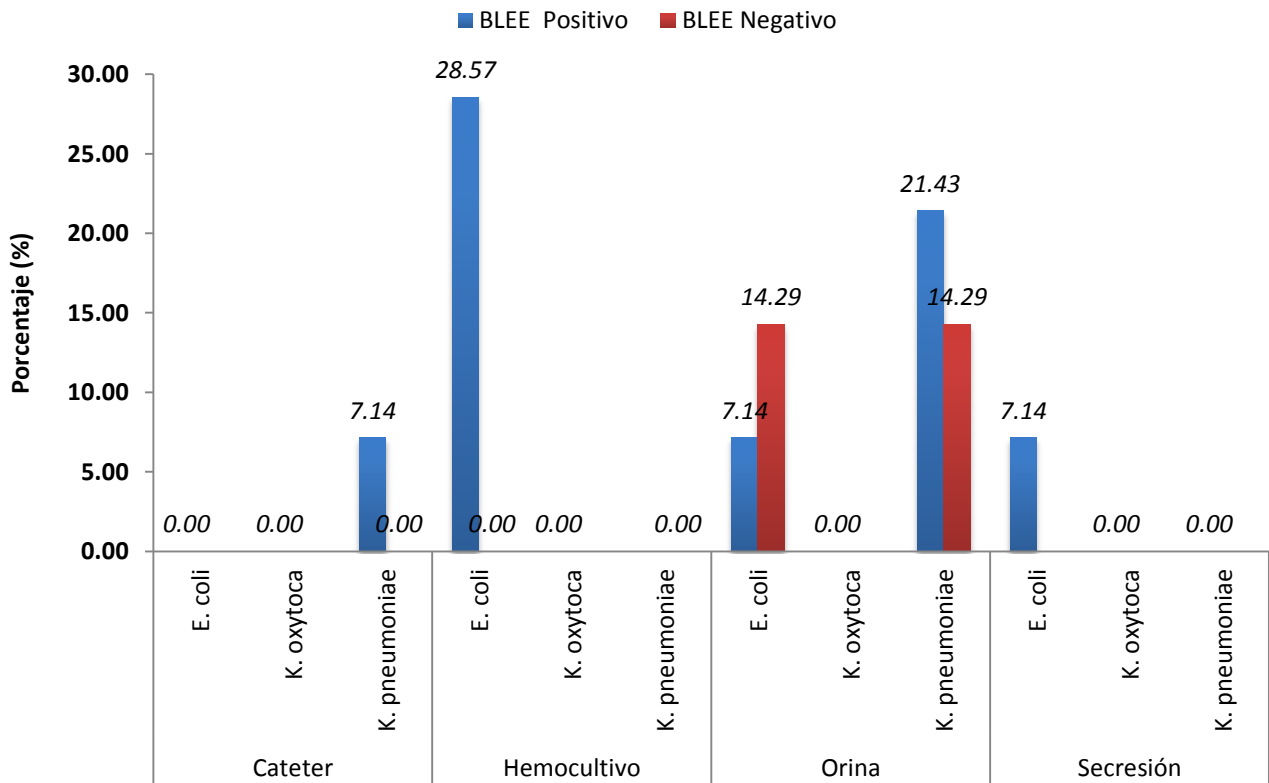
Gráfica 43.- Resultados de la sala de Terapia Quirúrgica del análisis de producción de BLEE del 2011



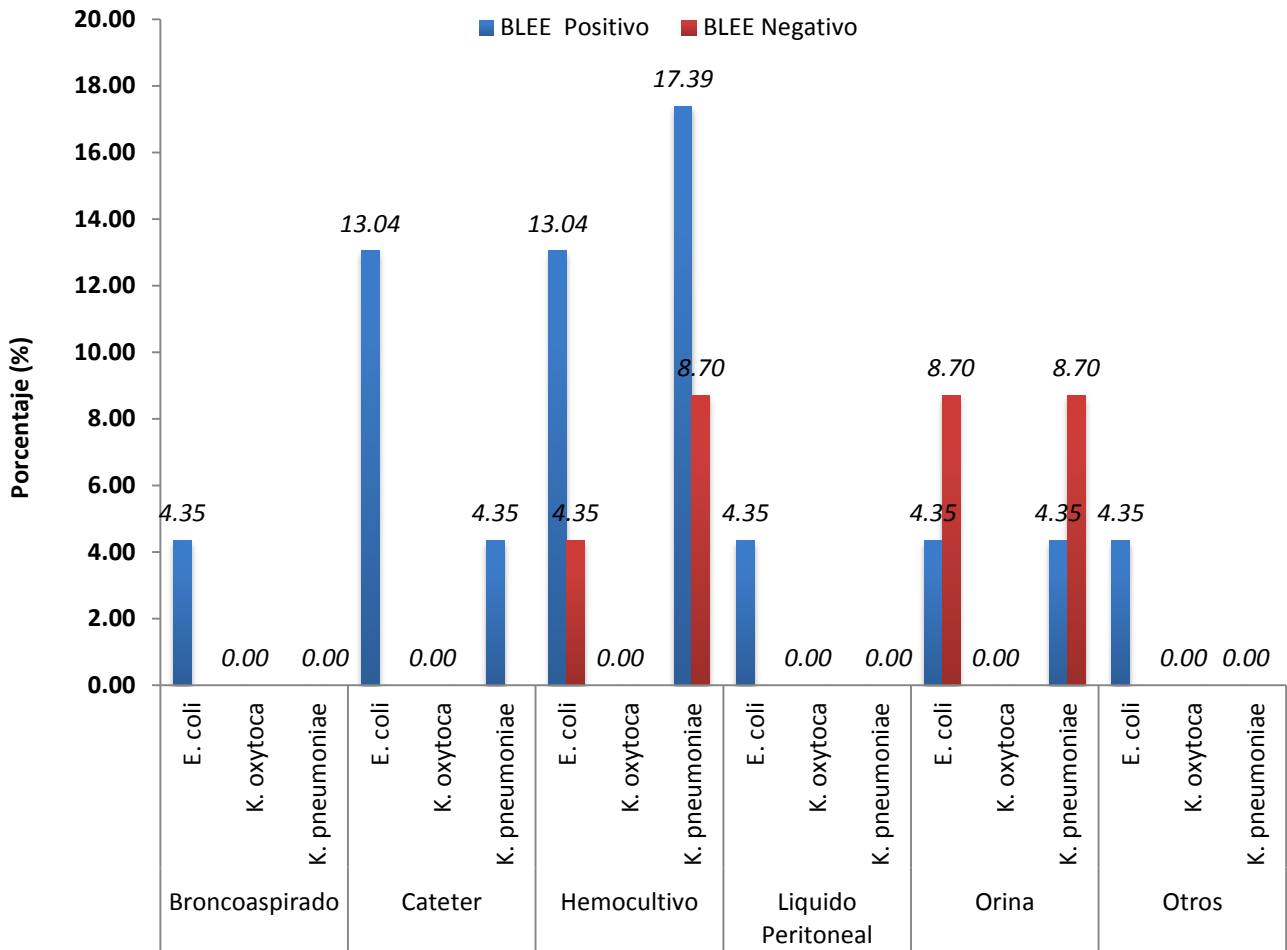
Gráfica 48.- Resultados de la sala UTIP del análisis de producción de BLEE del 2011



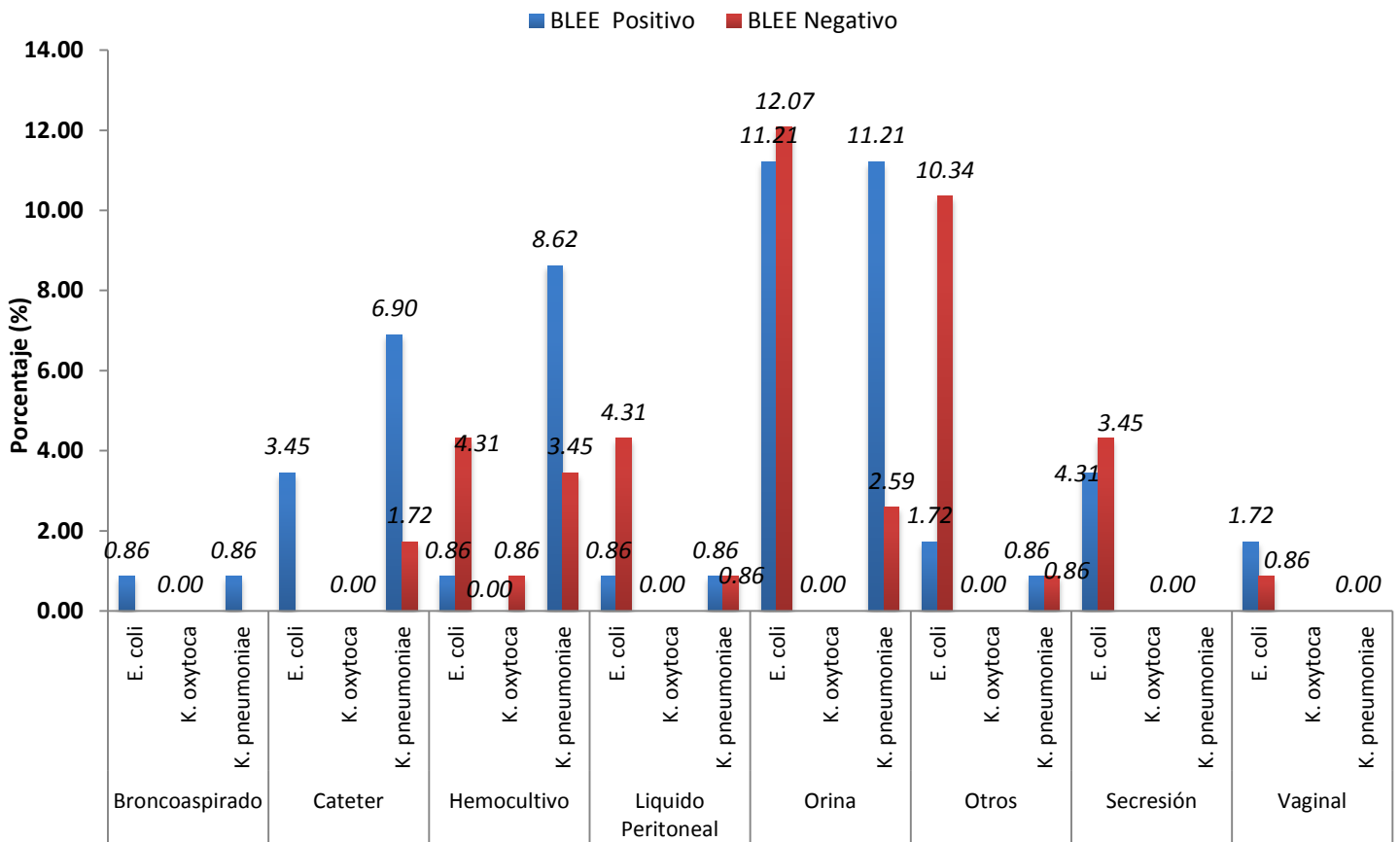
Gráfica 49.- Resultados de la sala de Transición del análisis de producción de BLEE del 2011



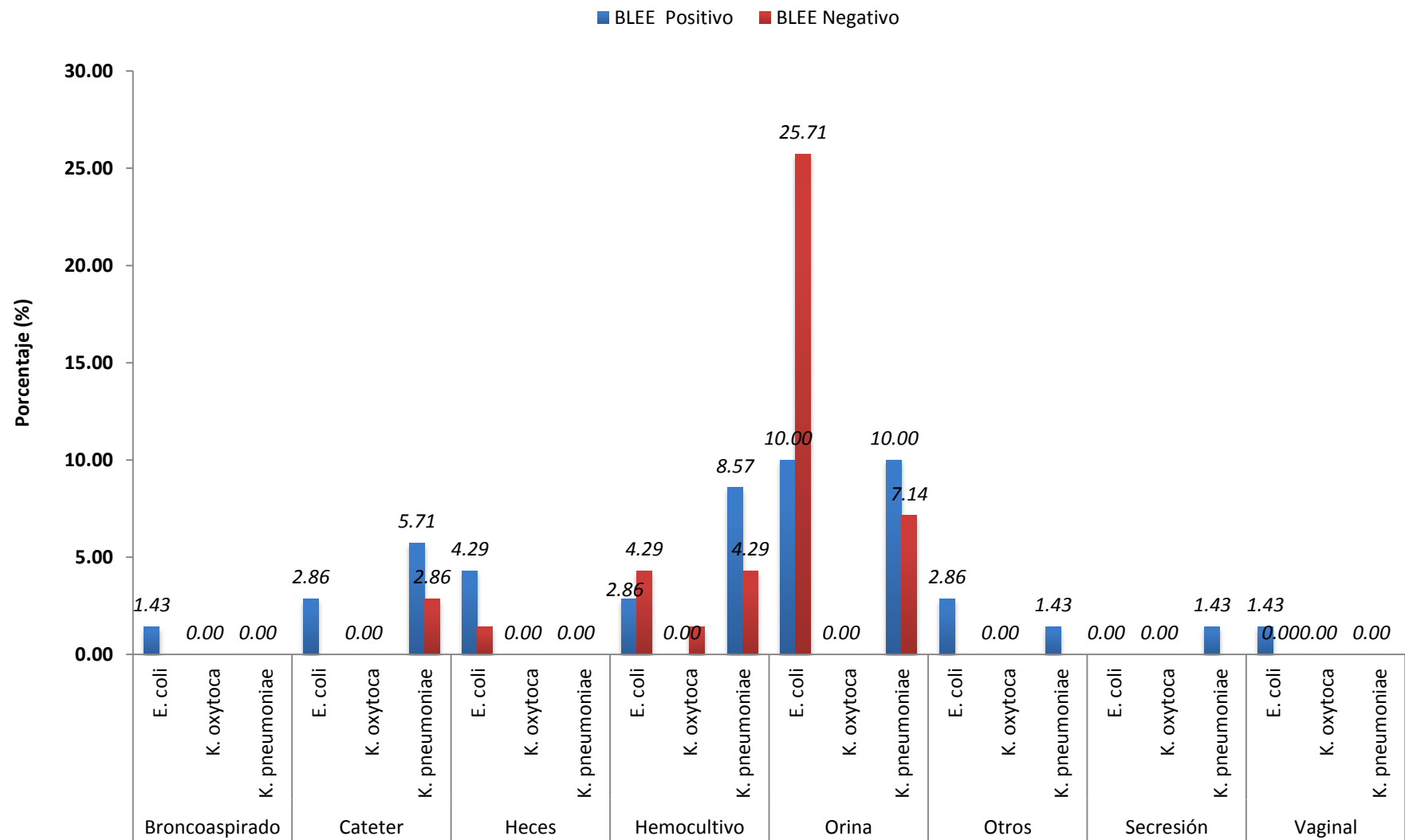
Gráfica 50.- Resultados de la sala Reumatología del análisis de producción de BLEE del 2011



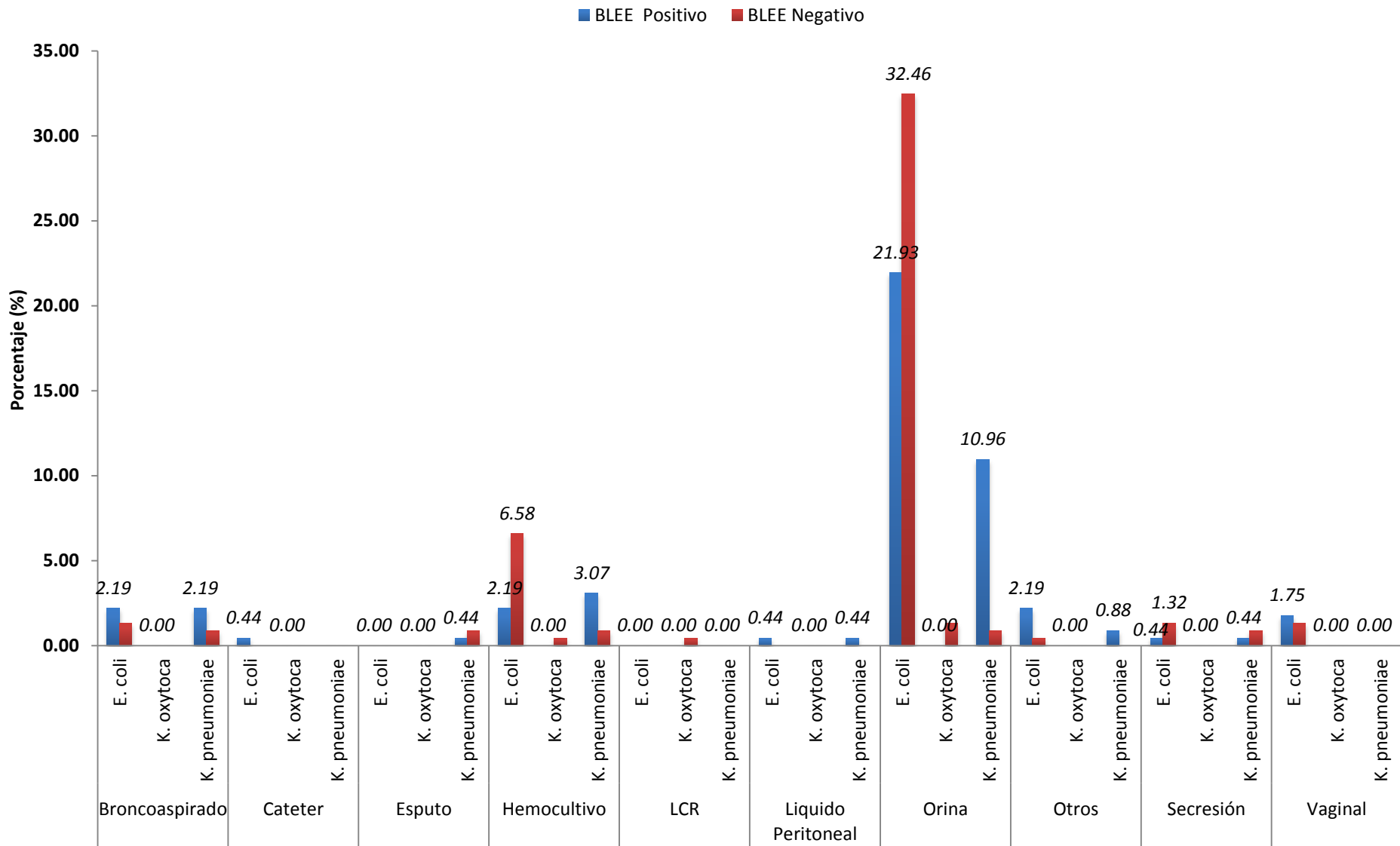
Gráfica 51.- Resultados de la sala Infectología del análisis de producción de BLEE del 2011



Gráfica 52.- Resultados de la sala Cirugía del análisis de producción de BLEE del 2011



Gráfica 53.- Resultados de la sala Gastroenterología del análisis de producción de BLEE del 2011



Gráfica 54.- Resultados de la sala de Urgencias del análisis de producción de BLEE del 2011

Anexo I

Complemento de las técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología: *Métodos fenotípicos iniciales*

ii. Prueba de sinergia con Sulbactam

En esta prueba se añade a los discos (Cefotaxima y Ceftazidima) 30 mg de Aztreonam ó 20 mg de Sulbactam. La prueba de sinergia con Sulbactam identifica una bacteria BLEE positiva cuando el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cualquiera de los tres discos con la combinación se incrementa por lo menos 5 mm. Sin embargo el empleo de esta prueba se encuentra limitado por su falta de estandarización por parte de la CLSI (Bertona, Et al, 2005).

iii. Microdilución en caldo

Esta técnica es la variante de la técnica de Difusión en agar con discos combinados, pero en este caso se estudian y analizan las CMI de las Cefalosporinas solas y en presencia de inhibidor, para lo cual se emplean diferentes diluciones en agar de los antibióticos antes mencionados. Para esta técnica es necesario probar concentraciones de Ceftazidima de 0.25-128 µg/ml y Cefotaxima 0.25-64 µg/ml y concentraciones de Ceftazidima/Ácido Clavulánico de 0.25/4-128/4 µg/ml y de Cefotaxima/Ácido Clavulánico de 0.25/4-64/4 µg/ml (Navarro, N. M., Et al, 2011; Seral, 2010). Se confirma la presencia de una BLEE cuando se produce una reducción de 3 diluciones ó más (8 veces) de la CMI de los antibióticos en presencia de Ácido Clavulánico, respecto a Cefotaxima o Ceftazidima sola (Seral, 2010). Además puede emplearse el método de Macrodilución en agar utilizando un replicador de Steer de acuerdo a las recomendaciones de CLSI (Díaz, Et al, 2009). Otra opción es emplear diluciones seriadas dobles desde 256 µg/ml hasta 0.125 µg/ml de Cefotaxima, Ceftriaxona y Ceftazidima (Camacho, Et al, 2004).

iv. Prueba de sinergia, doble difusión ó Método de Jarlier (Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología).

El método de difusión en agar con discos puede ser sustituido en la práctica por la sinergia en doble disco. Conocido como DDST (del inglés *Double Disc Synergy Test*), que

fue el primer método propuesto para el cribado de BLEE. Esta prueba se lleva a cabo en medio sólido (placa de agar Müeller-Hinton) inoculado con una suspensión bacteriana preparada de acuerdo a las normas establecidas, sobre la cual se sitúa un disco de Amoxicilina-Ácido Clavulánico (20 µg/10 µg) y en torno a este, 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 y Aztreonam, con una carga estándar de 30 µg/disco. Esta placa se incuba a un temperatura de 35°C ±1°C por un periodo de 18-24 horas en atmósfera aeróbica, posteriormente se realiza la lectura de las zonas de inhibición dando paso a la interpretación de producción de BLEE (Perozo, 2009; Fagundo, Et al, 2008; Casellas, Et al, 2005; Famiglietti, Et al, 2005; Lezameta, Et al, 2010; Camacho, Et al, 2008).

La ampliación ó 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 lo que es tomado como evidencia de la producción de una BLEE. Si el resultado de la DDST es negativo, pero la sospecha de producción de BLEE es alta, resultaría necesario repetir la prueba ajustando la distancia entre los discos, generalmente disminuyendo la distancia entre ellos a 20 mm, lo que aumenta la sensibilidad al menos en *E. cloacae*. Con *P. mirabilis* hay que aumentar la distancia hasta 45 mm, porque la BLEE se puede expresar a bajo nivel. 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 ya que debe tomarse especial atención a los discos con Cefotaxima y Ceftazidima. En cepas con problemas de permeabilidad o con resistencia simultánea a los inhibidores de betalactamasas puede verse mermada la capacidad de detección de producción de BLEE de esta prueba (Seral, 2010; Perozo, 2009; Trupia, Et al, 2005; Famiglietti, Et al, 2005; Sánchez, 2004; Morfin, 1999).

Es debido a esto que el presente método tiene limitaciones dependiendo fundamentalmente de la disposición de los discos y la interpretación de la sinergia, que puede ser errónea en el caso de personal no experimentado (Fagundo, Et al, 2008). La prueba de sinergia de doble disco de aislados de *P. mirabilis* que pueden producir la enzima PER-2, con actividad sobre Ceftazidima, otorga un descenso en la sensibilidad de

esta prueba con respecto a Ceftazidima y Ceftazidima/Ácido Clavulánico; sin embargo el uso de placas suplementadas con Clavulanato (MH-cla) lo que puede incrementar la sensibilidad a Ceftazidima, especialmente en los aislados de *P. mirabilis* (Piersigilli, Et al, 2009). Para el caso particular de *P. aeruginosa* la sinergia entre Ceftazidima y la combinación de Ceftazidima con Ácido Clavulánico puede ser evaluada de manera más precisa si la distancia entre los discos es de 15 a 20 mm de borde a borde. Un agrandamiento en los halos de inhibición por parte de la Ceftazidima en la zona adyacente al disco de Ceftazidima/Ácido Clavulánico es interpretado como posible presencia de BLEE, aunque la metodología no se encuentre completamente estandarizada para microorganismos no fermentadores (Truppia, Et al, 2005; Garciadiego, 2011).

El método de Jarlier ó DDT ha demostrado ser tan sensible y específico, y presenta ventajas competitivas que convierten a esta prueba en una buena opción para la confirmación de BLEE, ello debido a que emplea los mismos materiales y procedimientos de un antibiograma de rutina, y a diferencia del método americano CLSI, no emplea discos de susceptibilidad adicionales y por lo tanto no requiere pruebas de tamizaje, lo que disminuye el tiempo de respuesta, implicando menores costos de procesamiento; se suma a ello, el ser operativamente más sencillo, sobre todo cuando se requiere evaluar un número elevado de muestras clínicas.

v. *Confirmación fenotípica mediante E test*

La técnica de difusión en gradiente (Etest, Epsilon-test ó específicamente Etest-ESBL) con tiras combinadas de Cefalosporinas con y sin inhibidor de BLEE es un método más fácil para la detección de cepas con este tipo de enzimas, pudiéndose incluso sustituir en la práctica la prueba de Microdilución en caldo por estas tiras, que son en general un método más sensible, específico y más cómodo, aunque menos económico (Navarro, N. M., Et al, 2011; Desimoni, et al, 2004; Garciadiego, 2011). Para detectar BLEE por esta técnica se utilizan un conjunto de tiras de material no poroso del que están constituidas comercialmente las tiras de Etest, que contienen en una mitad una concentración creciente de la Cefalosporina a probar (Cefotaxima, Ceftazidima o Cefepima), y por otro lado y una concentración creciente de la misma Cefalosporina asociada a una concentración constante de Ácido Clavulánico: Ceftazidima/Ácido Clavulánico con rangos

de CIM 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 $\mu\text{g/ml}$ (Camacho, Et al, 2004). La cantidad de antibiótico es fija y la zona de inhibición es elíptica pudiéndose determinar la CIM visualmente (Alpuche, 2002).

Esta prueba se lleva a cabo en medio sólido (placa de agar Müller-Hinton) usando un inóculo estandarizado de acuerdo a los lineamientos sobre la cual se sitúan las tiras correspondientes de E test ESBL. La CIM se determina en el punto donde la elipse de inhibición del crecimiento intercepta la escala de la tira considerándose la prueba como positiva para la producción de BLEE si la sinergia con el Ácido Clavulánico cuando la CMI disminuye en dos o más diluciones; es decir cuando hay diferencia en la CIM obtenida por el lado de la tira con el antibiótico solo y el otro lado de la tira (Morfin, 1999). Para poder confirmar la producción de BLEE 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 BLEE (Perozo, 2009; Camacho, Et al, 2004). Si no se siguen estas reglas, la sensibilidad de la técnica disminuye y se observan discrepancias en la lectura (Seral, 2010).

Si se observan colonias en los halos de inhibición, el valor de la CMI deberá determinarse observando cuál es la CMI a la que todas las mutantes han sido inhibidas. Como se describió anteriormente, se recomienda utilizar tiras de Ceftazidima y Cefotaxima ya que todas las enzimas no hidrolizan por igual estos antibióticos. En caso de sospecha de AmpC, se debe colocar una tira con Cefepima. En ocasiones esta prueba es difícil de interpretar por la baja producción de enzimas, además de que en ocasiones se forma 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 (Camacho, Et al, 2004), la deformación de elipses de inhibición y porque el Clavulanato difunde en el agar interfiriendo con la mitad de la tira que contiene Ceftazidima sola (Fagundo, Et al, 2008). En algunos casos el fabricante recomienda la utilización de dos tiras (TZ/TZL, CT/CTL) en el caso de microorganismos que no producen betalactamasas de tipo AmpC e incluir la tira de PM/PML en el caso de microorganismos productoras de estas enzimas (Seral, 2010; Camacho, Et al, 2004; Sánchez, 2004). Se sugieren las siguientes cepas para el control de calidad de esta prueba: *E. coli* ATCC 35218, ATCC 25922 (no productor de BLEE); además de *K. pneumoniae* CRB-

2544R, BLEE positiva (Perozo, 2009). La capacidad de detección de esta prueba ha sido evaluada en diversas cepas de microorganismos productores de BLEE obteniéndose en algunos casos una sensibilidad y especificidad superior al 99% (Garciadiego, 2011).

vi. Método de Hodge

Se realiza empleando una suspensión de la cepa de *E. coli* ATCC 25922, con turbidez equivalente al tubo N.º 0,5 de la escala de McFarland, esta suspensión se inocula en una placa de agar Müller-Hinton de acuerdo a las especificaciones de la CLSI. Se utiliza una placa por cada disco (CTX, CRO, ATM, FEP, CAZ) que son los sustratos a identificar. Se realiza una estría de 2 cm de la cepa a investigar, desde el centro hacia afuera del disco. La presencia de la enzima se identifica al observar una deformación del halo de inhibición de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 al disco con el sustrato en forma de hendidura (Lezameta, 2010).

El método de Hodge ha demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad, puesto que son técnicas que pueden usar diferentes antibióticos, lo que permite la identificación del mecanismo enzimático y el posible gen involucrado; es por tanto una herramienta útil, sobre todo en laboratorios de referencia. No obstante, tiene diversas desventajas, una de ellas es que para su ejecución se requiere la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922, la cual implica un consecuente aumento de los costos operativos, además de que su aplicación requiere adiestramiento especial del personal para la ejecución manual de la prueba y la interpretación de los resultados, ya que en muchos casos la cepa en estudio puede ser productora de BLEE, pudiéndose encontrar en bajas concentraciones, debido a que la expresión fenotípica de enzimas esta sujeta a una serie de factores reguladores, que podrían conducir a resultados no evidentes y de difícil interpretación (Lezameta, 2010).

vii. Placas de agar Müller-Hinton suplementado con Clavulanato de litio

Para la aplicación de esta prueba se preparan placas de 90 mm de diámetro con 25 ml de agar Müller-Hinton, suplementado con Clavulanato de Litio (MH-cla) en una concentración final de 4 µg/ml, y placas con 25 ml de agar Müller-Hinton sin inhibidor. En ambas placas se siembra un inóculo bacteriano equivalente en densidad a la escala 0.5

McFarland, empleándose discos de CTX (30 µg) y CAZ (30 µg) incubándose 18-24 horas a 37°C en aerobiosis.

Posteriormente se comparan los diámetros de halo de inhibición obtenidos en ambas placas por cada aislado. Un incremento mayor o igual a 5 mm en la zona de inhibición del disco ensayado en la placa suplementada con inhibidor es considerado positivo para la detección de BLEE (Truppia, Et al, 2005).

viii. Efecto del Inóculo

Esta prueba esta diseñada para analizar el efecto *in vitro* del efecto del inóculo en la determinación de las CIM de los métodos anteriores ya que se ha demostrado que el exceso de betalactamasas que se acumulan durante las 18 horas de incubación para determinar la CIM, no concuerda con la realidad *In vivo* cuando se emplean antibacterianos que se administran cada 12 horas (como Cefepima). Un ejemplo de esto es la BLEE de tipo CTX-M-2, que afecta notablemente a Cefepima y más aún cuando los inóculos son altos, como ocurre en abscesos, herida, orina, pulmón, etc. Se puede comprobar el efecto del inóculo en los aislados estudiados realizando la determinación de la CIM a concentraciones de 10^5 UFC/ml comparativamente con 10^8 UFC/ml frente a Piperacilina-Tazobactam, Cefepima y Meropenem. Se considera que existe efecto del inóculo cuando la CIM a alto inóculo si fue superior en 2 ó más diluciones al obtenido con inóculo habitual (Casellas, Et al, 2005).

Anexo II

Complemento de las técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología: *Métodos bioquímicos*

La mayoría de estos métodos se aplican una vez confirmada la presencia de la BLEE en el aislado correspondiente y sirven para caracterizar dicha enzima. Los métodos bioquímicos incluyen el isoelectroenfoque, el análisis del perfil de sustrato, la cinética enzimática y la determinación de la cinética de inhibición (IC_{50}) para diferentes inhibidores de betalactamasas (Garcíadiago, 2011).

i. Determinación del punto isoeléctrico

El isoelectroenfoque (IEF) permite conocer el punto isoeléctrico (pI) de la proteína y era de gran utilidad cuando existían pocas BLEE descritas, en la actualidad, se utiliza poco debido a la descripción de diferentes BLEE que comparten idéntico pI, sin embargo, es muy útil si se combina con el análisis del fenotipo de sensibilidad ya que puede orientar el tipo de BLEE para un análisis posterior del perfil de sustrato a estudio molecular (Álvarez, 2010; Garcíadiago, 2011).

Se cultiva la cepa sobre un medio de cultivo adicionado de una de las Cefalosporinas a las que ha demostrado ser resistente, con el fin de que se produzca una mayor cantidad de enzima. Posteriormente se obtiene un extracto crudo de las betalactamasas tras lisar el cultivo por sonicación y purificar el extracto proteico por ultracentrifugación, el cual se somete a una electroforesis en gel de poliacrilamida por gradiente de pH con un intervalo entre 3 y 9 y tras la coloración con Nitrocefina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ó por el método yodométrico, se comparan los pI obtenidos con los de otras betalactamasas conocidas (patrón de referencia); también pueden revelarse los pI cubriendo el gel con *E. coli* J53-2 sensible a Cefotaxima y Cefotaxima suspendidas en agar suave (0.7%), incubando en cámara húmeda a 37°C, registrando posteriormente los punto de crecimiento bacteriano para establecer el valor del pI (Castro, Et al, 2008).

Esta técnica bioquímica es útil para detectar varias enzimas en un mismo aislamiento o para limitar el número de enzimas que hay que investigar y escoger las amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Seral, 2010; Casellas, Et al, 2005; Truppia,

Et al, 2005; Espinal, Et al, 2004; Bertona, Et al, 2005). Para el control de calidad de esta prueba se deben emplear extractos enzimáticos crudos que incluyen las cepas bacterianas productoras de betalactamasas TEM a (pI 5.4), SHV-1 (pI 7.6), SHV-5 (pI 8.0) y MIR-1 (pI 8.4).

ii. Perfil del sustrato

Este es imprescindible para la caracterización final de las BLEE ya que se basa en la obtención y análisis de la cinética enzimática, la cual en general permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico. Esta evidencia bioquímica es imprescindible ya que en este caso se obtiene la tasa de hidrólisis de las BLEE frente a diferentes sustratos betalactámicos ($V_{m\acute{a}x}$) la cual es determinada espectrofotométricamente, generalmente a una concentración elevada (1mM), en comparación con un sustrato estándar (Becilpenicilina, Cefaloridina o Nitrocefina). Como complemento del perfil de sustrato suele determinarse la concentración de inhibidor (Ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam en el caso de las BLEE) que reduce la actividad hidrolítica de una betalactamasa cuando se compara con un control obteniéndose finalmente la cinética de inhibición de la enzima estudiada (IC_{50}). En algunos casos es preciso definir el mecanismo de actuación de la enzima mediante el estudio cinético de la constante afinidad (K_m) y la eficiencia relativa de hidrólisis ($V_{m\acute{a}x}/K_m$). La mayoría de estas determinaciones se realizan solo en laboratorio especializados en los que se realiza una caracterización bioquímica de las betalactamasas (Garcíadiego, 2011).

Anexo III

Complemento de las técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología: *Métodos genotípicos*

Este tipo de métodos permiten identificar las BLEE y llevar a cabo la investigación epidemiológica a fondo (Castro, Et al, 2008). Lo que permite conocer los brotes epidemiológicamente complejos, que pueden comprender en su forma más simple la proliferación clonal de una cepa productora de una única BLEE, pero también permite el estudio de la diseminación de diversas BLEE en el mismo brote, logrando descubrir las diversas proliferaciones clonales de varias cepas con distintas BLEE o la existencia de diferentes plásmidos entre los miembros de una misma cepa. Adicionalmente permite realizar diferentes investigaciones acerca de bacterias no relacionadas genotípicamente. La capacidad de propagación de las BLEE es extraordinaria y se ha comprobado la transmisión inter hospitalaria, interurbana e incluso entre países por lo cual el conocer las características genéticas de cada clona permite una dilucidación más exacta del problema y por lo tanto la aplicación de medidas de control más específicas y por lo tanto más eficaces. Los métodos más utilizados son el perfiles plasmídicos, electroforesis en gel de campos pulsados (PGE), ribotipificación y otros métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Álvarez, 2010).

i. PCR

Las técnicas de amplificación son las que más éxito han tenido, ya que permiten la secuenciación posterior del producto de PCR. 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 las BLEE ya que permite detectar los genes *bla* que codifican a estas enzimas (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, etc.) (Garcíadiego, 2011; Celis, Et al, 2009; Guzmán, 2009; Garza, 2010).

Se puede realizar el análisis de restricción de un fragmento amplificado del DNA ribosómico PCR-RFLP, técnica que radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR y la amplificación polimorfa del DNA. El análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencillas de DNA ha sido utilizada con éxito para

la identificación de variantes de betalactamasas de las familias: TEM, SHV, CTX, TLA y OXA (Mantilla, Et al, 2008).

La PCR ha logrado dilucidar la amplia diseminación de BLEE de tipo TEM y SHV, permitiendo conocer el diverso número de mutaciones en las nuevas BLEE que pertenecen a estas y otros tipos de BLEE. Es así como se descubrió que *K. pneumoniae*, está asociada con la movilidad de plásmidos conjugativos (Mantilla, Et al, 2008; Garcíadiago, 2011; Castro, Et al, 2008). En base a este descubrimiento se ha realizado protocolos donde se demostró la transferencia de plásmidos por conjugación la cual se promueve entre los aislamientos clínicos (Castro, Et al, 2008; Casellas, Et al, 2005; Truppia, Et al, 2005; Espinal, Et al, 2004; García, Et al, 2005).

Anexo IV

Complemento de las técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología: *Bioensayos*

La utilización de bioensayos, como la prueba de Masuda o el método tridimensional pueden ser adecuados para demostrar la presencia de estas enzimas en cepas en las que existan dudas acerca de su producción. Ambas pruebas, dependiendo de los sustratos que se utilicen son útiles para cualquier tipo de betalactamasa. A pesar de su versatilidad, son engorrosas de realizar y han tenido poco éxito (Álvarez, 2010).

i. Prueba de Masuda

La presente prueba consiste en la disposición de un microorganismo indicador sensible (generalmente *E. coli* ATCC 25922, no productor de BLEE) a los sustratos hidrolizados (en este caso Cefotaxima, Ceftazidima o Aztreonam) por la betalactamasa que se pretende detectar. Estos sustratos (sensidiscos) se colocan en el centro de diferentes placas, colocando en las zonas marginales del halo de inhibición discos de papel impregnados con el extracto enzimático del microorganismo a estudiar además de controles positivo y negativo, obtenidos por sonicación. La distorsión de halo de inhibición en el microorganismo sensor nos indica la presencia de la BLEE. Además de ser procedimientos laboriosos, tiene el inconveniente de la obtención resultados poco interpretables cuando existe más de una enzima en el microorganismo a estudiar, sobre todo en los casos en los que las betalactamasas compartan sustratos en su hidrólisis, como es el caso de los productores de AmpC.

ii. Método tridimensional

El método tridimensional descrito por Thomson *et al.*, es un bioensayo, basado en la determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia presente en microorganismos capaces de hidrolizar un antibiótico determinado. Consiste en la disposición de un microorganismo sensor sensible a los antibióticos betalactámicos (generalmente *E. coli* ATCC 25922, que es un BLEE negativo), realizando posteriormente un surco en el que se dispone el extracto sonificado del microorganismo, colocando a su vez discos con antibióticos a una distancia de unos 3 mm del surco (Lezameta, Et al, 2010).

Para llevar a cabo este método se realiza una suspensión de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 con turbidez equivalente al tubo N.º0,5 de la escala de Mac Farland, que se inocula en una placa de agar Müeller-Hinton, colocando subsiguientemente en el centro de la placa los discos conteniendo los sustratos por identificar (CTX, CRO, ATM, FEP, CAZ), se realiza un surco perpendicular al disco en forma circular, realizando en el extremo final un orificio de 2 mm en la cual se inocula 20 µL de la cepa problema de una suspensión equivalente al tubo 5 de la escala Mac Farland. La presencia de la enzima se identifica al observar una hendidura en el halo de inhibición, el crecimiento de la cepa indicadora de *E. coli* ATCC 25922 hacia el disco empleado como sustrato, lo que genera una distorsión de los halos de inhibición lo que es indicativo del perfil de sustrato de la enzima (Lezameta, Et al, 2010). Con esta prueba se determina simultáneamente la susceptibilidad a los antimicrobianos y la BLEE. Esta última se infiere al encontrar una distorsión de la zona de inhibición hacia la hendidura circular. La inactivación enzimática se detecta cuando al difundir a través de la hendidura la difusión del antibiótico se detiene y se pierde la zona de inhibición circular común. Debido a las implicaciones manuales que posee esta metodología la aplicación rutinaria en los laboratorios de bacteriología es poco usual (Morfin, 1999). Es una prueba engorrosa de realizar, pero tiene la ventaja de utilizar diferentes sustratos. Esto permite, al menos cualitativamente, determinar el perfil de sustrato de la enzima presente en el microorganismo a estudiar (Álvarez, 2010; Morfin, 1999).

Como control negativo, se utiliza la cepa de *E. coli* ATCC 25922 BLEE negativa y como control positivo *K. pneumoniae* ATCC 700603 BLEE positiva; el control de calidad de los discos empleados tanto para el tamizaje como para los cuatro métodos se requiere su verificación usando cepas ATCC de *E. coli* 25922 y *E. coli* 35218, cumpliendo satisfactoriamente con los criterios establecidos por el CLSI (Lezameta, Et al, 2010).

iii. Métodos cromogénicos para la detección de BLEE

En los análisis microbiológicos el empleo de medios de cultivo bacteriano selectivos y diferenciales permite acortar el periodo de análisis. Se han diseñado medios cromogénicos suplementados para el aislamiento selectivo y la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEE. Se encuentran descritos diferentes medios de

este, siendo los más habituales los que basan su eficacia en la inclusión dentro de sus componentes de Oximino-Cefalosporinas (Cefotaxima o Ceftazidima). Los medios base a los que se añaden a estos antibióticos suelen ser el agar MacConkey, agar de Driglasky o agar nutritivo con Vancomicina y Anfotericina B (Del Castillo, Et al, 2011; Seral, 2010). Entre ellos se encuentra el ChromID ESBL (bioMérieux), Brilliance ESBL agar (Oxoid) y el CHROMagar™ ESBL (CHROMagar) (Navarro, N. M., Et al, 2011).

1) chromID ESBL

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 BLEE más frecuentes: *E. coli*, especie productora de betaglucuronidasa, el grupo de géneros que producen betaglicosidasa como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*, y finalmente, los géneros *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*, que producen una desaminasa. Mientras que la identificación en cuanto a especie o grupo es directa, la producción de BLEE debe confirmarse con una o más pruebas adicionales recomendadas por la CLSI (Del Castillo, Et al, 2011).

Las placas después de ser sembradas con la muestra, se incuban a 35°C ±1°C efectuando lecturas a 24 y 48 hrs. La identificación de los aislados se realiza con pruebas bioquímicas (oxidasa, TSI, ureasa e indol) y con APIE. Puede realizarse también la identificación y el antibiograma con el sistema Vitek 2 (Romero, Et al, 2009). El cribado posterior sugerido para la detección de producción de BLEE puede llevarse a cabo mediante la técnica de doble disco con Ceftazidima, Ceftazidima/Ácido Clavulánico además de Cefotaxima y Cefotaxima/Ácido Clavulánico en agar Müller-Hinton. Si se sospecha de hiperproducción de AmpC se ha recomendado el empleo de agar Müller-Hinton suplementado con 200 mg/l de Cloxacilina. La evaluación de la hiperproducción de AmpC se realiza comparando los halos de Cefotaxima, Cefotaxima/Ácido Clavulánico y además de Ceftazidima, Ceftazidima/Ácido Clavulánico, si se observa un aumento de halo en los 4 discos en presencia de Cloxacilina, se considera hiperproducción de AmpC (Del Castillo, Et al, 2011). Para el control de calidad de este medio el fabricante sugiere utilizar la cepa de *E. coli* ATCC 25922 (no productor de BLEE) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 (productor de BLEE).

El medio chromID permite la identificación directa de *E. coli* en 24 h sin pruebas adicionales con un 100% de concordancia con las pruebas bioquímicas, por lo que permite descartar de forma rápida a portadores de BLEE. Este medio muestra una sensibilidad del 88% y una especificidad del 58% para el cribado en 24 h de portadores de BLEE y es más selectivo para el crecimiento de hiperproductores de Cefalosporinas que el agar McConkey con 4 mg/l de Cefotaxima. Sin embargo es necesario una identificación ampliada para todas las enterobacterias excepto en el caso de colonias betaglucuronidasa positiva (rojo-púrpura), que son directamente identificadas como *E. coli* (Del Castillo, Et al, 2011). Debe considerarse además que su utilidad en la identificación de cepas productoras de BLEE a partir de hemocultivos es de gran utilidad ya que la sensibilidad y la especificidad de este medio para la detección de microorganismos productores de BLEE empleando este tipo de muestras es del 95% y del 69% respectivamente, siendo una alternativa menos laboriosa, de un costo accesible que E test y que los protocolos especiales para inoculación de paneles comerciales de Microdilución, en la detección de BLEE (Romero, Et al, 2009).

2) Método cromogénico Cica-beta-Test

Este método rápido que es empleado para la detección rápida de BLEE directamente de la colonia de enterobacteria aislada. El método utiliza una Cefalosporina cromogénica (HMRZ-86) y el Ácido Clavulánico como inhibidor para detectar rápidamente si el aislado es portador de una BLEE. Esta técnica permite detectar metalobetalactamasas y enzimas de tipo AmpC hiperproducidas mediante el uso de EDTA y Ácido Borónico (Navarro, F., Et al, 2011).

Anexo V

Complemento de las técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología: *Otros sistemas automatizados para la detección de BLEE*

ii. *Phoenix*

El instrumento Phoenix, ha demostrado ser un equipo que realiza la confirmación de las enzimas BLEE de forma rápida lo que otorga ventajas al médico y al paciente. Este equipo se introdujo en el 2006 y tiene como ventaja realizar en el mismo panel del antibiograma, la detección de las BLEE y las pruebas necesarias para su confirmación, permitiendo proporcionar este resultado oportunamente con una sensibilidad del 99% y una especificidad del 98.9% para la detección de BLEE en aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

La identificación de las cepas puede realizarse a partir de cultivos puros previamente analizados bajo las pruebas recomendadas por la CLSI para la detección de cepas productoras de BLEE o a partir de placas de CHROMagar, posteriormente en el instrumento Phoenix procede a realiza el antibiograma y se confirma la expresión de las enzimas, preparando previamente una suspensión bacteriana en el caldo Phoenix ID *broth* SP1 ajustándola al 0.5-0.6 del estándar de McFarland, utilizando el nefelómetro de Phoenix Spec, posteriormente se adiciona 25 µl de la misma al caldo Phoenix AST *broth* SP, suplementándolo con una gota del indicador AST Phoenix (indicador de ácido reducción basado en Alamar Azul). Los paneles inoculados son colocados en el instrumento para su incubación y lectura hasta la obtención de los resultados. Los antibióticos evaluados y sus intervalos de concentración en µg/ml son: 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), Cefoxitina (4-16), Imipenem (1-8), Amikacina (8-32), Gentamicina (2-8), Tobramicina (2-8), Ciprofloxacina (0.5-2), Levofloxacina (1-4), Ácido Nalidíxico (8-32), Nitrofurantoína (16-64) y Trimetoprim/Sulfametoxazol (0.5/9.5-2/38). Los resultados de la CIM, tanto de los antibióticos utilizados para realizar el antibiograma, como los empleados para la confirmación de las BLEE, son interpretados por el sistema Phoenix, que consistente en una serie de reglas que analizan los patrones de

susceptibilidad para cada uno de los microorganismos identificados, aplica las reglas indicadas por CLSI. La difusión en agar y PCR pueden utilizarse como pruebas complementarias. En el control de calidad de este sistema automatizado, se emplean cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922, no productor de BLEE) y *K. pneumoniae* (ATCC 700603) (Fagundo, Et al, 2008).

Anexo VI

Complemento de las técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología: *Detección de BLEE en microorganismos productores de AmpC*

Las AmpC constituyen otro tipo de betalactamasas que, a diferencia de las BLEE, no poseen en la actualidad un método estandarizado por ningún comité u organización de expertos (CLSI, EUCAST, CASFM) para su detección fenotípica lo cual dificulta su detección. Esto aunado a la dificultad para dilucidar fenotípicamente si se está en presencia de una AmpC cromosómica o plasmídica, y a la carencia de inhibidores de AmpC para uso *in vivo*, hacen considerar a estas enzimas como un emergente problema terapéutico (Navarro, F., Et al, 2011; Seral, 2010; Del Valle, 2009).

Los métodos fenotípicos para la detección de AmpC plasmídicas son sencillos y económicos, pero solo resultan de utilidad en aislados que no tienen una AmpC cromosómica natural (*Kebsiella spp.*, *S. enterica*, *P. mirabilis*) o que la expresan constitutivamente a muy bajo nivel, como ocurre en *E. coli*. La presencia de AmpC plasmídica debe sospecharse cuando estos aislados presenten un patrón de resistencias a betalactámicos (fenotipo AmpC) diferente al de su respectivo fenotipo salvaje o de resistencia natural. Los métodos fenotípicos más rentables por su eficacia, su sencillez además de su bajo coste económico, son el método de sinergia de doble disco (usando discos de Cloxacilina o Ácido Fenil-Borónico y discos de Cefotaxima y Ceftazidima) y el método de discos combinados con inhibidores. Existen otros métodos fenotípicos bastante sensibles, pero son más complejos o más caros que los anteriores (agar Cefoxitina, Etest de Cefotetán/Cefotetán más Cloxacilina) (Navarro, F., Et al, 2011).

Los métodos fenotípicos empleados de detección de betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas tienen varias limitaciones importantes que deben ser consideradas para poder realizar una interpretación fiable de los resultados obtenidos. El distinguir correctamente su hiperproducción a una BLEE es importante ya que varios autores han planteado que las enterobacterias productoras de betalactamasas de tipo AmpC pueden interferir en el diagnóstico correcto de las BLEE, por que como se señaló anteriormente estas enmascaran la detección de las BLEE debido a que responden de la misma manera al cribado, resistiendo la inhibición por Ácido Clavulánico, que además puede actuar

como inductor de la betalactamasa AmpC presente en el cromosoma de determinadas especies (Seral, 2010; Álvarez, 2010; Navarro, F., Et al, 2011; Garcíadiago, 2011; Del Valle, 2009).

i. Aspectos generales en la detección de AmpC

Existen diversos aspectos a considerar cuando se realiza un análisis de probable producción de AmpC empleando las pruebas de cribado tradicionalmente empleadas para la detección de BLEE (Del Valle, 2009). Este es el caso de la Cefpodoxima, antibiótico cuyo uso en las pruebas de sensibilidad anteriormente se defendía ya que se consideraba como el mejor sensor para sospechar la presencia de BLEE, sin embargo este antibiótico puede verse también afectado por la hiperproducción de AmpC. Otros antibióticos cuya actividad se ve afectada por la producción de AmpC son la Cefotaxima y Ceftazidima, este último ve disminuida su actividad en presencia de betalactamasas de tipo AmpC como las producidas por *E. cloacae* (Seral, 2010; Famiglietti, Et al, 2005; Del Valle, 2009).

La Cefepima es un elemento de especial análisis cuando se trata de enterobacterias productoras de AmpC inducible, ya que esta es la Cefalosporina de cuarta generación que se ve menos afectada por las resistencias de tipo AmpC, sin embargo su empleo como sensor de producción de AmpC no es infalible ya que existen microorganismos como *E. aerogenes* que cuando presentan hiperproducción de AmpC dada por alguna modificación de algún aminoácido, muestran actividad hidrolítica sobre este antibiótico (Seral, 2010; Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

Las enterobacterias productoras de betalactamasas tipo AmpC pueden desarrollar resistencia durante el tratamiento con Cefalosporinas de tercera generación, por lo tanto se debería aplicar la prueba de sensibilidad en aquellos aislamientos obtenidos luego de tres o cuatro días de tratamiento (Famiglietti, Et al, 2005). Es por eso que actualmente el mejor sistema es aquel que utiliza varias Cefalosporinas simultáneamente y emplea criterios habituales en la lectura interpretada del antibiograma (Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

En el caso concreto de *E. coli*, el empleo del método de inducción de AmpC puede resultar útil en la detección de AmpC plasmídica puesto que un resultado positivo solo es posible

si la adquisición de una AmpC plasmídica es inducible y se descartando la hiperproducción de la AmpC cromosómica, dado que ésta no es inducible. Se ha descrito otro método simple para diferenciar las AmpC plasmídicas de las AmpC cromosómicas que puede ser de utilidad, el cual consiste en visualizar en los aislados productores de AmpC plasmídicas, las colonias dispersas por el borde de los halos de inhibición con discos de Cefoxitina, Cefotaxima, Ceftazidima y Aztreonam (Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

1) Amoxicilina-Ácido Clavulánico

La sensibilidad intermedia o resistencia a Amoxicilina-Ácido Clavulánico y a algunas de las Cefalosporinas de tercera generación es un marcador de utilidad para la diferenciación entre BLEE y AmpC. Ya que la sensibilidad a la Amoxicilina-Ácido Clavulánico descarta la betalactamasa de tipo AmpC y apunta a una BLEE ya que esta además presenta la resistencia a Cefalosporinas de tercera generación anteriormente mencionada. No obstante la resistencia a Amoxicilina-Ácido Clavulánico no solo puede ser dada por las AmpC sino también puede deberse a una elevada producción de BLEE o a la existencia de BLEE resistentes a inhibidores, además de otros múltiples mecanismos de resistencia que pueden coexistir o no con la BLEE como IRT, enzimas OXA, hiperproducción de SHV-1, TME-1 , K1, etc. Por lo que una estrategia para la correcta interpretación de resistencia y sensibilidad es el disminuir la distancia entre los discos de Cefalosporinas o Aztreonam y el de Amoxicilina-Ácido Clavulánico a 25 o incluso 20 mm (Seral, 2010; Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

2) Cefoxitina

Este antibiótico es un marcador fenotípico muy utilizado para diferenciar la producción de AmpC de la de BLEE es la Cefoxitina. Salvo algunas excepciones, los aislados con fenotipo AmpC son generalmente resistentes a Cefoxitina, mientras que los aislados productores de BLEE suelen ser sensibles a este antibiótico ya que no lo hidrolizan, pero si manifiestan resistencia a las Cefalosporinas de tercera generación, a las cuales si hidrolizan. Sin embargo esta sensibilidad por parte de los microorganismos productores de BLEE esta condicionada por la alteración de la permeabilidad de la membrana (Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

La resistencia a la Cefoxitina y a la combinación Amoxicilina-Ácido Clavulánico refuerza la sospecha de la presencia de una AmpC plasmídica. Otro mecanismo de resistencia que podría afectar a la Cefoxitina es la impermeabilidad de la membrana por su alteración de las porinas, que se descarta con un disco de Cefotetán, que da el fenotipo de resistente en el caso de una cepa productora de Cefalosporinas tipo AmpC (Seral, 2010; Del Valle, 2009).

A pesar de esto la Cefoxitina se considera como un buen indicador asociado a la conocida resistencia a las Cefalosporinas de tercera generación, aunque algunas enzimas pueden mostrarse sensibles a Cefamicinas (Seral, 2010; Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

3) Cefotetán

Como se menciona anteriormente, el uso de la Cefoxitina en la discriminación de una cepa productora de betalactamasas tipo AmpC tiene ciertas limitaciones dado que en ciertos casos pueden existir cepas resistentes, este fenómeno se presenta porque el mecanismo de acción de este antibiótico depende de la permeabilidad de la membrana, que en ciertos casos se ve afectada por la pérdida o disminución en la expresión de alguna porina, lo que origina la impermeabilidad del antibiótico originando su fenotipo de resistencia.

Para descartar este mecanismo de resistencia que podría afectar el empleo de la Cefoxitina como marcador fenotípico se puede emplear un disco de Cefotetán, una Cefamicina cuyo efecto no es dependiente de la permeabilidad de la membrana lo que daría el fenotipo de resistencia en el caso de que se tratara de una cepa productora de AmpC. Igualmente pueden emplearse tiras de Etest con la combinación Cefotetán/Cloxacilina donde se podría observar la disminución de la CIM (Seral, 2010; Navarro, F., Et al, 2011; Famiglietti, Et al, 2005; Del Valle, 2009).

4) Ácido Borónico y Cloxacilina

Se encuentra documentado que el Ácido Borónico (Ácido Fenilborónico, AFB) y la Cloxacilina inhiben la actividad de las betalactamasas de clase C (AmpC), permitiendo detectar la presencia de BLEE. Para su empleo estos compuestos pueden adicionarse a los discos de antibióticos comúnmente empleados en el método del doble disco ó pueden

adicionarse al medio donde normalmente se correría la prueba (Martínez, 2011; Del Valle, 2009).

- Método de aproximación de discos

Este método es aplicable a betalactamasas AmpC inducibles. La técnica consiste en realizar un antibiograma convencional, para luego colocar un disco de Cefoxitina o cualquier otro antimicrobiano inductor a una distancia de 27 mm centro a centro de un disco de Cefamandol, Ceftazidima, Ceftriaxona ó Cefotaxima (antimicrobiano sustrato, revelador o testigo). El microorganismo que produce una betalactamasa inducible si se observa un halo de inhibición truncado del antimicrobiano sustrato, testigo o revelador. El método de aproximación de discos no es de ninguna utilidad en cepas de reprimidas, hiperproductoras o con betalactamasas AmpC plasmídicas constitutivas (Del Valle, 2009). En este caso se inocula la cepa en placas con agar Müeller-Hinton según métodos convencionales, para luego colocar un disco de Cloxacilina (500 µg) y a ambos lados, discos de Ceftazidima (30 µg) y Cefotaxima (30 µg) a una distancia de 25mm centro a centro. Un aumento del halo de inhibición de las Cefalosporinas adyacente a la Cloxacilina, se interpreta como prueba positiva para la producción de AmpC (Del Valle, 2009).

- *Método de sinergia de doble disco para la detección de AmpC*

En el método de sinergia de doble disco, donde se puede observar el efecto sinérgico entre el disco de Amoxicilina-Ácido Clavulánico y los antibióticos señalados previamente puede emplearse para detectar AmpC, si en lugar de emplear el agar Müeller-Hinton mencionado, este se sustituye por un agar Müeller-Hinton adicionado con Cloxacilina (50-350 µg/ml) o Ácido Borónico (300-400 µg/ml) con el fin de inhibir a la enzima AmpC y desenmascarar la presencia de la BLEE. También puede emplearse el método de sinergia de doble disco sustituyendo a los antibióticos usualmente usados en esta prueba por Cefoxitina, Cefotetan ó Ácido Borónico, donde se revela un efecto sinérgico entre estos antibióticos (Seral, 2010; Navarro, F., Et al, 2011; Del Valle, 2009).

El AFB, es un inhibidor competitivo reversible de las betalactamasas AmpC. La preparación de la solución de Ácido Fenilborónico requiere DMSO como solvente, no

obstante, debido a su toxicidad y poca accesibilidad en los laboratorios clínicos, se ha diseñado, recientemente, una técnica en donde se sustituye el DMSO por agua destilada, obteniendo los mismos resultados.

Otra sencilla opción para detección de AmpC usando AFB. Se basa en inocular una placa de agar Müller-Hinton con la cepa a evaluar y colocar un disco de AFB (300 µg). Seguidamente se dispone a ambos lados de este, discos de Cefotaxima (30 µg) y Ceftazidima (30 µg) a una distancia centro a centro de 18mm. Después de la incubación, el observar una distorsión (expansión) del halo de inhibición de una o ambas Cefalosporinas en las proximidades al disco de AFB, lo que es indicativo de una prueba positiva (cepa productora de AmpC) (Del Valle, 2009).

- *Método del doble disco con y sin inhibidor para la detección de AmpC*

Se puede adicionar a cada disco de Cefotaxima o Ceftazidima con/sin Ácido Clavulánico, Ácido 3-Amino-Fenil-Borónico ó puede emplearse placas con agar Müller-Hinton, suplementado con 100 µg/ml de Cloxacilina, con el objetivo de inhibir parcial o totalmente las betalactamasas tipo AmpC y evidenciar la actividad de BLEE.

Uno de los métodos con AFB, consiste en utilizar discos de Cefotetán (30 µg) solos y suplementados con 20 µl de una solución de AFB (400 µg). Tras la realización de un antibiograma convencional, con los dos discos, se considera que existe una betalactamasa de tipo AmpC, si el halo de inhibición del disco con presencia de AFB es mayor o igual a 5 mm, en comparación con el halo del disco que no contiene este inhibidor. Esta técnica es conocida como potenciación de doble disco (Del Valle, 2009).

- *Técnica de detección con discos AmpC*

Este método está basado en el uso de Tris-EDTA para permeabilizar la célula bacteriana y liberar las betalactamasas al medio externo. Los discos AmpC se preparan aplicando 20µl de una mezcla 1:1 de Tris-EDTA 100X y solución salina fisiológica estéril (SSF), a discos de papel de filtro previamente esterilizados. Una vez preparados se dejan secar y se guardan en refrigeración hasta su uso. Seguidamente, se inocula una placa con agar Müller-Hinton según el método de difusión con discos, con la cepa ATCC 25922 de *E. coli*. Los discos preparados, se rehidratan con 20 µl de SSF y se le aplican colonias de la cepa a

estudiar. Posteriormente, se coloca un disco de Cefoxitina (30 µg) y, los discos AmpC ya inoculados, se ubican muy cercanos pero sin tocar el borde del disco de Cefoxitina. La aparición de una distorsión de la zona de inhibición, indica inactivación de la cefoxitina por parte de la AmpC (AmpC positiva), y la ausencia de distorsión representa un resultado negativo (AmpC negativa). Esta técnica mostró un 100% de sensibilidad y 98% de especificidad (Del Valle, 2009).

ii. *Informe de de los resultados y recomendaciones terapéuticas*

En todos los métodos, el hecho de que aumente la susceptibilidad a Aztreonam, Cefepima y Cefalosporinas de tercera generación en presencia de inhibidores indica que el complejo enzimático hidroliza estos antimicrobianos, lo que es indicativo de que se inhibió la betalactamasa de tipo AmpC, por lo que en el caso de usar la Cloxacilina esta favorece el aumento del halo de inhibición y permite evidenciar la presencia de BLEE (Pino, Et al, 2007; Del Valle, 2009).

En los aislados en los que se ha detectado la producción de una AmpC plasmídica, tanto si éstos no tienen una AmpC cromosómica, como *Klebsiella spp.*, *S. enterica* y *P. mirabilis*, como si la tienen, pero ésta no es inducible, como ocurre por ejemplo con *E. coli*. Los valores de sensibilidad obtenidos *in vitro* deben informarse sin que sea necesaria la realización de una lectura interpretada de los mismos. En estos casos es aconsejable recomendar el uso de antimicrobianos alternativos a las Cefalosporinas de tercera generación, aunque no existen criterios unificados ni consensuados sobre esta recomendación.

Cuando las pruebas de sensibilidad antimicrobiana indican que el aislado presenta sensibilidad disminuida o resistencia a algunas de las Cefalosporinas de tercera generación se recomienda que se informe todas ellas como resistentes (si presentan sensibilidad intermedia) o con sensibilidad intermedia (si son sensibles), independientemente de que el microorganismo produzca una AmpC cromosómica o una AmpC plasmídica. En el caso que sean sensibles a todas las Cefalosporinas, se aconseja informar, particularmente con *Enterobacter spp.* y *C. freundii*, la posibilidad de que se produzca un fracaso terapéutico si el tratamiento se realiza con Cefalosporinas de tercera generación, por la selección de mutantes AmpC establemente des reprimidos. Si después

de 3 a 4 días de tratamiento antimicrobiano continúa aislándose la misma especie bacteriana se recomienda repetir las pruebas de sensibilidad para determinar si se ha producido un incremento en la resistencia a betalactámicos (Navarro, Et al, 2011; Del Valle, 2009).

Anexo VII

Complemento de las técnicas para la detección de BLEE en el laboratorio de microbiología: *Consideraciones generales en la interpretación de resultados de producción de BLEE*

Puede producirse confusión en la detección de BLEE en diferentes situaciones.

- La hiperproducción de SHV-1 en *K. pneumoniae*, causada por la presencia de múltiples copias del plásmido que la codifica, que puede dar un fenotipo compatible con una BLEE. En estos casos se incrementan las CMI de la Ceftazidima (4-8 µg/ml) y Aztreonam (1-2 µg/ml), mientras que se ven afectadas escasamente las CIM de Cefotaxima, Cefepima y Cefpiroma. Además, hay una disminución de la sensibilidad a la Amoxicilina-Ácido Clavulánico.
- La hiperproducción por parte de *Klebsiella* de betalactamasas cromosómicas K1 sensibles a los inhibidores (grupo 2be). Estas cepas producen ampliación del halo con Cefuroxima, Ceftriaxona, Aztreonam, Cefotaxima y Cefepima, pero no con Ceftazidima. Por lo tanto, para diferenciar una cepa de *Klebsiella* híper productora de K1 se debe observar la CMI de la Ceftazidima, y si disminuye en presencia de Ácido Clavulánico. De forma prácticamente constante, estas cepas son resistentes a las combinaciones con inhibidores de betalactamasas.
- La hiperproducción de betalactamasas cromosómicas inducibles de *Proteus vulgaris*, *P. penneri* o *C. koseri*, que son cefuroximasas inhibidas por el Ácido Clavulánico (grupo 2e), que pueden dar una ampliación del halo de Cefuroxima, Ceftriaxona y Cefotaxima, en presencia del inhibidor. En cambio permanecen sensibles la Ceftazidima y el Aztreonam.
- Algunas betalactamasas de tipo OXA (grupo 2d) pueden afectar también a las Cefalosporinas de tercera generación especialmente a la Cefotaxima y el Aztreonam, como son: OXA-10, OXA-11, OXA-18 y OXA-28. La acción inhibidora del Ácido Clavulánico sobre estas enzimas suele ser moderada, menor que la ejercida sobre las BLEE propiamente dichas.

- La hiperproducción de OXA-1, especialmente descrita en *E. coli* y más recientemente, en *Salmonella*, que puede originar una disminución de la sensibilidad a la Cefepima o a la Cefpiroma, sin afectar a las Cefalosporinas de tercera generación.
- Las BLEE resistentes a los inhibidores, CMT son enzimas derivadas de TEM que combinan mutaciones propias de las BLEE y las IRT (por ejemplo TEM-125), y muestran resistencia a la Amoxicilina-Ácido Clavulánico, sensibilidad disminuida a la Ceftazidima (16 mg/ml) y la sensibilidad a la Cefotaxima y la Cefepima. La DDST será positiva con Ceftazidima con una distancia de 20 mm.
- Los aislamientos sensibles a Ampicilina/Sulbactam pueden considerarse sensibles a Amoxicilina/Ácido Clavulánico y a Amoxicilina/Sulbactam, mientras que la sensibilidad *in vitro* a AMC no puede extrapolarse a AMS. En el caso que se desee conocer la sensibilidad a AMS, se debe realizar la prueba de sensibilidad. Las cepas resistentes a AMC pueden considerarse resistentes a AMS. La sensibilidad a Cefalotina se puede extrapolar a otras Cefalosporinas de primera generación (Cefazolina, Cefalexina), a Cefuroxima y a las Cefalosporinas de tercera generación parenteral y oral (Cefixima).
- Para evitar confusiones con respecto a la interpretación de la presencia de BLEE en *P. aeruginosa*, se puede emplear la prueba de difusión en agar *Isosensitest*, donde se colocan sensidiscos de Ceftazidima (30 µg) Ceftazidima/Clavulanato (30/10 µg) y Aztreonam (30 µg). Los puntos de corte para este ensayo de sensibilidad de acuerdo a lo sugerido en la literatura son para Ceftazidima, Cefepima y Aztreonam igual a 8 µg/ml. Igualmente la disminución de la CIM de Ceftazidima cuando se asocia a Clavulanato sugiere la presencia de BLEE en *P. aeruginosa*. (Seral, 2010; Famiglietti, Et al, 2005; Martínez, 2007).

Bibliografía

1. Abarca, G. y M. L. Herrera. Betalactamasas: su importancia clínica y su detección en el laboratorio. *Revista médica del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera*. 2001. 36 (1): 25 págs.
2. Aceves, C. A. E. Frecuencia de aislamientos de bacilos Gram negativos productores de β -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de patología clínica de la fundación clínica medica sur. Tesis especialidad en patología clínica. UNAM. 2009. 49 págs.
3. Alpuche, a. C. M. y C. A. Daza. T. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a Cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. *Enf Infecc Y Micro*. 2002. 22(4): 192-199 págs.
4. Álvarez, A. D. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en Enterobacterias. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2010. 9(4): pp. 516-524.
5. Álvarez, C. R. (2007). Estadística aplicada a las ciencias de salud. España. Díaz de Santos: 996 págs.
6. Amábile, C. C. F., Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries*. 2010. 4(3): 126-131 págs.
7. Baudry, P., P. Lagace-Wiens, G. Zhanel y D. Hoban. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) from patients in Canadian hospitals: preliminary results from CANWARD 2008. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009. 34(2): S45 pág.
8. Bertona, E., M. Radice, C. H. Rodríguez, C. Barberis, C. Vay, [et al]. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las Cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacter* spp. *Revista Argentina de Microbiología*. 2005. 37(1): 203-208 págs.
9. Camacho, M. L., A. Perozo, M., M. Castellano, G., E. Bermúdez, N., [et al]. Métodos fenotípicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 2004. 24 (1-2): 1-8 págs.

10. Carrër, A. y P. Nordmann. Klebsiella pneumoniae CTX-M-15: vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. *Pathologie Biologie*. 2011. 59: 133-135 págs.
11. Castro, A. N., E. D. Carreón, v. M. E. Moreno, G. L. del C. Alarcón, R. Caracterización molecular de betalactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol*. 2008. 28(3): 114-120 págs.
12. Casellas, J. M., E. Nannini, M. Radice, E. Cocconi, S. Lejona, [et al]. Estudio de un brote debido a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido de un centro asistencial de Rosario Argentina. *Rev Panam Infectol*. 2005. 7(4): 21-27 págs.
13. Celis, B. Y. A., I. Y. Pulido, M., E. M. Valenzuela de S., M. T. Reguero R. y J. R. Mantilla, A. Antibióticos: ¿Balas mágicas que ya no dan en el blanco? *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2009. 11(1): 4-6 págs.
14. Cercenado, E. Editorial. Impacto pronóstico de las betalactamasas de espectro extendido. *Rev Clin Esp*. 2011. 211(3): 139-141 págs.
15. Chora, H. L. D. Estudio de casos y controles de pacientes con aislamiento de enterobacterias con producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) del Hospital general "Dr. Manuel Silva" de Morelia. Tesis especialidad en Medicina Interna. UNAM. 2010. 35 págs.
16. 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.
17. Cremet, L. N., N. Caroff, S. Dauvergne, A. Reynaud, D. Lepelletier, S. Corvec. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathologie Biologie*. 2011. 59: 151-156 págs.
18. Del Castillo M. C., L. López, C. y M. C. y A. Pascual. Evaluación del medio chromID para la detección de Enterobacterias productoras de de betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011. 29(6): 470-476 págs.
19. De Cueto, M., J. R. Hernández, L. López, C, Concepción, M. y Á. Pascuala. Actividad de de fosfomicina sobre cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

- productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006. 24(10): 613-616 págs.
20. Del Valle, Martínez R. D. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2009. 29: 78-83 págs.
21. Díaz, M. A., J. R. Hernández, L. M. Martínez, J, Rodríguez, B., [et al]. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009. 27(9): 503-510 págs.
22. Diederer, B., M. van der Aar y J. Cohen S. Prevalence of ESBL production in *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* and *Morganella* clinical isolates in 3 teaching hospitals in The Netherlands. , 7th International Conference of the Hospital Infection Society, 10–13 October 2010, Liverpool, UK/*Journal of Hospital Infection*. 2010. 76(1): S72 pág.
23. Desimoni, M. C., G. P. Esquivel, y L. A. Merino. Colonización fecal por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en una Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004. 22(9): 507-511 págs.
24. Espinal, P. A., J. R. Mantilla, C. H. Saavedra, A. L. Leal, [et al]. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido. *Biomédica*. 2004. 24: 252-61 págs.
25. Fagundo, S. R., M. A. Cerros, s., J. Pérez, J. [et al]. Evaluación del equipo automatizado Phoenix para la detección de Betalactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella penumoniae*. *Mediagraphic Artemisa en línea*. 2008. 33(3): 94-102 págs.
26. Famiglietti, A., M. Quinteros, M. Vázquez, M. Marín, F. Nicola, [et al]. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2005. 37(1): 57-66 págs.
27. Fang, H. H Huang, Y. Shi, G. Hedin, C. Erik Nord y M. Ullberg. Prevalence of qnr determinants among extended-spectrum β -lactamase-positive *Enterobacteriaceae* clinical isolates in southern Stockholm, Sweden. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009. (34): 268–270 págs.

28. Flórez, J. (2008). *Farmacología humana*. Barcelona. Masson: pp. 1479.
29. Forbes, B. y D. Sahn. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos aires. Médica panamericana: 1134 págs.
30. Gaitan, S. L., P. A. Espinal M., y col. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infect*. 2009. 26 (3): 239-246 págs.
31. García, H. A, E. García, V., J. Gómez, G., M. Canteras, A. Hernández, T. y J. Ruiz, G. Bacteriemia por *Escherichia coli*: factores predictivos de presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido e influencia de la resistencia en la mortalidad de los pacientes. *Med Clin (Barc)*. 2011. 136(2): 56-60 págs.
32. García, R. I. A., E. M. Valenzuela de S., C. H. Saavedra, A. L. Leal C., J. E. Schmalbac. [et al]. Caracterización molecular de aislamientos de *Enterobacter cloacae* multirresistentes, productores β -lactamasas provenientes de pacientes de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*. 2005. 53(3): 148-159 págs.
33. Garciadiego, Fossas, P. Prevalencia, factores de riesgo y morbi-mortalidad asociada a infección por *E. coli* BLEE en el Centro Médico ABC. Tesis de Posgrado. UNAM. 2011. 40 págs.
34. Garza, R. M. J. U. Análisis molecular de un fragmento conservado que codifica BLEE tipo SHV en plásmidos multirresistentes. Tesis de Doctorado. UNAM. 2010. 93 págs.
35. Chora, H. L. D. Estudio de casos y controles de pacientes con aislamiento de enterobacterias con producción de Betalactamasas De Espectro Extendido (BLEE) del Hospital General "Dr. Miguel Silva" de Morelia. Tesis para diploma en la especialidad de Medicina Interna. UNAM. 2010. 35 págs.
36. Garzón, B. J., E. Lemos, R. Rivas. Prevalencia de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* del Hospital Occidente de Kennedy. Nivel III, Bogotá. *Rev. Cienc. Salud*. 2004. 2(2): 124-138 págs.

37. Gobernado, M. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev Esp Quimioterp.* 2005. 18(2): 115-117 págs.
38. González, M. L., A. Ramos M., L. Nadal B., J. Morffi F., E. Hernández R., [et al]. Identificación fenotípica y molecular de β -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos en hospitales. *Rev Cubana Med Trop.* 2007. 59(1): 52-58 págs.
39. Gordis, L. (2005). *Epidemiología.* Madrid, España. Elsevier: pp. 336.
40. Granados, Pérez, R. y M. C. Villaverde P. (1997). *Microbiología.* México, D. F. Paraninfo: 315 págs.
41. Gutiérrez, U. O., M. J. Raquena, R., P. Días, A. y A. Oliver, Palomo. Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes productoras de carbapenemasa (VIM-2) y de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro extendido (SHV-2) en una úlcera perianal de un paciente hematológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005. 23(9): 573-577 págs.
42. Guzmán, M. y G. Alonso. Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*, Sucre-Venezuela. *Invest Clin.* 2009. 50(4): 419-431 págs.
43. Hernández, J. R., A. Pascuala, R. Cantón, L. Martínez, M. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002. 21(2): 77-82 págs.
44. Hernández, M. S., J. Á. García, J. L. Muñoz. Actividad *in vitro* de fosfomicina frente a enterobacterias de origen urinario productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Esp Quimioter.* 2009. 22(1): 25-29 págs.
45. Ho, J. P. A. Tambyah y D. L. Paterson. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Current Opinion In Infectious Diseases.* 2010. 23. 46-563 págs.
46. Jacobsa, E., A. Dalhoff y G. Korfmann. Susceptibility patterns of bacterial isolates from hospitalised patients with respiratory tract infections (MOXIAKTIV Study). *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2009. 33: 52-57 págs.
47. Jehl, F., M. Chomar, M. Weber y A. Gérard. (2004). *Del antibiograma a la prescripción.* 2ed. Madrid. Editions bioMérieux: 135 págs.

48. Katzung, B. G. (2007). *Farmacología básica clínica*. 10 ed. México. El manual moderno: 1182 págs.
49. Koneman E. W. (2008). *Koneman Diagnóstico microbiológico*. 6 ed. Buenos aires. Médica panamericana: 1134 págs.
50. Lezameta, L. E. González, E., J. H. Tamariz. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010; 27(3): 345-51 págs.
51. Litter, M. (1975). *Compendio de Farmacología*. Buenos aires. El ateneo: pp. 734.
52. Livermore, D. M. β -Lactamasas in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995. 8(4): 557–584 págs.
53. Lorenzo, V. B. (2008). *Farmacología básica y clínica*. Madrid: Médica Panamericana: 1369 págs.
54. Londoño, F. J. L. (2004). *Metodología de la investigación epidemiología*. Bogotá. El manual moderno: 340 págs.
55. López, R. F. (2006). *Epidemiología: enfermedades transmisibles y crónico-degenerativas*. 2 ed. México. El manual moderno: 449 págs.
56. Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. (2004). *Brock, Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid. Pearson educación: 1096 págs.
57. Mantilla, A. J. R., E. B. Hernández, M. T. Reguero, R., D. A. Velandia, R. Identificación por PCR-SSCP de genes de cefotaximasas en aislamientos hospitalarios de *Enterobacteriaceae*. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2009. 9(2): pp. 57-65.
58. Mantilla, J. R., M. T. Reguero, E. B. González, I. A. García, A. L. Leal, [et al]. Caracterización molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano. *Biomédica*. 2008. 26(1): 408-414 págs.
59. Martínez, M. L. y J. Calvo. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010. 28(2): 25-31 págs.
60. Martínez P, M. Mercado, M. Salim. Determinación de β -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb Med* . 2003; 34: 196- 205 págs.

61. Martínez P., P. Espinal y S. Máttar. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Órgano oficial de la Asociación Colombiana de Infectología*, ACIN. 2007. 11(1): 6-15 págs.
62. Matagne, A., J. Lamotte-Brasseur y J.-M. Freare. Catalytic properties of class A β -lactamases : efficiency and diversity. *Biochem. J.* 1998. 330: 581-598 págs.
63. Morfín, O. R., E. Rodríguez, N. Enterobacterias con betalactamasas de espectro extendido: su importancia como patógenos nosocomiales. *Enf Infec Y Microbiol.* 1999. 19(3): 116-132 págs.
64. Murray, P. R., K. S. Rosenthal y M. A. Pfaüer. (2006). *Microbiología Médica*. Elsevier. México. 963 págs.
65. Naas, T., C. Bentchoualab, G. Cuzona, S. Yaoua, A. Lezzarb, F. Smatib y P. Nordmanna. Outbreak of Salmonella enterica serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2011. 38: 135-139 págs.
66. Navarro, F., J. Calvo, R. Cantón, F. Fernández, C. y B. Mirelis. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gram negativos. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2011. 29(7): 524-534 págs.
67. Navarro, N. M., B. O Moreno, N., B. E. López, M., M. del C. Fragoso, C. [et al]. Detección de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (β LEE) en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son.* 2005. 22(2): 64-70 págs.
68. Navarro, N. M., R. E. Robles, Z., A. Garibay, E., E. Ruiz, B. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de β -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Salud Pública Mex.* 2011. 53: 341-344 págs.
69. Nedjai, S., A. Barguigua, N. Djahmi, L. Jamali, K. Zerouali, M. Dekhil y M. Timinouni. Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in Klebsiella-Enterobacter-Serratia group bacteria, in Algeria. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 2012. 42(1): 20-29 págs.
70. Nester, W. E. [et al]. (2007). *Microbiología humana*. México. El manual moderno: 996 págs.

71. Overdevest, I. T. M. a, I. Willemsen, S. Elberts, C. Verhulst and J. A. W. Kluytmans. Laboratory Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Evaluation of Two Screening Agar Plates and Two Confirmation Techniques. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2011. 49(2): 519–522 págs.
72. Peirano, G., C. H.J. van Greuneb y J. D.D. Pitouta. Characteristics of infections caused by extended-spectrum β -lactamase–producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011. 69: 449-453 págs.
73. Petri, W. A., (2007). *Penicilinas, Cefalosporinas y otros antibióticos betalactámicos*. En. Brunton, L. L., J. S Lazo y K. L. Parker (Eds). *Goodman & Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica*. (1127-1153 págs.). México, D. F.: McGraw Hill.
74. 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 de Sonora 2009. Tesis especialidad en pediatría. UNAM. 2010. 40 págs.
75. Perozo, Mena, A. J. y M. J. Castellano G. Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Kasmera*. 2009. 37(1): 25-37 págs.
76. Piersigilli, L. A., M. C. Enrico, M. E. Bongiovanni, L. E. Bilbao, G. Martínez y E. M. Ledesma. Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de β -lactamasa de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. *Rev Chil Infect*. 2009. 26 (4): 331-335 págs.
77. Pinheiro, H.S., A.M. Mituiassu, M. Carminatti, A.M. Braga, and M.G. Bastos. Urinary Tract Infection Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase–Producing Bacteria in Kidney Transplant Patients. *Transplantation Proceedings*. 2010. 42: 486-487 págs.
78. Pino, I. C., M. Domínguez, G. González R., H. Bello, T., M. Sepúlveda A., [et al]. Producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales de la VIII Región, Chile. *Rev Chil Infect*. 2007. 24(2): 137-141 págs.

79. Prats, G. (2005). *Microbiología clínica*. Buenos aires. Médica panamericana: 400 págs.
80. Pujol, M. y C. Peña. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003. 21(2): 69-71 págs.
81. Reinthaler, F. F., G. Feierl, H. Galler, D. Haas, E. Leitner, F. Mascher, [et al]. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water research*. 2010. 44 (6): 1981-1985 págs.
82. Rivera, J. M. C. Rodríguez, U. y G. Huayán, D. *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un servicio de Neonatología. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2008. 25(2): 250-252 págs.
83. Romero, J. P. A., M. Treviño., L. Martínez, L. y C. Varón. Utilidad del medio ChromID de betalactamasas de espectro extendido para detectar resistencia a Cefalosporinas en Enterobacterias inoculadas en frascos de hemocultivo. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009. 27(9): 367-369 págs.
84. Ruíz, M. A. (2004). *Epidemiología clínica: investigación clínica aplicada*. Bogotá. Médica Panamericana: 576 págs.
85. Sánchez, A. B. (2004). Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Consultado el 14 de Julio del 2011. *Revista Electrónica de Medicina Intensiva*. 4 (6-8): <http://remi.uninet.edu/2004/08/REMIC06.htm>
86. Sánchez, L. R. Ríos, s. Máttar. Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados en una clínica de Villavicencio, Colombia. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2008. 12(3): 193-200 págs.
87. Seral, G., C., M. P. de la Gándara y F. J. Castillo, G. Betalactamasas de espectro extendido en Enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010. 28(1): 12-18 págs.
88. Shio-Shin J. y P. Ren Hsueh. High burden of antimicrobial resistance in Asia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011. 37: 291-295 págs.
89. Silva, S. J., J. U. Garza. R., F. Reyna, F., A. Sánchez, P., T. Rojas M., V. Andrade A. [Et al]. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* causing nosocomial infections in Mexico. A retrospective and multicenter study. *Arch Med Res*. 2011. 42: 156-162 págs.

90. Strenger, V., T. Gschliesser, A. Grisold, G. Zarfel, G. Feierl, L. Masoudb, Martin Hoeniglc, [et al]. Orally administered colistin leads to colistin-resistant intestinal flora and fails to prevent faecal colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteria in hospitalized newborns. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011. 37: 67-69 págs.
91. Suarez, C. y F. Gudiol. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009. 27(2): 116-129 págs.
92. Torres, L., V. Gangliotta, O. Torres, M. Benítez, M. Domínguez y R. Pedroza. β -lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2006. 26(2). 365-378 págs.
93. Turner, R. y D. Gnanarajah. Evaluation of the prevalence and Antibiotic susceptibilities of ESBL, ampC and inducible ampC's among urinary Isolates category: scientific free paper. *Journal of Infection*. 2011. 63(6): 39 págs.
94. Truppia, L. A., A. Molleracha, J. A. Di Conzab, M. Radiceb, V. Mugnaa. [et al]. Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005. 23(9): 525-528 págs.
95. Un-In, W., Y. Ching-Shiang, C. Wan-Chin, C. Yee-Chun y C. Shan-Chwen. Risk Factors for Bloodstream Infections due to Extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010. 43(4): 310-316 págs.
96. Vásquez, G. M. R., A. Ribeiro B., C. da Cruz L., J. Correa y J. A. Adler P. β -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a Cardiac Intensive Care Unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011. 15(1): 28-33 págs.
97. Velasco, A. M., R. Barrena P., A. Asenjo M., J. F. Valverde C., A. Delgado-Iribarren y J. E. Losa G. Factores predictores de infección urinaria bacteriémica por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido. *Med Clin (Barc)*. 2010. 134(9): 392-395 págs.
98. Wang, P., F. Hu, Z. Xiong, X. Ye, D. Zhu, Y. F. Wang y M. Wang. Susceptibility of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae According to the

New CLSI Breakpoints. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011. 49(9): 3127-3131 págs.

99. Wen-Chien Ko y Po-Ren Hsueh. Increasing extended-spectrum β -lactamase production and quinolone resistance among Gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections in the Asia/Pacific region: Data from the Smart Study 2002-2006. *Journal of Infection*. 2009. (59): 95-103 págs.
100. Yagüe, A., L. Cebriánb, J. C. Rodríguez, D., N. G. Jiménez. [et al]. Cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido: origen, características e incidencia en el sur de la provincia de Alicante en el período 1999-2003. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005. 23(2): 76-79 págs.
- 101.