



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

“Distribución de cepas de *Escherichia coli* uropatógenas productoras de betalactamasas de espectro extendido, aisladas de pacientes con infección crónica de vías urinarias.”

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Olalde Ramírez Guadalupe Sarahí



Ciudad de México, Abril de 2021



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.



## LUGAR DONDE SE REALIZACIÓN EL TRABAJO

Unidad Periférica de Investigación Básica Clínica en Enfermedades Infecciosas de Investigación/Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina-UNAM, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, de la Unidad de Hemato-Oncología e Investigación del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

## EL TRABAJO FORMO PARTE DE LOS PROYECTOS:

**“Estudio prospectivo de seguimiento de pacientes con Infecciones de Vías Urinarias, caracterización fenotípica, genotípica y ensayo de actividad antimicrobiana de compuestos naturales y sintéticos en las cepas de *Escherichia coli* uropatógenas aisladas”.**

(Dr. Carlos Alberto Eslava Campos)

**DGAPA IN221318**

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Raúl Garza Velasco  
**VOCAL:** Profesor: Martha Giles Gómez  
**SECRETARIO:** Profesor: Ulises Hernández Chiñas  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Beatriz Ruiz Villafán  
**2º. SUPLENTE:** Profesor: Tanya Plett Torres

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana. Unidad de Hemato-Oncología e Investigación, Hospital Infantil de México “Federico Gómez” / División de Investigación, Facultad de Medicina UNAM. Dr. Márquez 162, Col. De los Doctores, CP 06720, México, Ciudad de México. Tel: 52289917 ext. 4501/4502

**ASESOR DEL TEMA:** Dr. en C. Ulises Hernández Chiñas

**SUSTENTANTE:** Olalde Ramírez Guadalupe Sarahí

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<i>Objetivo general</i> .....	9
<i>Objetivos particulares</i> .....	9
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
1.1 <i>Infección de vías urinarias</i> .....	10
1.2 <i>Epidemiología</i> .....	11
1.3 <i>Etiología y Patogenia</i> .....	11
1.4 <i>Tratamiento</i> .....	15
1.5 <i>Multirresistencia</i> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>17</b>
2.1 <i>Familias de antibióticos y mecanismo de acción</i> .....	17
2.2 <i>Antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</i> .....	18
2.3 <i>Clasificación de los <math>\beta</math>-lactámicos</i> .....	19
2.4 <i>Farmacocinética y farmacodinamia de los <math>\beta</math>-lactámicos</i> .....	20
2.5 <i>Mecanismos de resistencia</i> .....	21
2.6 <i><math>\beta</math>-lactamasas</i> .....	22
2.7 <i><math>\beta</math>-lactamasas de espectro extendido (BLEE)</i> .....	25
2.8 <i>Carbapenemasas</i> .....	27
2.9 <i><math>\beta</math>-lactamasas tipo AmpC</i> .....	27
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>29</b>
3.1 <i>Material Biológico</i> .....	29
3.2 <i>Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana</i> .....	30
3.3 <i>Identificación fenotípica de BLEE por sinergia de doble disco</i> .....	31
3.4 <i>Identificación fenotípica de carbapenemasas por test de Hodge modificado</i> .....	32
3.5 <i>Identificación genotípica de BLEE</i> .....	33
3.6 <i>Caracterización por serología de E.coli</i> .....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>47</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>48</b>

## **Listado de abreviaturas**

**AMC:** Amoxicilina-clavulánico

**AMK:** Amikacina

**AMP:** Ampicilina

**APEC:** *E. coli* patogénico aviar

**ATM:** Aztreonam

**BLEE:**  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

**C:** Cloramfenicol

**CAR:** Carbenicilina

**CAZ:** Ceftazidime

**CFP:** Cecefoperazona

**CIP:** Ciprofloxacina

**CRO:** Ceftriaxona

**CM:** Gentamicina

**CXM:** Cefuroxime

**CEP:** Cefepima

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**CTT:** Cefotetan

**EPEC:** *E. coli* enteropatogénico

**F:** Nitrofurantoina

**FEP:** Cefepime

**FOS:** Fosfomicina

**FOT:** Fosfomicina Trometramol

**FV:** Factor de virulencia

**FOX:** Cefoxitin

**IVU:** Infección de vías urinarias

**K:** Kanamicina

**KA:** Amikacina

**KF:** Cefalotin

**KZ:** Cefozolina

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAPPA:** Manejo Antibacteriano de Procesos infecciosos en el Paciente Adulto

**MEL:** Mecilanam

**MEM:** Meropenem

**MA:** Cefamandol

**MDR:** Multidrogo resistentes

**NA:** Ácido nalidixico  
**NOR:** Norfloxacin  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PDR:** Pandrogo resistentes  
**PRL:** Piperacilina  
**S:** Estreptomicina  
**STX:** Trimetroprim-sulfametoxazol  
**S3:** Sulfonamidas  
**TE:** Tetraciclina  
**TMP/SMX:** Trimetoprim-Sulfametoxazol  
**TOB:** Trobramicina  
**TZP:** Piperacilina-tazobactam  
**UPEC:** *E. coli* uropatógeno  
**W:** Trimetroprim  
**XDR:** Extensivamente resistentes

## RESUMEN

**Introducción.** En México las IVU ocupan el tercer sitio dentro de las principales causas de morbilidad, siendo *E. coli* uropatógena (UPEC) el principal agente etiológico. La multidrogoresistencia (MDR) que presenta UPEC se considera un factor que contribuye a la cronicidad de la infección. Algunas cepas MDR son productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), situación que disminuye las opciones de tratamiento y control de la IVU.

**Material y Método.** Se evaluaron 336 cepas de *E. coli* aisladas de urocultivos de 20 pacientes con infección crónica de vías urinarias (ICVU), se serotiparon con sueros (SERUNAM) específicos y se analizó la susceptibilidad a 32 antimicrobianos por el método de Kirby-Bauer. Las cepas susceptibles a amoxicilina/ácido clavulánico y resistentes a cefotaxima, ceftazidima, cefepime y cefuroxima, se caracterizaron por técnicas fenotípica (sinergia de doble disco de acuerdo con el CLSI) y por PCR con iniciadores específicos *bla*. Las cepas con resistencia a el grupo de los carbapenémicos fueron sometidas a la prueba de Hodge y la prueba de discos combinados con inhibidores (EDTA, ácido borónico y cloxacilina).

**Resultados** El 88% (296/336) de los aislados fueron MDR, el 33% son productoras de  $\beta$ -lactamasas: 6(5%) metaloproteasas, 8 (7%) productoras de carbapenemasas tipo KPC, 24 (22%)  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC y 78 (79%) BLEE. El análisis genotípico de las cepas BLEE mostró la combinación de los genes en 30 aislados, siendo el gen *bla*<sub>CTX-M15</sub> se identificó en el 93% (72/78) de los aislados. Las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se incluyeron en 19 serotipos diferentes, 27% de esto pertenecen a serogrupos clásicos UPEC.

**Conclusiones** Ante estos resultados es importante evaluar la necesidad de modificar los esquemas de tratamiento y buscar alternativas para el control de las IVU.



## ABSTRACT

**Introduction.** In Mexico, UTIs occupy the third place among the main causes of morbidity, with uropathogenic *E. coli* (UPEC) being the main etiological agent. The multidrug resistance (MDR) presented by UPEC is considered a factor that contributes to the chronicity of the infection. Some MDR strains are producers of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), a situation that reduces the options for treatment and control of UTI.

**Material and method.** 336 strains of *E. coli* isolated from urine cultures of 20 patients with chronic urinary tract infection (ICVU) were evaluated, serotyped with specific serum (SERUNAM) and susceptibilities to 32 antimicrobials were analyzed by the Kirby-Bauer method. Strains susceptible to amoxicillin / clavulanic acid and resistant to cefotaxime, ceftazidime, cefepime and cefuroxime, were characterized by phenotypic techniques (double disk synergy according to CLSI) and by PCR with specific primers *bla*. Strains with resistance to the group of carbapenems were subjected to the Hodge test and the disc test combined with inhibitors (EDTA, boronic acid and cloxacillin).

**Results.** 88% (296/336) of the isolates were MDR, 33% are producers of  $\beta$ -lactamases: 6 (5%) metalloproteases, 8 (7%) producers of KPC-type carbapenemases, 24 (22%)  $\beta$ - AmpC type lactamases and 78 (79%) ESBL. Genotypic analysis of ESBL strains showed the combination of genes in 30 isolates, has the *bla*<sub>CTX-M15</sub> gene identified in 93% (72/78) of the isolates. The  $\beta$ -lactamase producing strains were included in 19 different serotypes, 27% of which belong to classical UPEC serogroups.

**Conclusions.** Given these results, it is important to assess the necessity to modify treatment schemes and look for alternatives for the control of UTIs.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Conocer la frecuencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislados obtenidos de pacientes con infecciones crónicas de vías urinarias.

### Objetivos particulares

- Recuperar del cepario los aislamientos identificados como *Escherichia coli* obtenidas de muestras de orina de pacientes con ICVU.
- Serotipificar las cepas de *Escherichia coli* recuperadas.
- Identificar los perfiles de resistencia a diferentes antimicrobianos en las cepas de *Escherichia coli* en estudio.
- Identificar las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas.
- Verificar la presencia de genes *bla*.

## HIPÓTESIS

- La cronicidad y falla en el tratamiento de las ICVU, se debe a la MDR y a la producción de  $\beta$ -lactamasas de las cepas de *Escherichia coli* asociadas al cuadro clínico.

# 1. INTRODUCCIÓN

## *1.1 Infección de vías urinarias*

La Infección de Vías Urinarias (IVU) es una entidad clínica inducida por la invasión, colonización y multiplicación microbiana en las vías urinarias, que sobrepasa la capacidad de los mecanismos de defensa del hospedero, cuya expresión se asocia a alteraciones morfológicas o funcionales.<sup>1</sup>

De acuerdo con las guías de Manejo Antibacteriano de Procesos infecciosos en el Paciente Adulto (MAPP) las IVU se dividen en infecciones de vías altas y bajas, describiéndose cuatro síndromes principales: uretritis, cistitis, prostatitis y pielonefritis.

En las infecciones urinarias de vías bajas, se incluyen:

- La cistitis, infección superficial de la mucosa vesical, caracterizada por la presencia del síndrome miccional: disuria (escozor), polaquiuria (aumento de la frecuencia, aunque no del volumen total) y tenesmo (micción urgente), a menudo acompañados de dolor suprapúbico, orina maloliente y en ocasiones puede aparecer hematuria (presencia de sangre en la orina).
- La uretritis (inflamación de la uretra) es generalmente causada por infecciones de transmisión sexual.

En las infecciones urinarias de vías altas, se incluyen:

- La pielonefritis (infección en el riñón y la pelvis renal) aguda o crónica.

Según la evolución de la infección, ésta puede clasificarse como:

- Aguda, aquella que solamente se presenta en una única ocasión y el asentamiento de la infección es rápido. La más común es la cistitis aguda, en segundo lugar, se encuentra la pielonefritis aguda.
- **Crónica**, aquella infección que se repite ( $\geq 3$  infecciones al año) debido a múltiples factores.

- Persistente, infección producida por el mismo microorganismo que provocó la primera infección, dos semanas después del fin del tratamiento antimicrobiano.
- Recurrente, producida por especies diferentes de cepas microbianas, ocurre más allá de dos semanas de la finalización del tratamiento antimicrobiano.

## 1.2 Epidemiología

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó que en 2020 las IVU ocuparon el tercer sitio dentro de las principales causas de morbilidad. Durante el mismo año, se reportaron 4 348 079 casos y se calculó una tasa de incidencia de 3 623 por 100 000 habitantes. Los grupos de edad con mayor riesgo a presentar una infección en vías urinarias fueron aquellos que comprendían de 25-44 años. Las IVU son de las infecciones bacterianas más frecuentes en mujeres; se considera que 40 a 60% tendrán por lo menos un episodio de IVU en su vida, de las cuales 3 a 5% presentarán múltiples recurrencias. Esto se relaciona con la actividad sexual, los embarazos y la edad.<sup>67</sup> En el caso de los varones, se presentan con mayor incidencia durante el primer año de vida y en adultos mayores de 50 años, en relación con la presencia de patología prostática o manipulaciones urológicas. En los infantes, la IVU es una causa común de consulta y hospitalización, la frecuencia varía dependiendo de la edad y sexo. La infección sintomática ocurre en uno de cada 1,000 recién nacidos y menores de un mes de edad.<sup>69</sup>

## 1.3 Etiología y Patogenia

Las IVU son causadas por una única especie bacteriana en el 95% de los casos. Los principales agentes etiológicos son bacterias Gram negativas de origen intestinal, siendo *E. coli* el responsable del 90% de las infecciones agudas y las producidas en pacientes ambulatorios.<sup>1</sup>

*E. coli* es una bacteria con la capacidad de colonizar y persistir en el tracto gastrointestinal del humano, a partir de las primeras horas posteriores al nacimiento; subsiguientemente se puede adquirir por agua, alimentos o por otros vehículos transmisores, como fómites o

animales incluido el humano. Esta bacteria forma parte importante de la microbiota del intestino ya que establece una relación de mutuo beneficio con su hospedero, proporcionando sustancias nutritivas y protección contra patógenos.<sup>71</sup>

*E. coli* se adhiere al moco que recubre el intestino grueso y una vez establecida puede persistir indefinidamente; no obstante ser una bacteria importante en la microbiota, sólo constituye aproximadamente el 0.1% de la población total. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, es un bacilo Gram negativo, móvil (debido a la presencia de flagelos peritricos), de 1-3 µm de largo por 1-1.5 µm de ancho. Es una bacteria anaerobia facultativa, que fermenta diferentes carbohidratos, frecuentemente presenta una cápsula, por lo que algunas cepas presentan colonias mucoides; no forma esporas.<sup>63</sup>

*E. coli* es un microorganismo que, en su proceso evolutivo, ha dado lugar a la emergencia de diferentes grupos clonales que en la actualidad se clasifican en comensales (aquellos que forman parte de la biota intestinal) y los que causan enfermedad. Con el propósito de ubicar a las variedades patógenas, éstas se han incluido en ocho grupos patógenos o patotipos, seis variedades que se conocen como *E. coli* productoras de diarrea (DEC por sus siglas en inglés) y dos que pueden colonizar estructuras fuera del intestino por lo que se han denominado *E. coli* extraintestinales (ExPEC). Las cepas DEC se clasifican de acuerdo con su mecanismo de patogenicidad y el cuadro clínico que producen, integrando los siguientes patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Las cepas ExPEC incluyen a *E. coli* uropatógena (UPEC) y a las cepas que producen meningitis neonatal (NMEC).<sup>32</sup>

### **Serotipificación de *E. coli***

Un procedimiento que permite identificar a los grupos patógenos de *E. coli* es el empleo de la tipificación por sueros. Para dicho propósito se puede analizar la presencia de los antígenos de superficie, somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). En 1940, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación en el que inicialmente analizaba el antígeno somático; de éste, en la actualidad se han reportado 186 variedades. Además del antígeno O, se puede analizar

el antígeno K, del cual se han descrito 60 diferentes y, el flagelar, con 75. El antígeno O se caracteriza por ser termoestable, además de que es con éste que se define el serogrupo de la bacteria; el antígeno flagelar, constituido por flagelina, es de composición proteica y por ende es termolábil. La identificación de los antígenos somático y flagelar permite definir el serotipo (fórmula O:H) de una cepa, el cual en ocasiones se asocia a un cuadro clínico en particular. Se ha reportado la existencia de variantes del antígeno O (1,2,4,6,7,8,16,18,25 y 75) que se asocian con mayor frecuencia a las IVU producidas por cepas UPEC.<sup>55</sup>

### **Patogénesis de las cepas UPEC**

La infección comienza vía la contaminación de la uretra con bacterias provenientes del recto; las UPEC, una vez en el interior del tracto urinario, coloniza la vejiga causando cistitis, con posibilidades de ascender a través de los uréteres hasta los riñones y ocasionar pielonefritis. Al transcurrir entre 4 y 24 horas después de iniciada la infección en la vejiga se induce la expresión de fimbrias tipo 1 (FimH) que reconocen a la D-manosa de los receptores de la uroplaquina que cubren el uroepitelio de transición, uniéndose a las integrinas  $\alpha 3$  y  $\beta 1$ , que se agrupan con la actina en los sitios de invasión; desestabilizando los microtúbulos, lo que da como resultado la internalización de la bacteria. Se conoce que en las cepas UPEC la adherencia a células uroepiteliales es un paso fundamental para el progreso de las IVU.<sup>15,17</sup>

Una vez internalizada, UPEC se replica rápidamente y forma comunidades microbianas similares a biopelículas, denominadas comunidades bacterianas intracelulares (CBIs), que fungen como entorno protector. UPEC puede dejar las CBIs y salir al lumen de la vejiga, en donde la infección promueve la afluencia de polimorfonucleares, así como la liberación de especies reactivas del oxígeno y péptidos antimicrobianos que causan daño a los tejidos, apoptosis y exfoliación de las células de la vejiga (Figura 1). La exfoliación facilita la eliminación de bacterias del hospedero, pero deja a las células inmaduras subyacentes más susceptibles a la infección. Durante la liberación, UPEC se torna filamentosa debido al estrés que promueve el aumento de la activación del sistema inmune. En este punto de la infección, si ésta no es tratada adecuadamente, puede ascender a los riñones causando pielonefritis.<sup>19</sup>

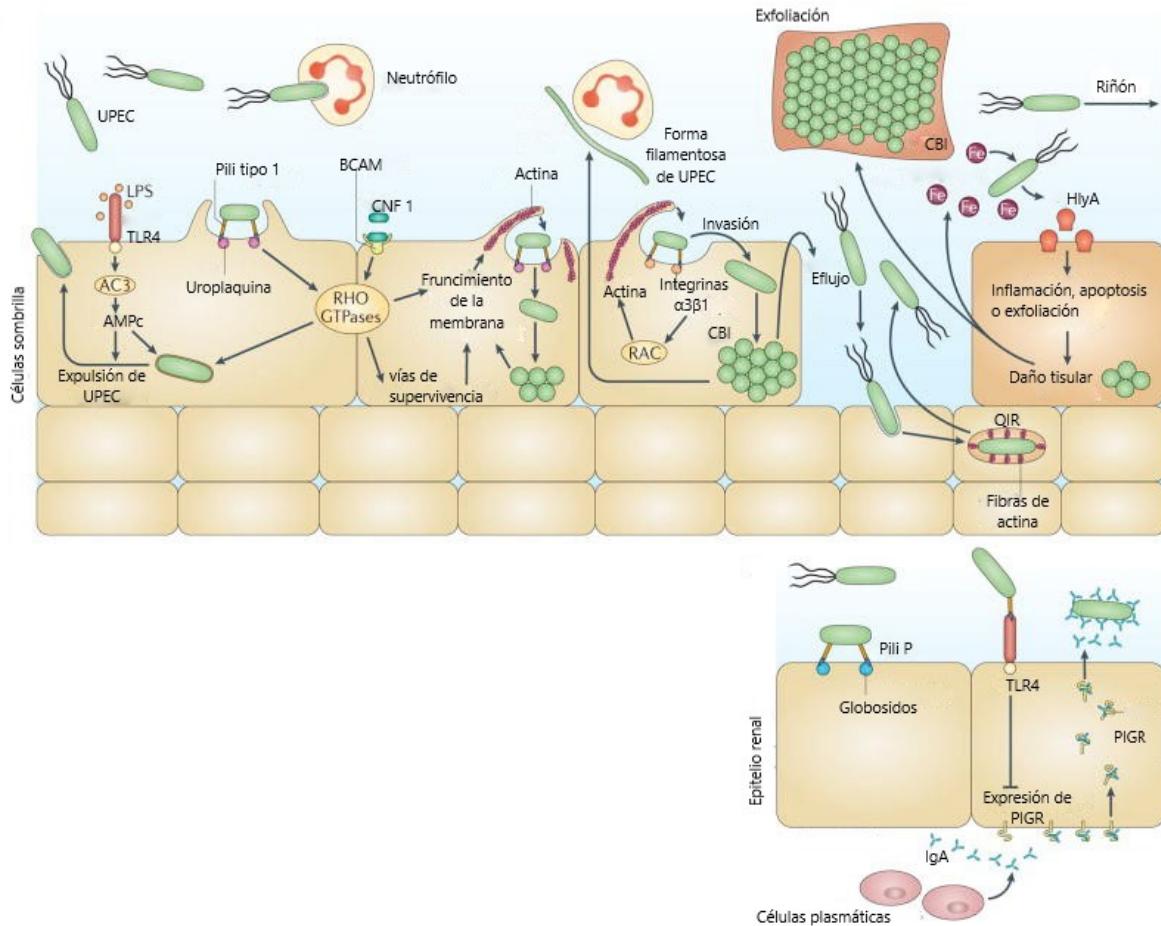


Figura 1. Características de la colonización de UPEC y la respuesta del hospedero en IVU.

La expresión de las fimbrias (*pili*) de tipo 1 son esenciales para la colonización, invasión y persistencia. Las adhesinas de las fimbrias tipo 1, FimH, se unen a las uroplaquinas e integrinas manosiladas que protegen la superficie de las células superficiales del epitelio (células sombrilla). Estas uniones se producen por especificidad estereoquímica e inducen un mecanismo de internalización e invasión celular por parte del patógeno. Los lipopolisacáridos excretados por la *E. coli* son detectados por el receptor TLR 4 que induce la formación de AMPc el cual induce la exocitosis de *E. coli* en vesículas a través de la membrana apical. Cuando *E. coli* consigue permanecer en el interior de la célula puede escapar de los mecanismos de defensa del organismo y forma comunidades bacterianas intracelulares (CBIs). La maduración de estas comunidades permite la invasión de otras células del hospedero. Además, *E. coli* puede generar reservorios intracelulares a modo de “semillas”. Una vez en el interior de las células la bacteria genera una toxina (HlyA) que provoca lisis celular de manera que se liberan nutrientes como el hierro para la nutrición de otras bacterias en el exterior y también provoca exfoliación epitelial para favorecer la dispersión de bacterias en el medio y propiciar la llegada de éstas a los riñones. Para la supervivencia extracelular, las bacterias cambian su forma a una morfología de filamento que evade la acción del sistema inmunitario (el neutrófilo no puede bloquear a la bacteria).<sup>19</sup>

#### *1.4 Tratamiento*

Una vez realizado el diagnóstico clínico y que el mismo ha sido comprobado con el examen general de orina, se comienza con la antibioticoterapia en forma empírica; ésta dependerá de varios factores: antecedentes personales, incluyendo la historia de alergias u otras reacciones adversas a los antimicrobianos, la tendencia del antibiótico a producir efectos colaterales en la ecología de la microbiota residente, la disponibilidad del fármaco, el costo del tratamiento y, sobre todo, el patrón local o regional de resistencia de los uropatógenos.<sup>1</sup>

Las guías MAPPa proponen como tratamiento de primera línea, en caso de resistencias locales menores al 20%, a las aminopenicilinas solas y en combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Como alternativa, sugieren el uso de monohidratos o macrocristales de nitrofurantoína y TMP/SMX (160/800 mg por 3 días). El tratamiento de las IVU complicadas depende en gran medida de la severidad del padecimiento. Los antibióticos recomendados para el tratamiento empírico inicial son las fluoroquinolonas con excreción renal, cefalosporinas de tercera generación o un aminoglucósido.

En niños con IVU afebril o cistitis, el tratamiento de elección es la nitrofurantoína 5-7 mg/Kg cada 6 horas o TMP/SMZ (basado en TMP) 6-12 mg/Kg cada 12 horas o cefalosporina de 1<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup> generación de 7 a 10 días, vía oral. En niños con IVU febril o pielonefritis el tratamiento de elección es ampicilina más aminoglucósido o cefalosporina de 3<sup>a</sup> generación durante 14 días. El tratamiento debe iniciarse por vía parenteral por tres a cinco días; debe continuar por vía oral, hasta completar 10 a 14 días.<sup>40</sup>

#### *1.5 Multirresistencia*

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno que se incrementa en forma natural, generalmente por modificaciones relacionadas con la transferencia horizontal de genes y por la selección de mutantes resistentes. Este proceso se ha acelerado por el mal uso y abuso de los antimicrobianos.<sup>52</sup>



En la literatura médica se utilizan diferentes definiciones para referirse a las bacterias resistentes a múltiples fármacos, lo que dificulta el entendimiento y análisis de este tipo de microorganismos. Con el propósito de crear una terminología internacional estandarizada con la cual describir los perfiles de resistencia de las bacterias responsables de infecciones asociadas a la atención médica y propensas al aumento de la resistencia a múltiples fármacos, un grupo de expertos internacionales se unieron a través de una iniciativa conjunta del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), tomando en cuenta las listas de categorías de antimicrobianos sugeridas para las pruebas de susceptibilidad del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA).

Dando lugar a las siguientes definiciones:

- Multidrogo-resistente (**MDR**), se define como el microorganismo que presenta resistencia a al menos un agente antimicrobiano en tres o más categorías de antibióticos diferentes. Las infecciones por microorganismos multidrogo-resistentes pueden, llevar a terapias antimicrobianas inadecuadas o tardías.
- Extensivamente resistentes (**XDR**), son aquellos microorganismos que presentan resistencia a al menos un agente en casi todas las categorías de antibióticos, con excepción a una o dos de ellas (es decir, los aislamientos bacterianos siguen siendo sensibles sólo a una o dos categorías).
- Pandrogo-resistente (**PDR**), aplica para aquellos microorganismos resistentes a todos los agentes en todas las categorías antimicrobianas (es decir, el aislado presenta resistencia a todos los antimicrobianos disponibles comercialmente).<sup>41</sup>

## 2. ANTECEDENTES

### *2.1 Familias de antibióticos y mecanismo de acción*

Los antimicrobianos son sustancias químicas que matan o impiden el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles y que, por tanto, permiten un tratamiento etiológico por excelencia en aquellos pacientes que sufren procesos infecciosos. Sin embargo, para conseguir esta eficacia se requiere que su utilización venga amparada por una concatenación de criterios clínico-epidemiológicos, microbiológicos (sensibilidad *in vitro*), farmacocinéticos y farmacodinámicos, y por una duración apropiada según el tipo de infección, gravedad y enfermedad de base del paciente.<sup>23</sup>

Existen distintos tipos de clasificaciones para agrupar a estas moléculas:

- De acuerdo con la interacción microorganismo-antibiótico

Bactericidas: su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana.

Bacteriostáticos: concentraciones que se alcanzan en el suero o tejidos los cuales impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruirlas.

- Espectro de acción

Amplio espectro, como aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes (aminoglucósidos y carbapenemes).

Espectro reducido, antibióticos activos sobre un grupo reducido de especies (penicilinas).

- Mecanismo de acción

Esta clasificación considera el mecanismo de acción por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir a una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la replicación del DNA, lisadores de la membrana citoplasmática e inhibidores de vías metabólicas.<sup>30</sup>

## 2.2 Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Los  $\beta$ -lactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 2), que forma parte de la estructura de varias familias de antibióticos y según la naturaleza de los radicales, se diferencian las distintas moléculas.<sup>24</sup>

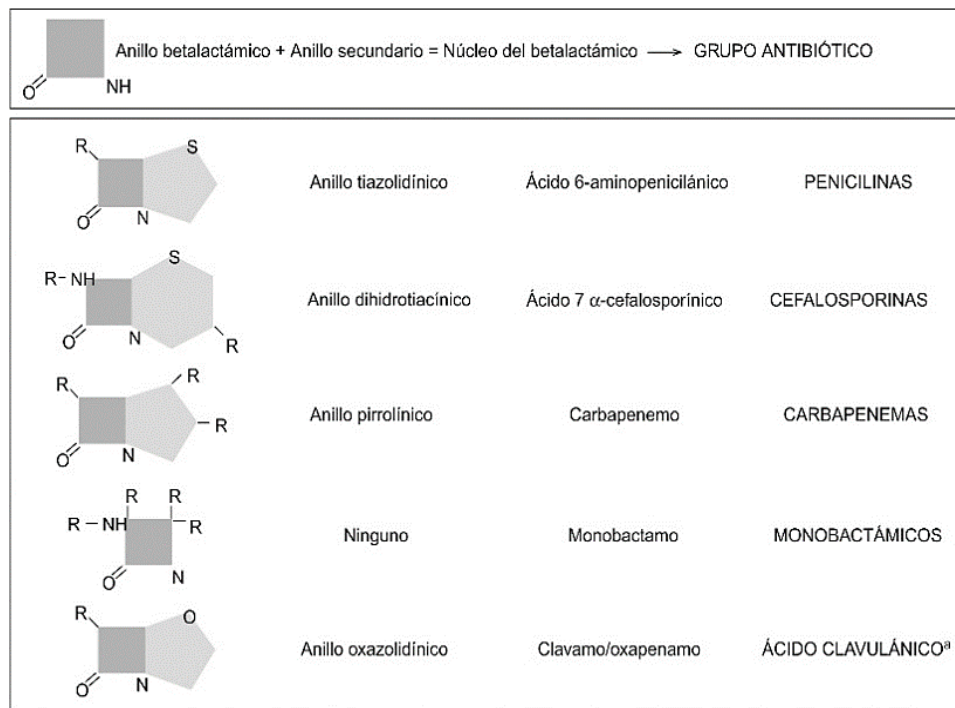
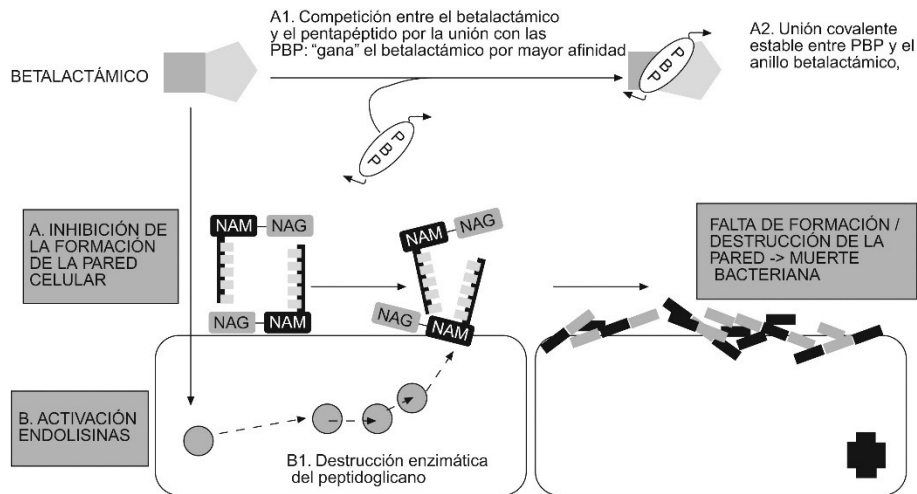


Figura 2. Estructura química de los  $\beta$ -lactámicos. Tomado de Suárez C (2009), Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Vol. 27. Núm. 2:2009 responsable del copyright.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Algunas modificaciones de la molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano, pero la progresiva aparición de resistencia limita su uso empírico y su eficacia en situaciones determinadas. Aun así, continúa siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones. El mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana (Figura 3), interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano, mediante un bloqueo en la última etapa de su producción.<sup>28</sup>

El anillo  $\beta$ -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. La unión del antibiótico a la PBP determina la inactivación de la enzima, aunque también ocurre la activación de las autolisinas bacterianas endógenas que destruyen el peptidoglicano.<sup>28</sup>



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Figura 3. Mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Tomado de Suárez, C (2009), Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Vol. 27. Núm. 2, página 6 2009 responsable del copyright.

### 2.3 Clasificación de los $\beta$ -lactámicos

La familia de los  $\beta$ -lactámicos se puede dividir en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (Cuadro 1). El espectro de los  $\beta$ -lactámicos incluye a bacterias Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmas, porque estos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de  $\beta$ -lactamasas y probablemente a una lenta penetración por las características de la pared.<sup>44</sup>

Cuadro 1. Clasificación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos

Grupo	Parenteral	Oral
<b>Penicilinas</b>		
	Sensibles a las betalactamasas	
Espectro reducido	bencilpenicilina (penicilina G)	fenoxibencilpenicilina (penicilina V)
Activas frente a enterobacterias (aminopenicilinas)	ampicilina	amoxicilina, ampicilina
Activas frente a enterobacterias y Pseudomonas	ureidopenicilinas: piperacilina, azlocilina, mezlocilina; carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina	indanil carbenicilina
Antiatafilocócicas	Resistentes a las betalactamasas cloxacilina, meticilina, nafcilina	Cloxacilina, dicloxacilina
Combinadas con inhibidores de las betalactamasas	Amoxicilina con ácido clavulánico, piperacilina con tazobactam, ampicilina con sulbactam, ticarcilina con ácido clavulánico	Amoxicilina con ácido clavulánico
<b>Cefalosporinas</b>		
	Primera generación	
	cefazolina, cefalotina, cefradina	cefalexina, cefadroxilo, cefradina
	Segunda generación	
Activas frente a <i>Haemophilus</i>	cefuroxima, cefonicida, cefamandol ceforanida	cefaclor, cefuroxima axetil, cefprozilo
Activas frente a Bacteroides	cefoxitina, cefotetán, cefmetazol, cefminox	
	Tercera generación	
Espectro ampliado	ceftriaxona, cefotaxima, ceftizoxima	cefditoren pivoxil, ceftibuteno, cefixima, cefpodoxima, cefdinir
Espectro ampliado y antipseudomonas	ceftacídima, cefepima, cefoperazona	Ninguno
<b>Carbapenémicos</b>		
	imipenem con cilastatina, meropenem, ertapenem	Ninguno
<b>Monobactámicos</b>		
	aztreonam	Ninguno

Nota: Tomado de Suárez C, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Vol. 27. Núm. 2. página 119: 2009

## 2.4 Farmacocinética y farmacodinamia de los $\beta$ -lactámicos

### Características farmacocinéticas

Son bactericidas parciales, ya que sólo actúan en fase de crecimiento celular, y su eficacia es tiempo-dependiente ya que su efecto máximo ocurre a concentraciones del antibiótico libre 4-5 veces por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI), por lo que es muy importante respetar o acortar los intervalos entre las dosis.<sup>50</sup> Al tratarse de sustancias poco lipofílicas, su penetración intracelular es escasa y casi nunca alcanzan niveles mayores del 25 al 50% de las concentraciones plasmáticas. Por tanto, son antibióticos poco útiles en el tratamiento de las infecciones intracelulares.<sup>44</sup> El metabolismo de la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos es casi nulo; se mantienen en forma activa hasta su eliminación renal mediante

filtrado glomerular y secreción tubular. En general, es necesario ajustar la dosis del  $\beta$ -lactámico en sujetos con filtrado glomerular inferior a 50 mL/min.<sup>70</sup>

### **Características farmacodinámicas**

Dado que los  $\beta$ -lactámicos ejercen su acción mientras el microorganismo está en fase de crecimiento, su actividad bactericida es menor en el tratamiento de abscesos, en los que gran parte de las bacterias pueden estar en fase quiescente. En infecciones con gran inóculo bacteriano, especialmente las causadas por algunos Gram negativos, el efecto de los  $\beta$ -lactámicos puede ser inferior y, además, es más fácil la selección de mutantes resistentes.<sup>52</sup>

La combinación de penicilinas y aminoglucósidos es sinérgica *in vitro* frente a Gram positivos (estafilococos, estreptococos, enterococos) y a Gram negativos (especialmente *P. aeruginosa*).<sup>48</sup>

### *2.5 Mecanismos de resistencia*

La resistencia bacteriana se ha convertido actualmente en un serio problema de salud mundial. Este fenómeno tiene como principales consecuencias el fracaso de la terapia antimicrobiana, el incremento de la morbilidad, la mortalidad y el aumento en los costos de la atención médica.<sup>70</sup> Los microorganismos patógenos poseen genes de virulencia que les confieren la capacidad de producir daño a un hospedero susceptible. La diseminación de la virulencia entre especies bacterianas mediante transferencia horizontal de genes determina la evolución de patógenos emergentes. En este nuevo escenario, es relevante conocer los mecanismos principales de resistencia antimicrobiana.<sup>9</sup>

### **Vías de adquisición de la resistencia**

Las bacterias pueden desarrollar resistencia mediante mecanismos diferentes que, en ocasiones, pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de la resistencia a las distintas familias de antibióticos. En el caso particular de la familia de los  $\beta$ -lactámicos, la resistencia esta mediada principalmente por 4 mecanismos diferentes:

➤ *Alteraciones en la permeabilidad y bombas de expulsión*

Ante la barrera que supone la presencia de una membrana, las sustancias poco lipofílicas como los  $\beta$ -lactámicos precisan de proteínas (porinas) que le faciliten la entrada al espacio periplásmico para poder unirse a las PBP. Sin embargo, algunas bacterias presentan alteraciones en la permeabilidad (mutaciones, hiperexpresiones) que pueden modificar la resistencia basal a los  $\beta$ -lactámicos. Algunos microorganismos presentan, además, sistemas de bombeo de antibióticos (bombas de expulsión activa) capaces de eliminar a varios tipos o familias de antibióticos. Este mecanismo ocurre en forma activa, gracias a la energía de protones, derivada del potencial electroquímico a uno y otro lado de la membrana citoplasmática, o por un sistema relacionado con el ATP.<sup>70</sup>

➤ *Modificación de la diana en las PBP*

Diferentes alteraciones en las PBP (mutaciones, hiperexpresión y modificación de la afinidad) pueden dificultar la unión de los  $\beta$ -lactámicos a la proteína, lo que disminuye su actividad. Este es el principal mecanismo de resistencia en los microorganismos Gram positivos, como *S. pneumoniae*, *S. aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecium*.<sup>19</sup>

➤ *Producción de  $\beta$ -lactamasas*

En las bacterias Gram negativas, la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos está originada por varios mecanismos. El más importante, por su frecuencia y eficacia, es la producción de  $\beta$ -lactamasas, enzimas que hidrolizan el enlace amídico del anillo  $\beta$ -lactámico y que, por tanto, inactivan el antibiótico antes de su unión a las PBP. Su producción puede estar mediada por plásmidos o estar cromosómicamente codificada. En el primer caso, pueden ser transferibles y los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas suelen inactivarlas. De todas las  $\beta$ -lactamasas descritas hasta el momento, destaca por su interés e implicaciones clínicas las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC y las carbapenemasas.<sup>22</sup>

## 2.6 $\beta$ -lactamasas

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas de tipo serín proteasa, cuyo mecanismo de acción consiste en su unión al antibiótico, formando un complejo reversible no covalente; se unen al carbono

carbonilo del enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, generando una especie intermediaria de acilenzima a través de un estado de transición (oxianión tetraédrico). La resolución de esta especie se produce cuando una base general para la hidrólisis de la acilenzima y promueve la liberación del producto degradado sin actividad antimicrobiana mediante un mecanismo de acilación-desacilación (Figura 4). Sin embargo, las tres clases de enzimas descritas por Ambler (A, C y D) divergen mecánicamente, en particular con respecto a las identidades y las interacciones precisas realizadas por las bases generales necesarias para la activación de la enzima.<sup>72</sup>

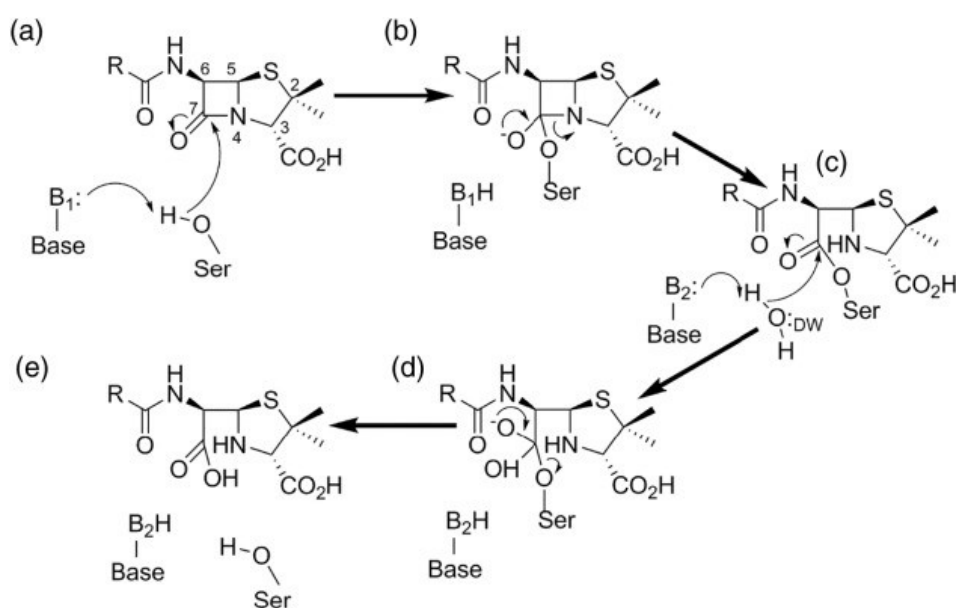


Figura 4. Mecanismo de la serin  $\beta$ -lactamasas sobre las penicilinas. (a) La base general  $B_1$  activa a la Serina para el inicio del ataque nucleofílico generando una acilenzima covalente (c) a través del estado de transición de acilación oxianiónica tetraédrica (b). La base general  $B_2$  activa la molécula de agua de desacilación para el ataque nucleofílico sobre el producto de peniciloato liberador de acilenzima (e) a través del estado de transición de desacilación tetraédrica (d). Tenga en cuenta que las identidades de las bases  $B_1$  y  $B_2$  varían entre las clases de  $\beta$ -lactamasas.<sup>72</sup>

### 2.6.1 Clasificación de las $\beta$ -lactamasas

La gran variedad de  $\beta$ -lactamasas que se han identificado hasta el momento, muestra un grupo amplio y no homogéneo de enzimas que puede subdividirse en múltiples clases. La base de datos de  $\beta$ -lactamasas contiene más de 4300 enzimas de este tipo, las cuales han experimentado diferentes grados de caracterización.<sup>72</sup> Se utilizan dos sistemas de



clasificación para este conjunto de enzimas (Cuadro 2), el sistema basado en la actividad propuesto por Bush-Jacoby-Medeiros y el sistema planteado por Ambler. Este último divide a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases distintas, denominadas A, B, C y D, identificadas con base en motivos de secuencia específicos, pero también distinguidas por diferencias fundamentales en el mecanismo hidrolítico. Las tres clases de tipo serin proteasas (A, C y D) comparten un motivo invariante **Ser-Xaa-Xaa-Lys**. Las enzimas pertenecientes a la clase B, que comprenden un grupo heterogéneo de metaloenzimas de zinc (metalo- $\beta$ -lactamasas o MBL), tienen un sitio activo binuclear de Zinc unido no covalentemente a 2 moléculas de agua para impulsar la reacción hidrolítica. Estas se distinguen por un motivo **His-Xaa-His-Xaa-Asp** que forma un centro de metal ubicado en la interfaz de las dos láminas  $\beta$  que comprenden el núcleo de la proteína.<sup>56</sup>

*Cuadro.2* Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas

Bush (2009)	Bush-Jacoby (2010)	Ambler	Sustrato	ác. clav.	EDTA	Representantes
1	1	C	cefalosporinas y cefamicinas	No	No	AmpC, OMY-2,FOX,MIR,ACT;GCI,C
	1e		cefalosporinas	No	No	GCI,CMY-37
2	2 <sup>a</sup>	A	penicilinas	Si	No	PC-1
	2b		penicilinas y cefalosporinas de primera generación	Si	No	TEM-1,TEM-2,SHV-1
	2be		cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Si	No	TEM-3,SHV-2,CTX-M-15,PER-1
	2br		penicilinas	No	No	TEM-30,SHV-10
	2ber		cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	TEM-50
	2c		carbenicilinas	Si	No	PSE-1, CARB-3
	2ce		carbenicilinas y cefepime	Si	No	RTG-4
	2d		cloxacilina	Variable	No	OXA-23,OXA-24,OXA-48
	2de		cloxacilina y cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	CepA
	2df		cloxacilina y carbapenemes	Variable	No	KPC,MBL,SME
	2e	A	cefalosporinas de espectro extendido (no actúan sobre monobactámicos)	Si	No	KPC y SME
	2f		carbapenemes	Variable	No	
3	3 <sup>a</sup>	B	carbapenemes	No	Si	IMP,VIM,GIM,SPM,SIM,NDM
	3b		carbapenemes	No	Si	CAU,GOB,FEZ

Nota: Tomada de Bush K, Jacoby G, Antimicrob agents and chemotherapy.2010,54(3); 969-976

## 2.7 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE son enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, principalmente enterobacterias como *K. pneumoniae* y *E. coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *P. aeruginosa*. Estas enzimas hidrolizan la unión amida del anillo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas, oximinocefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no cefamicinas (cefoxitina) ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico y los monobactámicos.<sup>72</sup>

Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan co-resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. La mayoría de este tipo de enzimas pertenecen a la clase molecular A de Ambler. Entre ellas se encuentran las TEM y SHV (TEM referente a la paciente Temoniera, y SHV iniciales de “sulphydryl variable”), derivadas de  $\beta$ -lactamasas con menor espectro de hidrólisis, la familia CTX-M, procedente de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*, y otras menos prevalentes como las PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO. Algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler), se incluyen en esta familia, siendo condicionadas por el perfil hidrolítico propio de este grupo de enzimas.<sup>47</sup>

### ➤ BLEE tipo TEM

La  $\beta$ -lactamasa tipo TEM-1 se identificaron por primera vez en 1963 en *E. coli* y *Salmonella*. Posteriormente se diseminó entre Enterobacteriaceae y otros patógenos Gram negativos para convertirse en una fuente generalizada de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. TEM-1 cataliza eficientemente la hidrólisis de penicilinas y cefalosporinas de primera generación y proporciona resistencia bacteriana de alto nivel a estos fármacos. El número de variantes TEM es ahora mayor que 200.<sup>56</sup> Las sustituciones más comunes en este tipo de enzimas muestran una hidrólisis mejorada de oximino-cefalosporina incluyen E104K, R164S / H, M182T, A237T, G238S y E240K. Las  $\beta$ -lactamasas mutantes recuperadas de TEM mantienen la capacidad para hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, además, demuestran resistencia a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas son consideradas como BLEE.<sup>30</sup>

➤ BLEE tipo SHV

Las  $\beta$ -lactamasas tipo SHV son enzimas de clase A, hidroliza de manera eficiente cefotaxima, y en menor grado menor ceftazidima, son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Estas enzimas son codificadas en diferentes plásmidos asociados con otros genes de resistencia a los antibióticos. Actualmente, se han descrito 189 variantes alélicas de tipo SHV Las BLEE de tipo SHV se han detectado en una amplia gama de Enterobacteriaceae y en brotes de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.<sup>30, 72</sup>

➤ BLEE tipo OXA

Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA pertenecientes a la clase D, están constituidas por dos grupos de familias significativas con perfiles propios: por una parte, se encuentra una variante de tipo metaloenzima con una alta capacidad de hidrolizar la oxacilina y la cloxacilina, las cuales se caracterizan porque son poco inhibidas por los inhibidores de las betalactamasas y EDTA. El segundo grupo de familias presenta un perfil hidrolítico semejante a las BLEE. Sus genes pueden estar integrados en el cromosoma, plásmidos o integrones. Además, poseen una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos y se han identificado 498 variantes.<sup>30</sup>

➤ BLEE tipo CTX-M

Las  $\beta$ -lactamasas CTX-M son enzimas de clase A que se caracterizan por la capacidad de hidrolizar eficientemente la cefotaxima. Estas enzimas se han extendido a nivel mundial convertirse en los BLEE más extendidas en bacterias Gram negativas. Las BLEE de tipo CTX-M se dividen en cinco grupos, basados en la homología de secuencia de aminoácidos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25). La diseminación mundial observada en este grupo de enzimas desde principios del siglo XXI, se debe tanto a su localización en elementos genéticos móviles ampliamente distribuidos como su introducción en clones con alto éxito de diseminación, como el clon de *E. coli* UPEC **ST131**.<sup>37</sup>

## 2.8 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas activas frente a las oximinocefalosporinas, cefamicinas y carbapenems.<sup>51</sup> La primera carbapenemasa conocida fue descrita en *Bacillus cereus*. En el caso de las carbapenemasas de clase A, las enzimas más importantes son las KPC debido a su distribución global, principalmente en bacterias como *K. pneumoniae*, responsables de la mayoría de las infecciones oportunistas de pacientes comprometidos en el ámbito de la atención médica. Las carbapenemasas clase B, son metaloenzimas dependientes de Zinc y son generalmente de naturaleza cromosómica, aunque recientemente se han asociados a plásmidos conjugativos e integrones. Son inhibidas por EDTA, pero no por ácido clavulánico, presentan actividad hidrolítica sobre las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas, pero no al sobre el aztreonam.<sup>37,72</sup> A las carbapenemasas clase D pertenecen algunas  $\beta$ -lactamasas tipo OXA que presentan actividad sobre los carbapenems principalmente a imipenem y meropenem.<sup>11</sup>

## 2.9 $\beta$ -lactamasas tipo AmpC

Las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC pertenecientes a la clase molecular C, son activas frente a las penicilinas, cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona), cefamicinas (cefoxitin y cefotetan) y monobactámicos (aztreonam), con excepción de las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y los carbapenémicos. Además, son resistentes a la combinación de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, pero son inhibidas por el ácido borónico y la cloxacilina.<sup>11</sup> La producción de este tipo de enzimas puede ser de forma constitutiva o inducible, siendo los niveles de producción dependientes del grado de expresión del gen *bla*<sub>AmpC</sub>. Cuando el 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.<sup>48</sup>

### *2.10 Estudio prospectivo en pacientes con infección crónicas de vías urinarias*

En un estudio prospectivo realizado en el laboratorio de patogenicidad bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” / Facultad de Medicina UNAM (PAPIIT-IN221318 y HIM/2014/022 SSA. 1122) En los últimos 5 años, en niños y adultos con Infección crónica de vías urinarias, se identificó que 90% de las cepas de *E.coli* aisladas fueron multirresistentes a la mayoría de los antimicrobianos empleados en el esquema de tratamiento. Dado que los pacientes con infecciones de repetición requieren el uso constante de antimicrobianos de entre los cuales se emplea principalmente los  $\beta$ -lactámicos tanto en atención primaria como en hospitales. El uso indiscriminado de estos agentes antibacterianos dentro de la terapia contribuye a la resistencia asociada a la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas.

### 3. Metodología

#### 3.1 Material Biológico

Los diagnósticos y características de los pacientes cuyas muestras fueron incluidas en este estudio se describen en el Cuadro 3. La selección de las 336 cepas pertenecientes a 16 niños (252 aislados) y 4 adultos (84 aislados) con ICVU ( $\geq 3$  casos al año) que fueron multi-tratados con antimicrobianos y presentaron persistencia.

Cuadro 3. Características de la población de estudio

PACIENTE	GENERO	EDAD	DIAGNÓSTICO	No de muestras positivas
AZR	F	15	Incontinencia urinaria	2
ARV	F	11	Incontinencia urinaria secundaria a espina bífida oculta	2
NBA	F	5	Síndrome de Hinman	5
XZG	F	14	Disfunción miccional	11
OGO	F	12	Obstrucción uroepitelial izquierda	2
KMB	F	6	Reflujo vesicoureteral bilateral + IVUR	5
CMV	M	15	Incontinencia asociada a malformación ano-rectal	3
RMR	F	18	Vejiga eurogénica por mielomeningocele	7
PSS	F	13	Escoliosis dorsolumbar	4
ZGH	F		Reflujo vesicouretral +vejiga hipoactiva	4
FMH	F	7	Vejiga neurogénica	1
AGG	M	15	Trauma de uretra	5
PSL	F	7		3
MVC	F	11	Disfunción miccional	2
AA	F	10	-	7
XG	F		-	6
CR	F		-	1
EC	F	62		6
RMO	M	55	$\geq 3$ casos de IVU al año	6
EGR	F	51		8

\*F: femenino, M: masculino

Los pacientes forman parte del proyecto HIM/2014/022 SSA. 1122 “*Desarrollo de Autovacunas para el Tratamiento y Control de Infecciones Persistentes de Vías Urinarias*” y PAPII-IN221318 “*Estudio prospectivo de seguimiento de pacientes con infección de vías*”

***urinarias, caracterización fenotípica, genotípica y ensayo de actividad antimicrobiana de compuestos naturales y sintéticos en las cepas de Escherichia coli uropatógena aislada”.***

Las cepas se mantuvieron en conservación en tubos de gelosa especial y se recuperaron por siembra a modo agotamiento radial en agar sangre.

### *3.2 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana*

Para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos se efectuó la prueba descrita por Kirby & Baüer de acuerdo con la siguiente descripción: se preparó una suspensión bacteriana en un tubo de ensayo con 3mL de caldo luria, esta se ajustó con la turbidez al tubo 0.5 en la escala de Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Se inocularon por masificación 8 cajas de agar Müeller Hinton por cepa, utilizando un hisopo estéril, y se colocaron 4 discos de antibióticos por caja con al menos 22 mm de distancia entre ellos y 12 mm de distancia del borde de la caja, estas se incubaron a 37°C por 24 horas. Se utilizaron 33 antibióticos (Oxoid, UK) enlistados en el Cuadro 4. Los resultados se interpretaron considerando el diámetro del halo de inhibición, según los criterios del manual del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), catalogándose LA CEPA como susceptible (S), intermedia (I) y resistente (R). Se utilizó como cepa de referencia *E.coli* ATCC 25922.

Cuadro 4 Patrones interpretativos del diámetro de la zona de inhibición para Enterobacteriaceae

Antibiótico	Código	Concentración del disco	Diámetro interpretativo (mm)		
			Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	AMP	10 µg	≤13	14-16	17≥
Piperacilina	PRL	100 µg	≤17	18-20	21≥
Carbenicilina	CAR	100 µg	≤19	20-22	23≥
Mecilanam	MEL	10 µg	≤11	12-14	15≥
Amox-ácido clavulánico	AMC	20-10 µg	≤13	14-17	18≥
Piperacilina-tazobactam	TZP	100-10 µg	≤17	18-20	21≥
Cefozolina	KZ	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cefalotin	KF	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cefamandol	MA	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cefepime	FEP	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cecefoperazona	CFP	75 µg	≤15	16-20	21≥
Cefoxitin	FOX	30 µg	≤14	15-17	18≥
Ceftriaxona	CRO	30 µg	≤13	14-20	21≥
Ceftazidime	CAZ	30 µg	≤14	15-17	18≥
Furoxime	CXM	30 µg	≤14	15-22	23≥
Meropenem	MEM	10 µg	≤13	14-15	16≥
Nitrofurantoina	F	300 µg	≤14	15-16	17≥
Aztreonam	ATM	30 µg	≤15	16-21	22≥

Gentamicina	CM	10 µg	≤12	13-14	15≥
Amikacina	KA	30 µg	≤14	15-16	17≥
Kanamicina	K	30 µg	≤13	14-17	18≥
Trobramicina	TOB	10 µg	≤12	13-14	15≥
Estreptomina	S	10 µg	≤11	12-14	15≥
Tetraciclina	TE	30 µg	≤14	15-18	19≥
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤15	16-20	21≥
Norfloxacina	NOR	10 µg	≤12	13-16	17≥
Ácido nalidixico	NA	30 µg	≤13	14-18	19≥
Trimetoprim-sulfametoxazol	STX	1.5/23.75 µg	≤10	11-15	16≥
Sulfonamidas	S3	250/300 µg	≤12	13-16	17≥
Trimetoprim	W	5 µg	≤10	11-15	16≥
Cloramfenicol	C	30 µg	≤12	13-17	18≥
Fosfomicina	FOS	200 µg	≤12	13-15	16≥
Fosfomicina trometramol	FOT	200 µg	≤12	13-15	16≥

**Nota.** Edición 27 del año 2018

### 3.3 Identificación fenotípica de BLEE por sinergia de doble disco

Para la revisión de los perfiles de susceptibilidad se tomó en cuenta los patrones de resistencia descritos por el CLSI (Cuadro 5) como base para establecerlos criterios de selección de las cepas que serían sometidas a la prueba fenotípica de sinergia de doble disco.

Cuadro 5. Principales patrones de resistencia a β-lactámicos en función a tipo de β-lactamasa implicada

Fenotipo	AMP	AMC	TZP	CTX	CAZ	FOX	FEP	IMP	MEM	CAZ	ATM
UPEC no BLEE	R	S	S	S	V	S	S	S	S	r/S	S
Carbapenemasas	R	R	R	R	R	V	R	R	R	R	r/R

**NOTA:** AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; TZP, piperacilina-tazobactam; IMP, imipenem; FOX, cefoxitina; CXM, cefuroxima; MEM, meropenem; FEP, cefepima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; V, variable; S, sensible; R, resistente; r, halos reducidos

Las cepas que fueron sometidas a esta prueba se seleccionaron a partir de los resultados de los antibiogramas, el CLSI propone los siguientes criterios como screening para posibles cepas productoras de BLEE en *E. coli*:

- Susceptibles a AMC.
- Resistentes a más de dos de los siguientes antibióticos: FOX, CAZ, FEP y CXM.

Para confirmar la producción de enzimas tipo BLEE, se utilizó la técnica de sinergia de doble disco. Esta consiste en la utilización de inhibidores de β-lactamasas en un antibiograma convencional. Se inocula una placa de agar Müller-Hinton a partir de una suspensión de la



cepa problema crecida en medio luria ajustando la turbidez al tubo 0.5 de la escala de McFarland. Sobre ella se colocó en la parte central de la caja un disco de AMC (30 µg), después se colocaron los discos (Oxoid, UK) de ATM (30 µg), CTX (30 µg), CAZ (30 µg) y FEP (30 µg) a una distancia de 20 mm de forma perpendicular al disco de AMC. Posteriormente las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas, se utilizó como cepa de referencia *K. pneumoniae* ATCC 700603. Se interpreta como resultado positivo la ampliación o deformación (efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano) del halo de inhibición en la zona de intersección con AMC, para al menos uno de los antibióticos.

#### *3.4 Identificación fenotípica de carbapenemasas por test de Hodge modificado*

El CLSI propone como criterio de selección de cepas productoras de carbapenemasas la resistencia a MEM, IMP o ERT. Para la identificación fenotípica de las carbapenemasas, se siguió el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión en placa. Esta técnica consiste en inocular por masificado una placa de agar Müller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 con una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de Mc Farland diluida 1:10 con agua estéril. Después, se colocó un disco de Meropenem (MEM) en el centro de la placa y se inocularon de 3-5 colonias de la cepa control IMSS OXA-1<sup>7</sup> formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con el carbapenémico hacia el borde de la caja. Se realiza el mismo procedimiento para las cepas problema (máximo 4 estrías por caja). Se considera como resultado positivo aquel que presenta la formación de una punta de flecha entre la intersección del halo de inhibición y la estría productora de carbapenemasa debido al crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922.<sup>42</sup>

#### **Ensayo de discos combinados con inhibidores**

Las cepas positivas para el Test de Hodge se someten a la siguiente prueba para identificar de manera fenotípica el tipo de carbapenemasa (MBL y KPC) además de las β-lactamasas de tipo Ampc. Esta técnica consiste en emplear discos impregnados con inhibidores selectivos de esta clase de enzimas. Para la detección de carbapenemasas del tipo MBL, se utiliza el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante, debido a que tiene la capacidad de combinarse con los iones metálicos del centro activo de esta clase de enzimas.

Para ello, se preparó una solución madre de EDTA 0.5 M con un pH de 8 bajo condiciones de esterilidad. Posteriormente se añadió 10 µL de la solución del inhibidor a discos blancos estériles, dejando absorber al menos 30 min. asegurándose de que los discos estén lo suficientemente secos antes de su aplicación.

Se siguió el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión, se inoculo por masificado una placa de agar Müeller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema ajustada a la turbidez del tubo 0.5 de la escala de Mc Farland y se colocó un disco con EDTA en el centro de la placa y a ambos lados discos de Meropenem (MEM) e Imipenem (IMP) a una distancia de 15 mm centro a centro. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se interpreta como resultado positivo la ampliación o deformación del halo de inhibición entre el inhibidor y alguno de los carbapenémicos.<sup>42</sup>

Para la detección de las carbapenemasas de tipo KPC se emplea como inhibidor selectivo el ácido borónico. Para ello, se preparó una solución madre de ácido borónico (120 mg de ácido fenilborónico disueltos en 3 mL de DMSO y 3 mL de agua) en condiciones de esterilidad, esta solución se dispenseo (10 µL) en discos blancos. Se siguió el mismo procedimiento que para el EDTA. Se interpreta como resultado positivo la deformación o ensanchamiento del halo de inhibición con los dos discos de los carbapenémicos y el disco de ácido borónico.

Por último, para la identificación de las enzimas de tipo AmpC se utilizó como inhibidor selectivo la cloxacilina. La técnica se realizó empleando el procedimiento estándar para la prueba de difusión con disco, posteriormente se colocó un disco de cloxacilina (OB) 5 µg en el centro de la placa y a ambos lados discos de CAZ y FOX a una distancia de 15 mm centro a centro, las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se interpreta como resultado positivo la deformación o ensanchamiento del halo de inhibición entre los discos de las cefalosporinas y el disco de OB.

### *3.5 Identificación genotípica de BLEE*

#### **Obtención del DNA bacteriano**

El DNA se obtuvo por el método descrito en el **Manual Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit Catalog No. D6005, Zymo Research. E.U** y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

## Detección de genes *bla*

La detección de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, se llevó a cabo por el método de PCR punto final descrito por Kiiru<sup>33</sup> utilizando los iniciadores puntualizados en la Cuadro 6. La mezcla de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl para cada uno de los genes, compuesta de 10 µl de Máster Mix (2X) (ThermoScientific), 1 µl de cada iniciador (30 pmol/µl), 7 µl de agua inyectable y 2 µl del ADN bacteriano. La amplificación se realizó en un termociclador marca TECHNE modelo <sup>3</sup>Prime (U.K). Se utilizó como control negativo la cepa *K12 de E. coli* y como control positivo IMSS SHV-9, IMSS TEM-13, CTX-M15 e IMSS OXA-1-60 respectivamente las cuales fueron previamente secuenciadas, el producto de PCR corresponde a plásmidos de las enzimas correspondientes.<sup>34</sup>

Cuadro 6. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes de resistencia de <i>E. coli</i>						
Genes <i>bla</i>	Primer	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Temperatura de alineamiento	Número de ciclos	Extensión del producto (pb)	Número de acceso al gen
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-F TEM-R	ATGAGTATTCAACATTTCGG CCAATGCTTAATCAGTGAGG	56 °C	30	840	EF125012
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-F SHV-R	TTCGCCTGTGTATTATCTCCCTG TTAGCGTTGCCAGTGTTTCG	58 °C	30	854	AF148850
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M-F CTX-M-R	ATGTGCAGTACCAGTAATGTGATGGC TGGGTGAAGTATGTAACCAGAATCAGCGG	58 °C	35	593	Y10278
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	OXA-1-F OXA-1-R	ATGAAAAACACAATACATATCAACTTCGC GTGTGTTTAGAATGGTGATCGCATT	58 °C	30	820	JO2967

Los productos obtenidos tras la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (1.125 g de agarosa en 75 mL de tampón Sodio Borato al 1X), 5 µl del amplicon de cada muestra se mezcló con 1µL del buffer de carga (cyan/Orange Loading buffer, Invitrogene®), se utilizó un marcador de peso molecular de 1500 pb (Cleaver Scientific Ltd, CSL- MDNA-100 BP, U.K). El gel fue sometido a un campo eléctrico a 100 Volts durante 60 minutos, posteriormente para su observación se tiñó con Bromuro de Etidio (0.001%) y la visualización de los productos amplificados se realizó con un transiluminador

de luz ultravioleta marca Cleaver Scientific TTD modelo OmniDoc Gel Documentation System (U.K).

### 3.6 Caracterización por serología de *E.coli*.

La tipificación serológica se realizó por el método descrito por Ørskov & Ørskov<sup>55</sup> de aglutinación en microplacas, empleando 187 sueros preparados en conejo contra el mismo número de antígenos somáticos de *E. coli* y 56 antígenos flagelares reportados hasta el momento (SERUNAM).

**Obtención e identificación del antígeno somático(O).** Las cepas de *E. coli* se sembraron en medio de agar soya tripticaseína (TSA) inclinado, se encubó a 37 °C por 24 h. Una vez que hubo crecimiento bacteriano en el medio se adicionó solución salina al 9% hasta cubrir todo el pico de flauta dejando reposar por al menos 30 min. El sobrenadante se colocó en otros tubos de ensaye (16x150) y se llevó a la autoclave a 110 °C por 1 hora. Posteriormente se le agregó formalina (9mL al 10%) y se dejaron reposar 1h. Para la Identificación del antígeno somático se utilizaron microplacas serológicas (3 placas) de 96 pozos y fondo en U, en cada pozo se colocó 50 µL de los 187 (O1-O187) sueros anti-O de *E. coli* diluidos 1:100. Adicionalmente se incluyeron 50 sueros contra los antígenos de *Shigella* (15 de *S. disentería*, 13 de *S. flexneri*, 20 de *S. boydii* y 2 de *S. sonnei*). Posteriormente las microplacas se incubaron a 50 °C por 18-24 h, al finalizar la incubación se registraron los resultados de aglutinación.<sup>53</sup>

**Obtención e identificación del antígeno flagelar (H).** Las cepas se inocularon en tubos de 16x150 con tubos Craigies con medio semisólido y se dejaron encubar a 30 °C con un intervalo de 1 a 14 días. Cuando en el medio semisólido se observó el crecimiento bacteriano, se procedió a inocular las cepas en el Caldo biotriptasa y se incubó a 30 °C durante 24 h. Posteriormente se le agregó formalina (9mL al 10%) y se dejaron reposar 1h Para la identificación del antígeno flagelar. se llenaron las placas de 96 pozos y fondo en U con 50 µL de 56 sueros anti-antígeno H y se incubaron a 50 °C durante 2 h. Al final de la incubación se registraron las reacciones de aglutinación.<sup>53</sup>

## 4. Resultados

### Susceptibilidad Antimicrobiana

Los ensayos de susceptibilidad de 336 cepas de *E. coli* a 33 antimicrobianos, mostró que 23/33 de los antibióticos presentaron un porcentaje de resistencia mayor al 20 % y solo se presentó susceptibilidad mecilina, piperacilina/tazobactam, cefepime, ceftioxitina, meropenem, amikacina, cloranfenicol, fosfomicina, fosfomicina/trometamol. Cabe mencionar que se observó una elevada cantidad de cepas mutantes dentro de los halos de inhibición, principalmente en antibióticos combinados como lo es el TMP/SXT pese a la baja resistencia que presentaron los aislados 23% (77/336).

De acuerdo con la clasificación de Magiorakos,<sup>41</sup> el 88% (296/336) de los aislados fueron clasificados como MDR. Al realizar un análisis comparativo de la resistencia a diferentes antibióticos, entre las cepas aisladas de niños y adultos. Las cepas de *E. coli* aisladas de niños mostraron una alta tasa de resistencia a la familia de las penicilinas 63 % (158/252), quinolonas 43% (108/252) y sulfas 36% (90/252) lo cual reduce en gran medida los esquemas de tratamiento, sin tomar en cuenta tratamientos más severos. En el caso de los adultos, la resistencia recae principalmente en las quinolonas 55% (46/84), a los anfenicoles 20% (17/84), seguida de las fluoroquinolonas 17% (14/84), considerando de estas últimas al ciprofloxacino 52% (44/84) debido a que es uno de los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de las IVU. (Figura 5).

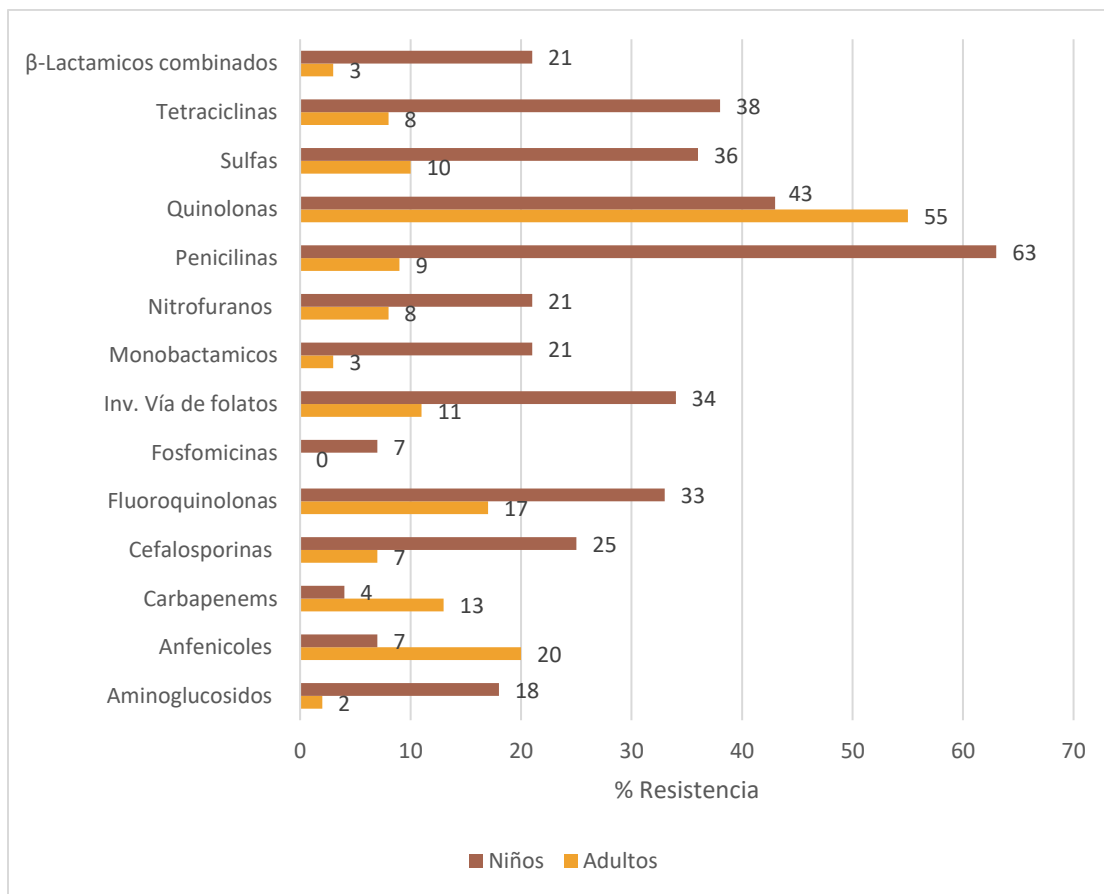


Figura 5. Porcentajes de resistencia de los 336 aislados a las 14 familias de antimicrobianos bajo los criterios del CLSI, 2018

Se seleccionaron 144 cepas UPEC (43%) que mostraron perfiles compatibles con la posible producción de BLEE. Además, se consideró la presencia de 30 cepas (9%) que presentaron resistencia al grupo de los carbapenémicos y 21 (6%) cepas que presentaban un fenotipo compatible con la producción de β-lactamasas del tipo AmpC. Se confirmó la producción de BLEE (por sinergia de doble disco) en 78/144 de las cepas candidatas, así mismo se ratificó la presencia de 17/30 cepas productoras de carbapenemasas (por test de Hodge) y 16/21 cepas portadoras de enzimas tipo AmpC. Lo que representa un 33% (111/336) de cepas de *E.coli* son productoras de β-lactamasas. Tomando en consideración la clasificación de Ambler y la actividad de cada enzima de los 111 aislados (Cuadro 7) el 61% pertenecen a la clase A, seguidas por D (18%), C (15%) y por último B (6%).

Cuadro 7. Distribución de  $\beta$ -lactamasas en cepas UPEC

Clase	Actividad enzimática	Representantes	N cepas	%
A	Carbapenemasa	KPC	10	9%
		CTX-M	31	28%
	BLEE	TEM	21	19%
		SHV	6	5%
B	Carbapenemasa	MBL	7	6%
C	Inducible	AmpC	16	15%
D	BLEE	OXA	20	18%
Total			111	

### Genes *bla*

El análisis de la presencia de genes codificadores de BLEE en los 111 aislados de UPEC productores de  $\beta$ -lactamasas, se confirmó la presencia en 78 (70%) de las cepas portadoras de genes *bla*, de las cuales 48 portaban un solo gen *bla* y 30 de los aislados presentaron combinaciones de estos genes (Figura 6).

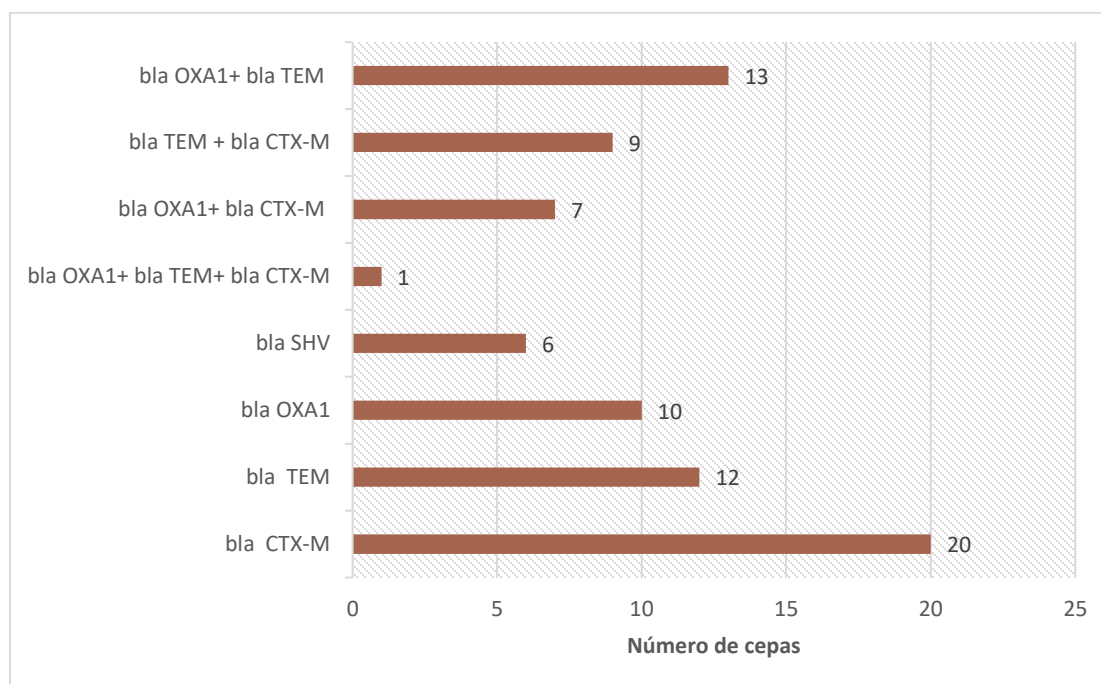


Figura.6 Distribución de genes *bla* aislados de cepas de *E. coli*

## ***Filogenia***

Para conocer si las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas tiene una correlación con algún filogrupo descrito en *E.coli*. Se utilizaron los resultados de filogenia que previamente obtenidos.<sup>43</sup> El análisis mostró que las 111 productoras de  $\beta$ -lactamasas se encuentran repartidas en los 4 filogrupos, con una mayor prevalencia en los filogrupos **A** 39% (43/111) pertenecientes al grupo de comensales y **B2** 34 % (38/111) del grupo de las extraintestinales (Figura 8).

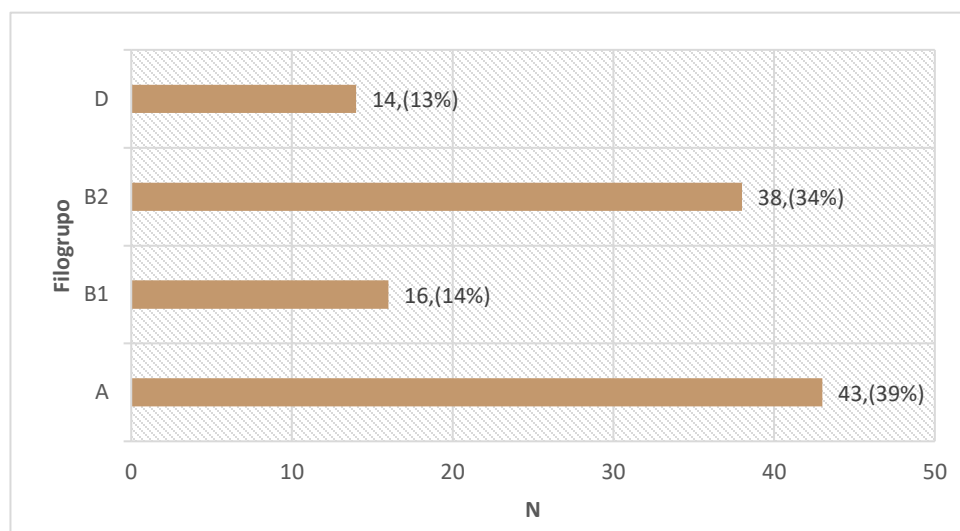


Figura 7. Distribución filogenética de cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas

El análisis estadístico no mostro diferencia significativa entre los filogrupos comensales (A, B1) y extraintestinales (B2, D) las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas como dentro de las no productoras. Para conocer si existe un patrón de susceptibilidad a diferentes antibióticos se realizó un análisis de entre la producción de enzimas Carbapenemasas, BLEE y AmpC con el sustrato.

## ***Serología***

Las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se incluyeron en 17 serotipos diferentes, 4 señalados como clásicos y 13 como no clásicos UPE, distribuidos en 36 y 46 cepas respectivamente. Al resto de las cepas no se pudo definir el serotipo (Cuadro 8). En el grupo de los serotipos clásicos O25:H4, fue el que presentó mayor incidencia dentro de este conjunto de aislados y los serogrupos no clásicos mostraron una alta variabilidad sin presencia de algún serotipo predominante.



Cuadro8. Caracterización serológica de cepas *E.coli* UPEC productoras de  $\beta$ -lactamasas

Clasificación de los serotipos	Serotipos <sup>(N)</sup>	N (%)
Clásicos	<i>O25:H4</i> <sup>(21)</sup>	<b>36 (35%)</b>
	<i>O75:H-</i> <sup>(6)</sup>	
	<i>O7:H4</i> <sup>(5)</sup>	
	<i>O1:H-</i> <sup>(4)</sup>	
No clásicos	<i>O11:H25</i> <sup>(6)</sup>	<b>46 (45%)</b>
	<i>O23:H-</i> <sup>(4)</sup>	
	<i>O45:H-</i> <sup>(5)</sup>	
	<i>OND:H-</i> <sup>(5)</sup>	
	<i>O164:H4</i> <sup>(3)</sup>	
	<i>O96:H16</i> <sup>(3)</sup>	
	<i>O9:H-</i> <sup>(3)</sup>	
	<i>OND:H-</i> <sup>(5)</sup>	
	<i>O8:H-</i> <sup>(4)</sup>	
	<i>O6:H1</i> <sup>(3)</sup>	
	<i>OND:H9</i> <sup>(3)</sup>	
	<i>O170:H-</i> <sup>(3)</sup>	
	<i>O156:H-</i> <sup>(4)</sup>	
	<i>O102:H6</i> <sup>(3)</sup>	
	<i>O49766:H4</i> <sup>(3)</sup>	
<i>OND:H32</i> <sup>(3)</sup>		
<i>O124:HND</i> <sup>(2)</sup>		
<b>No tipificables 21 (20%)</b>		

### Correlación entre el fenotipo y genotipo de las cepas de *E. coli* productoras de $\beta$ -lactamasas

Para conocer si existe un patrón de susceptibilidad a diferentes antibióticos se realizó un análisis entre la producción de enzimas Carbapenemasas, BLEE y AmpC con los perfiles de resistencia. Como se mencionó anteriormente 17/111 (15%) de los aislados analizados son productoras de carbapenemasas (KPC y MBL) aislados del urocultivo de 8 pacientes. Sin embargo, 6/17 (35%) de estas cepas contienen información genética para la síntesis de las enzimas BLEE (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>). Al realizar una correlación con los resultados de susceptibilidad, la producción de carbapenemasas y la procedencia de los genes BLEE se observaron 4 diferentes patrones de resistencia descritos como grupos del I al IV (Cuadro 9). En el grupo I y II se asociaron las cepas productoras de KPC mientras que en el grupo III y IV se encuentran las cepas productoras de MBL. Algunas de estas cepas presentan genes asociados a la producción de BLEE (grupo II y III)

Cuadro 9. Caracterización de cepas productoras de Carbapenemasas

Grupo	Criterios de selección							Carbapenemasas	Serología	Genes BLEE	Paciente	Urocultivo	No cepas	Filogrupo
I	AMC	FOX	FEP	CXM	CTT	MEM	ERT	KPC	O25:H4		EC	U2	2	B2
	S	R	R	S	S	R	R		O11:H25		ARV	U1	2	D
									O23:H?/H-*/O7:H4			U2	3	A
II	R	R	R	R	S	R	R	KPC	OR:H9	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	CMV	U1	1	ND
									OND:H-*	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	XZG	U3	2	B1
III	R	S	R	R	S	R	S	MBL	O96:H16	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	KMB	U2	1	A
									O25:H4*	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	RMR	U6	2	B2
IV	S	S	S	R	S	R	S	MBL	O1:H-		AZR	U2	2	A
									O152:H8		ERR	U1	2	A

**Nota:** Se consideraron los halos de inhibición para los siguientes antimicrobianos empleados en las pruebas fenotípicas: amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), cefoxitina (FOX), cefepime (FEP), cefotetan (CTT), meropenem (MEM), imipenem (IMP), ertapenem (ERT), los genes *bla* específicos fueron *SHV-9*, TEM-13, CTX-M15 y OXA-1-60 correspondientes a las principales familias de BLEE. **ND** (no determinado hasta el momento).(\*) Serogrupo predominante dentro de un mismo urocultivo

Las cepas productoras de KPC fueron resistentes a MEM y ERT mientras que las productoras de MBL solo presentaron resistencia a MEM. Los 6 aislados que presentaron combinación con algún gen BLEE, el patrón de sensibilidad fue la resistencia a AMC y a la mayoría de las cefalosporinas. La variación en los serogrupos y la filogenia no muestra ninguna correlación significativa.

Al realizar la correlación entre las cepas de *E.coli* productoras de BLEE (sinergismo) con la presencia de genes *bla*, se pudo clasificar a las cepas en 5 grupos de acuerdo al patrón de sensibilidad a los diferentes β-lactámicos (Cuadro 9). El grupo I, se encuentran 19 cepas aisladas de 4 pacientes que presentaron *bla*<sub>TEM</sub> o en combinación con *bla*<sub>OXA-1</sub> o *bla*<sub>CTX-M</sub>. En el grupo II se encuentran 13 cepas aisladas de 4 pacientes que presentan *bla*<sub>oxa-1</sub> y *bla*<sub>oxa1/bla</sub><sub>CTX-M</sub>

Cuadro 9. Caracterización de cepas productoras de BLEE

Grupos	Criterios de selección						Serología	Genes BLEE	Paciente	Urocultivo	No cepas	Filogrupo
I	AMC	CXM	CAZ	ATM	FEP	FOX	O8:H-/O156:H-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	ZGH	U1	4	B2
							O?:H-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>		U3	3	B2
							OND:H-	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	XG	U1	3	A
	R	R	R	S	R	S	O12:H-			U2	3	A
							O6:H1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	PSS	U1	3	A
							O25:18		EGR	U1	3	D

II	S	R	R	S	R	S	OND:H9	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	XG	U5	3	B2
							O49766:H4*/OND:H32		PSL	U2	4	ND
							O25:H4	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	OGO	U2	3	B2
							OR:H4	<i>bla</i> <sub>OXA-1/bla</sub> <sub>CTX-M</sub>	XZG	U8	3	B2
III	S	S	R	S	R	S	O153:H51	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	AA	U6	3	B2
							O75:H-			U7	3	B2
IV	S	R	S	S	R	S	O45:H-		NBA	U1	3	B2
							OR:H25*/O11:H25		KPS	U2	4	ND
							OND:H-	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	KBC	U3	3	ND
							O75:H-		EGR	U2	3	D
							OR:H25*/O11:H25		SC	U1	4	ND
V	R	R	R	R	R	R	O25:H4	<i>bla</i> <sub>CTX-M/bla</sub> <sub>TEM/bla</sub> <sub>OXA-1</sub>	OGO	U2	1	B2

**Nota:** Se consideraron los halos de inhibición para los siguientes antimicrobianos empleados en las pruebas fenotípicas: amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), los genes *bla* específicos fueron *SHV-9*, TEM-13, CTX-M15 y OXA-1-60 correspondientes a las principales familias de BLEE. **ND** (no determinado hasta el momento). (\*) Serogrupo predominante dentro de un mismo urocultivo

En grupo III se encuentran 6 cepas aisladas de 2 diferentes urocultivos del mismo paciente que presentan el gen *bla*<sub>SHV</sub>.

En el grupo IV se encuentran *E. coli* aisladas de 6 pacientes que portan el gen *bla*<sub>CTX-M15</sub>

El último grupo de BLEE (V) se encuentra una cepa *E. coli* Filogrupo B2, resistente a los 6 antibióticos tomados como criterio de selección y en cuyo genoma se encontró 3 de los 4 genes *bla* buscados en este estudio.

En el cuadro 10. se muestra un sexto grupo de 17 cepas en el que se encuentran cepas que tienen la información genética para las β-lactamasas de tipo AmpC de 17, presentan resistencia a los inhibidores de las β-lactamasas, no presentan correlación con algún serogrupo en específico ni Filogrupo particular. Este tipo de enzima no exhibió combinación con ningún gen BLEE o carbapenemasa (Cuadro 10).

*Cuadro. 10* Caracterización de cepas productoras de enzimas inducibles tipo AmpC

Grupos	Criterios de selección					Serología	Enzima	Paciente	Urocultivo	N cepas	Filogrupo
VI	AMC	FEP	FOX	CRO	TZP	OR:H25*/O102:H6		FMH	U1	4	ND
						OND:H-		ZGH	U1	3	B1
	R	S	R	R	R	O25:H4	AmpC		U5	3	B2
						O124:H? /OND:HND*		CR	U1	4	ND
						O25:H4		RMR	U6	3	B2

**Nota:** Se consideraron los halos de inhibición para los siguientes antimicrobianos empleados en las pruebas fenotípicas: amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), ceftriazona (CRO). **ND** (no determinado hasta el momento). (\*) Serogrupo predominante dentro de un mismo urocultivo

## 5. Discusión

La población a nivel mundial está padeciendo las consecuencias económicas y sanitarias de la constante falla de los tratamientos ante microorganismos MDR, al menos 700 000 personas fallecen cada año por enfermedades asociadas a las bacterias farmacorresistentes (ONU 2019). Dentro de la amplia gama de mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias, uno de los que más destaca dentro de los bacilos Gram negativos es la producción de  $\beta$ -lactamasas.<sup>66</sup> Cepas UPEC productoras de BLEE son de distribución mundial y su prevalencia varían según los países, la política de antibióticos, la fuente y el año de aislamiento de las bacterias.<sup>19</sup>

En México se ha aislado cepas UPEC productoras de  $\beta$ -lactamasas, de aislados intrahospitalarios o de comunidad (PUCRA, 2018, Lagunas-Rangel FA. 2018, Paniagua-Contreras GL. 2018), sin embargo, no se ha realizado un análisis de LA resistencia a diferentes antibióticos y la prevalencia de BLEE en los aislados de pacientes con ICVU, cuya característica es la recurrencia asociado a complicaciones anatómica o fisiológica de las vías urinarias. El objetivo de este estudio fue identificar cepas BLEE de una colección de *E. coli* aislados de la orina de niños y adultos con ICVU y correlacionar los resultados con algunas características fenotípicas y genéticas de las cepas analizadas.

Para seleccionar las cepas candidatas a prestar  $\beta$ -lactamasas, se realizó un ensayo de sensibilidad a diferentes antibióticos. El análisis de estos resultados, mostraron cepas MDR en un alto porcentaje, sin embargo, se pudo observar un patrón de resistencia diferente entre las cepas aisladas de niños y adultos. Las cepas aisladas de los niños presentaron un mayor porcentaje de resistencia, principalmente a las penicilinas, quinolonas y sulfas, debido a que este tipo de pacientes fueron sometidos a intervención quirúrgica o presentaban reflujo vesicoureteral y mantenían tratamiento profiláctico por periodos largos.<sup>31</sup> En el caso de los adultos, la resistencia incurre en las quinolonas anfenicoles, y fluoroquinolonas esto podría relacionarse con el tipo de tratamiento de primera línea en pacientes con IVU no complicada.<sup>27</sup>

En el 2018 el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) reporto en aislados UPEC, 49% de resistencia a cefalosporinas, 82% ampicilinas y 63 % para ciprofloxacino, los cuales contrastan con los resultados mostrados en este estudio, exhibiendo

porcentajes más elevados para estos antibióticos. En ambos estudios la resistencia se centra en los  $\beta$ -lactámicos y las quinolonas en el caso de PUCRA, esto puede deberse a la cantidad y tipo de población seleccionada de estudio, ya que no se menciona que se haga una distinción entre pacientes por edad o el grado de severidad de la infección, que son factores por considerar para los esquemas de tratamiento.

De acuerdo con lo sugerido por la Infectious Diseases Society of America (IDSA), para poder considerar un antimicrobiano como tratamiento empírico, el punto de corte recomendado de resistencia debe ser igual o menor a 20% en el área connotada.<sup>25</sup> Tomando en cuenta este porcentaje y utilizándolo como medida de corte para la población estudiada, se tiene que solo se podría hacer uso de anfenicoles, carbapenémicos y aminoglucósidos para los niños con ICVU y para los adultos, se dispone de más de 6 familias como posibles opciones para el tratamiento profiláctico, lo cual no es altamente recomendado por los efectos secundarios que estos pueden llegar a presentar, la reducción de la ventana terapéutica y el aumento del costo.<sup>8,53</sup>

Con los resultados de sensibilidad a antimicrobianos se realizó la selección de 144/336 cepas de *E. coli* candidatos a la producción de  $\beta$ -lactamasas (de acuerdo con el CLSI), sin embargo, solo en 111 (33%) cepas se confirmó su presencia por sinergia. Esta diferencia se puede explicar porque en las bacterias la producción de enzimas no es el único mecanismo de resistencia a antimicrobianos.<sup>64</sup> Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados mostraron que el 33% de las cepas analizadas producen alguna enzima de tipo  $\beta$ -lactamasa, comparando este resultado con otros realizados previamente en nuestro país reportan un incremento de UPEC productoras de BLEE en dos periodos, 2014 fue 14.4%<sup>10</sup> y en 2017 fue de 31.3%<sup>19</sup>, este último muy cercano al valor obtenido en nuestros resultados. Este incremento en el tiempo (de 10.3% en el 2007 a 40.8% en 2017), también fue documentado en un estudio retrospectivo en aislados UPEC en un hospital de Morelia Michoacán.<sup>32</sup>

En otros países como España (9.2%), Hungría (9.02%), Arabia (33%) e Irán (67.5%) los porcentajes de cepas UPEC-BLEE aislados en 2017 fueron variables, en 2 casos tres veces más bajo que los resultados obtenidos en nuestro país en ese mismo período. Esto puede deberse a múltiples factores, principalmente a la falta de regulación sanitaria en algunos países y la automedicación, como principales factores para el incremento contante de este tipo de cepas.<sup>69</sup>

Dentro de las enzimas  $\beta$ -lactamasas que pertenecen a la clase A (TEM, SHV, CTX-M y KPC); el predominio de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fue el principal subtipo de BLEE. Situación similar reportada a nivel mundial, el motivo por el cual las cepas portadoras de este subtipo predominan en las IVU se desconoce a ciencia cierta, sin embargo, se sugiere que este incremento se debe a una mayor tasa de transmisión del plásmido o alguna ventaja ecológica sobre otro subtipo de BLEE.<sup>64</sup>

En otras cepas productoras de enzimas de la clase A investigadas (TEM y SHV), los porcentajes de prevalencia son similares a lo reportado en países como China y Kenya, en los cuales *bla*<sub>TEM</sub> es el siguiente gen mayormente identificado seguido de *bla*<sub>SHV</sub>.<sup>33</sup> En México Paniagua- Contreras G. y cols. (2018) y Galindo Mendez y cols. (2017) reportan como segundo gen predominante *bla*<sub>TEM</sub>, aunque en porcentajes mucho más bajos que los obtenidos en este estudio y una mayor presencia del gen *bla*<sub>SHV</sub> en cepas UPEC aislados de comunidad. Las carbapenemasas de la clase A (KPC) y B (NDM y VIM) presentan un alto impacto epidemiológico en América, su distribución depende en gran medida del área geográfica, siendo KPC la de mayor predominio.<sup>74</sup> En México no se tienen reportes de este tipo de enzimas ni de las de tipo inducible por la baja incidencia (1%) que se tiene a nivel Latinoamérica en *E. coli*,<sup>18</sup> la mayoría de los estudios solo analizan cepas productoras de BLEE.

Con el propósito de caracterizar mejor los aislados y comprender mejor la epidemiología en el territorio, este estudio examinó las relaciones filogenéticas y serológicas de los aislados de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas, se observó el predominio de estas cepas con serogrupos no clásicos y agrupados en filogrupos comensales (A y B2), estos hallazgos pueden deberse a que la gran mayoría de los episodios de IVU está producida por microorganismos que provienen del colon, lo que condiciona en gran medida la etiología. Dentro de los serogrupos clásicos identificados en las cepas UPEC productoras de  $\beta$ -lactamasas fue O25:H4 el más prevalente, resultados similares reportados en México por Miranda-Estrada *et al.*, 2016. UPEC O25:H4-ST131 se ha distribuido a nivel mundial y en el 2013 Johnson JR *et al.*, se reporta la subclona H30Rx asociada con la producción de CTX-M15 y resistencia a las combinaciones de Penicilinas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, quinolonas y a los aminoglucósidos (tobramicina y amikacina). Lo que lo convierte en uno de los denominados “clones de alto riesgo” de importancia en salud pública. Cabe mencionar que en México no

se realizan estudios tan especializados para detectar este tipo de clonas, además no se realizan los estudios serológicos para efectuar la correlación con la producción de BLEE y tener un mejor análisis de la situación epidemiología del país.

Al complementar el estudio con el análisis filogenético se encontró que, la mayoría de estas cepas pertenecen al filogrupo **A** y **B2**. En contraste con lo reportado en España 54% de los aislados pertenecían al filogrupo B2 y el 23% al B1. El grupo A se ha considerado clásicamente un filogrupo no virulento, cuyas cepas son en su mayoría comensales. Diversos estudios han postulado que el tracto intestinal actúa como reservorio de cepas con potencial uropatógeno por lo que aislados de filogrupos comensales se encontrarían con cierta frecuencia causando IVU.<sup>13</sup>

La identificación de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos, en los que el principal mecanismo implicado en la resistencia es la producción de  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y asociados principalmente a elementos genéticos transferibles ha tomado gran relevancia debido a que son parte del listado de patógenos prioritarios que emitido por la OMS en el 2015. Este trabajo mostró la presencia de perfiles hidrolíticos específicos para este tipo de enzimas, la expresión de un fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa, generalmente ilustrado por la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y a alguno de los carbapenémicos utilizados en las pruebas de rutina. En México este tipo de estudios cobran mayor relevancia porque contribuyen la prevención como medio para contrarrestar el impacto tanto epidemiológico como económico de la resistencia bacteriana y su modo de transmisión. Sin embargo; es importante reiterar que los resultados descritos en este trabajo reflejan solamente la realidad de nuestra población estudiada; es necesario validar estos resultados mediante estudios epidemiológicos más extensos, incluyendo la susceptibilidad que presentan otras enterobacterias causantes de IVU contra los antimicrobianos disponibles en la zona. Con el objetivo de implementar estrategias de control enfocadas a detener la propagación de estas cepas, es necesario el conocimiento más a fondo de su epidemiología que pudiera demostrar la diseminación clonal de los aislamientos de *E. coli* en el ambiente hospitalario.

## 6. Conclusiones

- El ensayo de sensibilidad a los antimicrobianos mostró que 88% de los aislados de *E.coli* de pacientes con ICVU se incluyen en el grupo MDR y se observa altas tasas de resistencia principalmente a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y sulfas.
- Con base en el análisis retrospectivo se logró establecer una prevalencia del 33% de cepas UPEC productoras de BLEE aislados de 20 pacientes con IVU's crónica en el 2018.
- No se encontró prevalencia de algún serogrupo en las diferentes cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas.
- Las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se agruparon preferencialmente en los filogrupos A y B2.
- CTX-M-15 y TEM son la enzima detectada con mayor frecuencia entre los aislados de *E. coli* BLEE causantes de ICVU.
- Un 38 % de las cepas productoras de BLEE presentaron combinaciones de genes.
- Se identificaron perfiles de resistencia propios para cada una de las variantes de BLEE y Carbapenemasas en este estudio, lo que establece un punto de corte para la rápida identificación de este tipo de aislados al menos en esta población.



## 7. Referencias

1. Alós JI. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23
2. Ambler R.P., The structure of beta-lactamases, *Philos.Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 289 (1980) 321–331.
3. American Society for Microbiology. Capítulos de antimicrobianos. En: Mandel, Douglas, Bennet, editors. *Principles and Practice of Infectious diseases.* WB Saunders; 2000 Philadelphia.
4. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. 2007. Evaluación de métodos para identificar la *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase en *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 45 : 2723–2725. doi: 10.1128 / JCM.00015-07.
5. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol.* 2010 Sep 1;48(9):34556.
6. Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D, Piddock L. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13:42-51.
7. Belmont-Monroy, Ribas-Aparicio, Navarro-Ocaña, Manjarrez-Hernández, Gavilanes-Parra, Gerardo Aparicio-Ozores, Cauich-Sánchez, Garza-Ramos, José Molina-López, Characterization of *Escherichia coli* causing community acquired urinary tract infections in Mexico City, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 87, Issue 2, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.006>.
8. Bonkat G , Pickard R , Bartoletti R , Bruyère F , Cai T , Geerlings SE , et al. Directrices sobre infecciones urológicas . EAU. 2017.
9. Bradford P. B-Lactamasas de espectro extendido en el siglo XXI: caracterización, epidemiología y detección de esta importante amenaza de resistencia, *Clinical Microbiology Reviews*, octubre de 2001, 14 (4) 933-951; **DOI:**10.1128 / CMR.14.4.933-951.2001
10. Bush K, Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76. doi: 10.1128/ AAC.01009-09.
11. Castro Alarcón N, Salgado González J F, Ocampo Sarabia R L, Silva Sánchez J, Ruiz Rosas María. Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. *Tlamati* 2014; 5 (1): 14-23.
12. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2017-M100-S27.pdf>.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of

- drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Sep;66(9):2011–21.
14. Colpan A, Johnston B, Porter S, Clabots C, Anway R, Thao L, et al. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clin Infect Dis.* 2013 Nov;57(9):1256–65.
  15. Croxen, M., Finlay, B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8, 26–38 (2010) doi:10.1038/nrmicro2265
  16. Cuzon G. ,et al. 2010 . Diversidad Worldwide de *Klebsiella pneumoniae* que producen  $\beta$ -lactamasa bla KPC-2gen . *Emerg. Infectar. Dis.* 16 : 1349 - 1356
  17. Dalet F, Del Río G. *Infecciones Urinarias*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 1997. p.13-29
  18. Duplessis CWT. Uropathogenic *Escherichia coli*. *The Female Patient.* 2011
  19. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284. doi:10.1038/nrmicro3432
  20. Gal-Mor O, Finlay BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol.* 2006 Nov;8(11):1707–19.
  21. Galindo-méndez, M., 2017. Caracterización molecular y patrón de susceptibilidad antimicrobiana de. *Revista Chilena de Infectología* 35, 29–35.
  22. García Castellanos, Tersilia, Castillo Marshal, Arianna, & Salazar Rodríguez, Daniel. (2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(1), 129-135. Recuperado en 25 de junio de 2019, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662014000100013&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662014000100013&lng=es&tlng=es).
  23. García de Lomas J, Navarro D. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. En (García Rodríguez Ed) *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona- Prous Science. 2ª Edición 2006: 13-23.
  24. García Sánchez JE, Fresnadillo Martínez MJ, Arce Arce JJ, García Sánchez E. Antibióticos betalactámicos. In: García Sánchez JE, López R, Prieto J, editores. *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona. 1a ed. Prous Science; 1999. p. 213–49.
  25. García Seral C Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ, Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*, Vol. 28. Núm. S1. Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2008,páginas 12-18 (Enero 2010) doi: 10.1016/S0213-005X(10)70003-3
  26. Guinzberg Lifshitz Alberto, Manejo Antibacteriano de Procesos infecciosos en el Paciente Adulto (MAPP) Documento de consenso de Actualización, Avalado por la Academia Nacional de Medicina de México,2010.
  27. Gupta K, Hooton T M, Naber K G, Wullt B, Colgan R, Miller L G, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 2011; 52 (5): 103-20.

28. Hooper D. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluorquinolones. *Clin Infect Dis.* 2001;32 (Suppl 1): 9-15.
29. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud. BLUE CARBA - Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo. Buenos Aires: INEI, ANLIS; 2014.0
30. Jacoby, GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:161-82
31. Karki T, Truusalu K, Vainumäe I, Mikelsaar M (2001) Patrones de susceptibilidad a antibióticos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* adquiridos en la comunidad y el hospital en Estonia, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 33: 5, 333-338, DOI: 10.1080 / 003655401750173904
32. Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140 (2004) doi:10.1038/nrmicro818
33. Kiiru, J., Butaye, P., Goddeeris, B.M. et al. Analysis for prevalence and physical linkages amongst integrons, ISEcp1, ISCR1, Tn21 and Tn7 encountered in *Escherichia coli* strains from hospitalized and non-hospitalized patients in Kenya during a 19-year period (1992–2011). *BMC Microbiol* 13, 109 (2013) doi:10.1186/1471-2180-13-109
34. King D, Sobhanifar S, Strynadka N. The Mechanisms of Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. In: Gotte M, Berghuis A, Matlashewski G, Wainberg M, Sheppard D, editores. *Handbook of Antimicrobial Resistance*. New York: Springer Science; 2017. p. 177
35. Kropp H, Gerckens L, Sundelof JG, Kahan FM. Actividad antibacteriana de imipenem: el primer antibiótico de tienamicina *Rev. Infect. Dis.*, 7 (Suppl. 3) (1985), pp. S389 - S410
36. Lagunas-Rangel, F.A., 2018. Antimicrobial susceptibility profiles of bacteria causing urinary tract infections in Mexico: Single-centre experience with 10 years of results. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 14, 90–94. doi:10.1016/j.jgar.2018.03.004
37. Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Med Mal Infect.* 2014Sep 15;44(9):400–4.
38. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH.. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:88-91.
39. Livermore DM. Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:3-10.
40. Lombardo-Aburto E. Abordaje pediátrico de las infecciones de vías urinarias. *Acta Pediatr Mex.* 2018;39(1):85-90.
41. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
42. Malbrán C, Test de Hodge Modificado: Protocolo Servicio Antimicrobianos, INEI-ANLIS, Adaptación F. Pasterán y cols. *Journal clinical microbiology.* 2016 Mar; 54 (3): 640-9.

43. Mejía P., (2019). Filogenia de cepas uropatógenas de *Escherichia coli* (UPEC) aisladas de pacientes con infección crónica del tracto urinario (ICTU) y su asociación con genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos. (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
44. Mensa J, Gatell JM, Azanza JR, Domínguez-Gil A, García JE, Jiménez de Anta MT, et al. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2007. 17.a ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2007.
45. Morfin-Otero R, Mendoza-Olazarán S, Silva Sánchez J, Rodríguez-Noriega E, Laca-Díaz J, Tinoco-Carrillo P, et al. Characterization of Enterobacteriaceae isolates obtained from tertiary care hospital in Mexico, which produces extended spectrum  $\beta$ -lactamase. *Microb Drug Resist* 2013; 19 (5): 378-83.
46. Morrojon García M. Carbapenemasas, una amenaza actual. *Rev Cub Med Int Emerg* 2012;11(4):2613-18.
47. Munkhdelge Y, Gunregja N, Dorjpurev A et al. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *J infect Dev Ctries.* 2017;66:577-583.
48. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:225–34.
49. Navarro-Navarro M, Robles-Zepeda R E, Garibay-Escobar A, Ruiz-Bustos E. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de  $\beta$ -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Salud Publica Mex* 2011; 53 (4): 341-4.
50. Neu HC. Los antibióticos betalactámicos desde 1960 a 1993. *Infect Dis Clin Pract.* Edición Española. 1993; 1(2): 85-95
51. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9:228-36.
52. OMS. ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos?. 2018. Consultado:23 Sep 2019; Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/75/es/>
53. Oteo J, Alos JI. ¿Qué hay de nuevo en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:28–33
54. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos. *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido: epidemiología cambiante e impacto clínico. *Curr Opin Infect Dis.* 2010; 23 (4): 320 - 10.1097
55. Ørskov F, Ørskov I, 2 Serotipado de *Escherichia coli*, *Methods in Microbiology*, ISSN: 0580-9517, Vol: 14, Issue: C, 1984, Página: 43-112.
56. Palzkill Timothy, Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC  $\beta$ -lactamasas, *Frontiers in Molecular Biosciences*, Vol.5, pag. 16, 2018.
57. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Bautista A, Reyes R, Vicente A, Vaca-Paniagua F, Estela Díaz C , Stephanía Martínez, Pablo Domínguez, Luis Rey García, Alina Uribe-García y Sergio Vaca (2018) Múltiple Resistencias antibióticas y marcadores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena de México, *Pathogens and Global Health*, 112: 8, 415-420, DOI: 10.1080 / 20477724.2018.1547542

58. Paterson DL. "Resistance in Gram-negative bacteria:Enterobacteriaceae". Am J Med 2006; 119: 520-528
59. Phillips I, Eykyn S, King A, Gransden WR, Rowe B, Frost JA, Gross RJ (1988) Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth Health District. Lancet 1: 1038-1041
60. Pujol M. Trends in antimicrobial consumption in 12 Spanish hospitals. In: Postgraduate Education Course ESCMID 17–19 abril 2008, Barcelona, Spain. 2008.
61. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 40-58.
62. Rocha-Gracia R, Ruiz E, Romero Romero S, Lozano-Zarain P, Somalo S, Palacios-Hernández JM, et al. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant qepA1 in a CTX-M-15- producing *Escherichia coli* strain from México. Antimicrob Chemother 2010; 65: 169-77.
63. Rodríguez-Angeles, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México,2002, 44(5), 464-475.
64. Ruppé, É., Woerther, PL. & Barbier, F. Ann. Intensive Care (2015) 5: 21. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
65. Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2011. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
66. Schill, F., Abdulmawjood, A., Klein, G., and Reich, F. (2017). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase producing enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. Int. J. Food Microbiol. 257, 58–66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.010
67. Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información 2019; 34 (1): 3-62. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/182221/sem01.pdf> (Accedido el 4 de octubre de 2019).
68. Seiffert, S. N., Hilty, M., Perreten, V., and Endimiani, A. (2013). Extended- spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? Drug Resist. Updat. 16, 22–45. doi: 10.1016/j.drug.2012.12.001
69. Shortliffe LM, McCue JD. Urinary tract infection at the age extremes: pediatrics and geriatrics. Am J Med.2002;113(Suppl 1A):55S-66S.
70. Suárez C, Gudíol F. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Vol. 27. Núm. 2: 116–129 2009.
71. Travis JWiles,RR. Ooridins and virulence mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology. Elsevier Inc,11-19. 2008.
72. Tooke CL. †Hinchliffe P†, Bragginton CE,Colenso CK, Takebayashi HY, Spencer J, β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century, Rev. Journal of Molecular BiologyVol.431,Numero 18, pag,3472-3500. 2019.<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
73. Wright AJ. The penicillins. Mayo Clin Proc. 1999;74:290–307.

74. Yigit, H., Queenen, A. M., Anderson, G. J., Domenech -Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward C. D., et al. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 1151-1161. Doi: 10.1128/aac.45.4.1151-1161.2001.
75. Yu W.L, Cheng K.C, Chi C.J., Chen H.E, Chuang Y.C, Wu L.T. Characterisation and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolated from a district teaching hospital in Taiwan. *Clin Microbiol Infect*, 12 (2006), pp. 579-582  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01384.x>