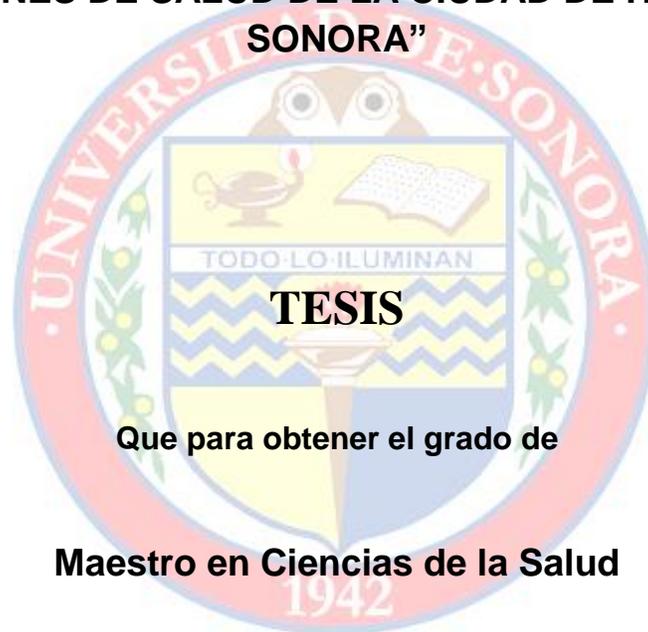


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS  
DE *Escherichia coli* Y *Klebsiella pneumoniae* PRODUCTORAS DE  
BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO, EN  
INSTITUCIONES DE SALUD DE LA CIUDAD DE HERMOSILLO,  
SONORA”**



**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias de la Salud**

Presenta

**Viridiana Rossell Gallegos Miranda**

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2017

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a mis padres, Blanca y José, por su paciencia, consejos y enseñanzas a lo largo de mi vida. A mis hermanas, Miriam y Mayra, por estar siempre ahí apoyándome y animándome. Gracias por su tolerancia hacia mí en esta etapa, los quiero.

A mi director de tesis, Dr. Enrique Bolado, por confiar en mí, darme una oportunidad y siempre un poco de su tiempo. Desde que estaba en séptimo semestre de licenciatura decidí que quería, en algún punto, realizar un proyecto con usted, pero también quería trabajar con microbiología y resistencia a antibióticos. Para mí esto fue justo lo que quería y agradezco mucho el haber sido parte de este proyecto.

Al resto del comité, M. en C. Lucía Castellón, M. en C. Moisés Navarro y Dr. Alfonso García. Por sus constantes y justas observaciones, recomendaciones y preguntas en cada uno de los seminarios, que me hicieron ver que no basta con recitar la información, sino razonarla.

A mis amigos, Angela, Carlos (Charly), Elda, Elihú, Francisco (Pancho), Gustavo, Herminio, Kathia, Mauricio, Miguel, Orlando y su hermana Ana y Víctor, por seguir conmigo a pesar de saber cómo soy, por soportar mis múltiples quejas y por cada palabra de aliento para que yo continuara con esto. Si omití a alguien y sienten que en algún punto hicieron algo por mí, no tengan duda de que lo agradezco.

De las cosas buenas que obtuve durante el posgrado, son las personas que conocí en él, especialmente Anna, Marcia, Ale López, Martín, Jaque y Bere. Ustedes hicieron este camino más llevadero.

Finalmente (y aunque no lo leerán) agradezco a las personas del Instituto Nacional de Salud Pública y al Dr. Jesús Silva por haberme recibido en el L2PA,

en especial a Alejandro Sánchez por todos esos momentos en que me animó a seguir adelante cuando creía ya no poder.

*“Una lección sin dolor no tiene sentido, eso es porque no puedes obtener algo sin sacrificar algo a cambio.”*

## ÍNDICE

| <b>Contenido</b>                         | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Lista de Tablas.....                     | X             |
| Lista de Figuras.....                    | xiii          |
| OBJETIVOS.....                           | xv            |
| Objetivo General.....                    | xv            |
| Objetivos Particulares.....              | xv            |
| RESUMEN.....                             | xvi           |
| INTRODUCCIÓN.....                        | 1             |
| ANTECEDENTES.....                        | 5             |
| Antibióticos.....                        | 5             |
| Antibióticos Beta-lactámicos.....        | 5             |
| Uso de los Beta-lactámicos.....          | 6             |
| Susceptibilidad a los Antibióticos.....  | 7             |
| Categorías Interpretativas.....          | 7             |
| Sensible.....                            | 7             |
| Intermedio.....                          | 7             |
| Resistente.....                          | 8             |
| Resistencia a los Antibióticos.....      | 8             |
| Causas de Resistencia.....               | 9             |
| Plásmidos.....                           | 9             |
| Transposones.....                        | 9             |
| Integriones.....                         | 9             |
| Adquisición de Genes de Resistencia..... | 10            |
| Conjugación.....                         | 10            |
| Transformación.....                      | 10            |

| <b>Contenido</b>                                       | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Transducción.....                                      | 11            |
| Transducción generalizada.....                         | 11            |
| Transducción especializada.....                        | 11            |
| Mecanismos de Resistencia.....                         | 12            |
| Prevención de acceso al sitio blanco.....              | 12            |
| Reducción de permeabilidad .....                       | 12            |
| Bombas de eflujo.....                                  | 14            |
| Modificación del sitio blanco del antibiótico.....     | 14            |
| Cambios en el blanco del antibiótico por mutación..... | 14            |
| Modificación y protección del blanco.....              | 14            |
| Modificación del antibiótico.....                      | 15            |
| Inactivación por hidrólisis.....                       | 15            |
| Inactivación por transferencia de grupo químico.....   | 15            |
| Resistencia a los Antibióticos Beta-lactámicos.....    | 15            |
| Clasificación de las Beta-lactamasas.....              | 16            |
| Clasificación Molecular de Ambler.....                 | 16            |
| Clasificación Funcional de Bush-Jacoby.....            | 16            |
| Grupo 1.....   | 17            |
| Grupo 2.....   | 17            |
| Subgrupo 2a.....                                       | 17            |
| Subgrupo 2b.....                                       | 17            |
| Subgrupo 2be.....                                      | 17            |
| Subgrupo 2br.....                                      | 17            |
| Subgrupo 2ber.....                                     | 18            |
| Subgrupo 2c.....                                       | 18            |
| Subgrupo 2ce.....                                      | 18            |

| <b>Contenido</b>                                     | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Subgrupo 2d.....                                     | 18            |
| Subgrupo 2de.....                                    | 18            |
| Subgrupo 2df.....                                    | 18            |
| Subgrupo 2e.....                                     | 18            |
| Subgrupo 2f.....                                     | 19            |
| Grupo 3.....   | 19            |
| Beta-lactamasas de Espectro Extendido.....           | 19            |
| Principales Microorganismos Productores de BLEE..... | 19            |
| Principales Tipos de BLEE.....                       | 20            |
| TEM.....   | 21            |
| SHV.....   | 21            |
| CTX-M.....   | 22            |
| Otras BLEE.....                                      | 24            |
| Multirresistencia asociada a BLEE.....               | 25            |
| Identificación de BLEE.....                          | 25            |
| Identificación Fenotípica.....                       | 26            |
| Prueba de combinación de discos.....                 | 26            |
| Técnica de doble difusión con discos.....            | 26            |
| Tiras E-test.....                                    | 27            |
| Identificación Genotípica.....                       | 28            |
| PCR.....   | 28            |
| Secuenciación de nucleótidos.....                    | 28            |
| Electroforesis de campo pulsado.....                 | 30            |
| Perfiles de plásmidos y conjugación.....             | 31            |
| Filogrupos.....                                      | 31            |

| <b>Contenido</b>   | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Tratamiento de Infecciones Causadas por Bacterias Productoras de BLEE..... | 32            |
| Cefamicinas.....   | 34            |
| Carbapenémicos.....  | 34            |
| Inhibidores de Beta-lactamasas.....  | 34            |
| Tigeciclina.....   | 35            |
| Eravaciclina.....  | 35            |
| Polimixinas.....   | 35            |
| Fosfomicina.....   | 36            |
| Prevenición de Infecciones por Bacterias Productoras de BLEE.....          | 36            |
| Programas de Vigilancia Epidemiológica.....                                | 37            |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>39</b>     |
| Instituciones Participantes.....   | 39            |
| Criterios de Inclusión.....  | 40            |
| Criterios de Exclusión.....  | 40            |
| Criterios de Eliminación.....  | 40            |
| Obtención de Aislamientos e Informes.....                                  | 40            |
| Extracción de ADN.....   | 41            |
| Identificación Preliminar del Tipo de BLEE Mediante PCR.....               | 41            |
| Identificación de PMQR.....  | 44            |
| Filogrupos.....  | 46            |
| Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) .....                               | 46            |
| Conjugación y Aislamiento de Plásmidos.....                                | 48            |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>49</b>     |
| Descripción de Aislamientos.....   | 49            |
| Aislamientos Productores de BLEE.....                                      | 49            |

| <b>Contenido</b>                            | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Muestras Clínicas.....                      | 52            |
| Susceptibilidad a los Antibióticos.....     | 52            |
| Tipos de BLEE Identificados.....            | 60            |
| Identificación de PMQR.....                 | 64            |
| Filogrupos.....                             | 69            |
| Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)..... | 73            |
| Conjugación y Aislamiento de Plásmidos..... | 77            |
| CONCLUSIONES.....                           | 81            |
| BIBLIOGRAFÍA.....                           | 83            |

## LISTA DE TABLAS

| Tabla |   | Página |
|-------|---|--------|
| I     | Grupos de enzimas CTX-M y principales subclasificaciones.   | 23     |
| II    | Iniciadores utilizados para la detección de los genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> y <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> .   | 42     |
| III   | Iniciadores utilizados para la detección de genes PMQR.   | 45     |
| IV    | Iniciadores utilizados para la clasificación por filogrupos de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> identificados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016. | 47     |
| V     | Aislamientos de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> identificados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.  | 50     |
| VI    | Identificación preliminar del tipo de BLEE de 207 aislamientos productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.                     | 61     |
| VII   | Presencia de uno o más genes codificantes para beta-lactamasa en 207 aislamientos de cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.   | 61     |
| VIII  | Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en 26 aislamientos de <i>E. coli</i> productores de BLEE, de origen  | 65     |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
|             | comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, 15 febrero – 15 agosto, 2016.   |    |
| <b>IX</b>   | Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en 10 aislamientos de <i>E. coli</i> productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, 15 febrero – 15 agosto, 2016.         | 66 |
| <b>X</b>    | Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en seis aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de BLEE, de origen comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, febrero 15 – agosto 15, 2016.  | 66 |
| <b>XI</b>   | Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en tres aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, 15 febrero – 15 agosto, 2016. | 67 |
| <b>XII</b>  | Filogrupos de aislamientos de <i>E. coli</i> productores de BLEE, de origen comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.   | 70 |
| <b>XIII</b> | Filogrupos de aislamientos de <i>E. coli</i> productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el   | 71 |

periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

|            |  |    |
|------------|--|----|
| <b>XIV</b> | Resistencia a los antibióticos de aislamientos productores de BLEE transconjugantes. | 79 |
|------------|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| 1             | Mecanismos de resistencia a antibióticos debido a plásmidos en bacterias Gram negativas.  | 13            |
| 2             | Muestras clínicas de las que se recuperaron aislamientos de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> productoras de BLEE de origen comunitario en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.  | 53            |
| 3             | Muestras clínicas de las que se recuperaron aislamientos de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> productoras de BLEE de origen hospitalario en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016. | 54            |
| 4             | Porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos de 207 aislamientos productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.                                       | 56            |
| 5             | Porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos de 169 aislamientos productores de BLEE, de origen comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.                | 57            |
| 6             | Porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos de 38 aislamientos productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad   | 58            |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
|           | de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016   |    |
| <b>7</b>  | Frecuencia de las distintas combinaciones de beta-lactamasas encontradas en 207 aislamientos productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016. | 63 |
| <b>8</b>  | Dendrograma de patrones de PFGE de aislamientos comunitarios de <i>E. coli</i> productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, 15 febrero-15 de agosto, 2016.   | 74 |
| <b>9</b>  | Dendrograma de patrones de PFGE de aislamientos hospitalarios de <i>E. coli</i> productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, 15 febrero-15 de agosto, 2016.  | 75 |
| <b>10</b> | Dendrograma de patrones de PFGE de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, 15 febrero-15 de agosto, 2016.  | 76 |
| <b>11</b> | Gráfico y ecuación para determinar el tamaño de plásmidos en aislamientos productores de BLEE transconjugantes.   | 78 |

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Caracterizar genotípicamente aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora.

### Objetivos Particulares

1. Identificar los principales tipos de beta-lactamasas de espectro extendido presentes en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* recuperadas de cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 de febrero y el 15 de agosto de 2016.
2. Analizar los perfiles de resistencia a los antibióticos de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido.
3. Caracterizar genotípicamente aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido.
4. Identificar los servicios hospitalarios y muestras clínicas con mayor prevalencia de aislamientos positivos a beta-lactamasas de espectro extendido.

## RESUMEN

En los últimos años, el mundo ha enfrentado un problema de resistencia bacteriana a los antibióticos, principalmente a beta-lactámicos. Las bacterias Gram negativas poseen un mecanismo para hidrolizar a estos antibióticos mediante la producción de enzimas beta-lactamasas, dentro de las cuales destacan las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). La prevalencia de BLEE varía entre países, lamentablemente, México no cuenta con muchos estudios al respecto. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genóticamente aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE en cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora. Durante el periodo comprendido entre el 15 de febrero y 15 de agosto de 2016, se recolectaron 207 aislamientos productores de BLEE en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora. Los laboratorios clínicos de las instituciones participantes brindaron la información de los aislamientos, la cual incluyó el origen de la bacteria identificada, así como los resultados de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Los microorganismos se transportaron a la Universidad de Sonora, donde se corroboró morfología colonial, pureza y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se procedió a la extracción de ADN. Mediante técnicas de PCR se buscó la presencia de los genes específicos para las BLEE más frecuentemente reportadas en América. Para posteriores experimentos, se eligió una submuestra de los aislamientos en base a la institución de procedencia, microorganismo, consulta (externa u hospitalaria), perfil de resistencia a antibióticos y tipo de BLEE encontrado. Se eligieron 45 aislamientos: 36 de *E. coli* y nueve de *K. pneumoniae*, a los cuales se les realizó electroforesis de campo pulsado, así como la búsqueda de genes relacionados con disminución de susceptibilidad a quinolonas. Se definieron los

filogrupos para los 36 aislamientos de *E. coli* y se realizó conjugación de plásmidos a ocho aislamientos que co-expresaron tres genes codificantes para beta-lactamasas. En los 207 aislamientos obtenidos, se encontró una alta prevalencia de resistencia a antibióticos beta-lactámicos (>97%), así como para ciprofloxacino (88%), trimetoprim/sulfametoxazol (72%) y los aminoglucósidos gentamicina y tobramicina (58% y 59%, respectivamente). El tipo de BLEE más comúnmente encontrado fue CTX-M-1 (88%); el 29% de los aislamientos presentaron más de un gen para beta-lactamasas. En la submuestra de aislamientos, se encontraron varios genes relacionados a distintos mecanismos de disminución de susceptibilidad a quinolonas y una alta prevalencia de filogrupos B2 y D, considerados como cepas virulentas de *E. coli*. El análisis de patrones de electroforesis de campo pulsado reveló que, en la submuestra de aislamientos, no se encontraron cepas idénticas, lo que supone buenas prácticas hospitalarias en cuanto al manejo de pacientes. Tres de los ocho aislamientos en los que se realizó conjugación, lograron transferir su plásmido a una bacteria receptora. Dicho plásmido contenía genes de resistencia a otros grupos de antibióticos, además de beta-lactámicos. Los hallazgos del presente trabajo muestran la presencia de distintas BLEE y altas prevalencias de genes de resistencia a otros grupos de antibióticos, resaltando la importancia de la vigilancia y caracterización genotípica.



## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública mundial que se encuentra en constante evolución debido al surgimiento de nuevos mecanismos de resistencia. Algunos de estos mecanismos se dieron mediante cambios genéticos en ciertos microorganismos como una forma de defensa para sobrevivir, pero la introducción y el constante uso inadecuado de antibióticos ha llevado a una acelerada adaptación de las bacterias para subsistir a ellos (Rodríguez-Noriega y col., 2014; World Health Organization, 2016).

Uno de los principales usos inadecuados de los antibióticos y que ha contribuido notablemente en la selección de bacterias resistentes, es la promoción del crecimiento en animales de granja. Estos son alimentados en conjunto con antibióticos en concentraciones sub-terapéuticas (beta-lactámicos, macrólidos, sulfonamidas, trimetoprim, fluoroquinolonas o tetraciclinas) para evitar infecciones, mejorar la absorción de nutrientes y la salud de los animales para así producir un mayor rendimiento y un producto de mejor calidad. Sin embargo, la concentración insuficiente del antibiótico elimina o reprime a las bacterias susceptibles, permitiendo que las bacterias resistentes prosperen, las cuales son transmitidas a través del producto y capaces de producir infección en humanos (Butaye y col., 2003; Massé y col., 2014; Ventola, 2015).

La incorrecta prescripción de antibióticos para infecciones de origen viral, fúngico o parasitario también contribuye a la promoción de bacterias resistentes. El uso prudente para la prescripción de antibióticos considera la identificación de la bacteria patógena y su patrón de susceptibilidad a los diferentes antibióticos, mientras que por parte del paciente debe haber una adherencia al tratamiento en forma estricta en cuanto a dosis, horario y duración (Silva-Sánchez, 2006).

Los antibióticos beta-lactámicos son extensamente utilizados para tratar desde infecciones comunes hasta aquellas que son graves y presentan un riesgo para la vida del paciente. Así mismo, son empleados como tratamiento profiláctico previo a una cirugía. Sin embargo, en los últimos años, la eficacia de los antibióticos beta-lactámicos ha disminuido debido a la resistencia que presentan microorganismos hacia estos antibióticos (Garza-Ramos y col., 2009).

Entre los mecanismos de resistencia a antibióticos, uno de los más destacados es el de las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Su surgimiento se debió en gran parte a que, durante la década de los ochentas, se hizo uso excesivo de cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam. Este patrón de resistencia se encuentra altamente asociado a fallas terapéuticas, lo que lleva a una disminución de la erradicación bacteriológica e incrementa los costos de tratamiento, morbilidad y mortalidad (García-Vázquez y col., 2011).

Entre las principales causas de mortalidad en pacientes hospitalizados se encuentran las infecciones asociadas a la atención a la salud, las cuales se definen como aquellas que ocurren en las 72 horas posteriores al ingreso hospitalario, tres días después del alta o en los 30 días siguientes de una cirugía. Comúnmente, el transporte transitorio del organismo a manos de los trabajadores de la salud está implicado en la propagación de paciente a paciente. La contaminación del entorno hospitalario, como lavabos, baños o equipo médico, se ha reportado como fuente de infección (Dhillon y Clark, 2012; Poorabbas y col., 2015).

En estudios alrededor del mundo se han identificado, mediante análisis multivariados, varios factores de riesgo para adquirir una infección nosocomial por enterobacterias productoras de BLEE. Estos son el uso previo de antibióticos (específicamente quinolonas, cefalosporinas, piperacilina/tazobactam o beta-lactámicos con grupo oximino), infecciones

recurrentes, hemodiálisis, uso de sonda Foley, nutrición artificial y residencia en asilos (Guzmán-Blanco y col., 2014).

Por un largo tiempo, las infecciones por organismos Gram negativos farmacorresistentes han sido relacionadas a instituciones de cuidado a la salud. Sin embargo, el surgimiento de infecciones comunitarias causadas por organismos productores de BLEE se comenzó a reportar en múltiples países desde mediados del año 2000. La potencial dispersión de microorganismos productores de BLEE en la comunidad es un problema de salud público al igual que un reto para el manejo de infecciones comunitarias, las cuales son tratadas empíricamente con cefalosporinas orales o fluoroquinolonas sin realizarse previamente una detección del microorganismo o pruebas de susceptibilidad a los antibióticos (Doi y col., 2013) Entre los factores de riesgo para adquirir una infección comunitaria por microorganismos productores de BLEE se encuentra infecciones en tracto urinario recurrentes, uso previo de antibióticos, diabetes mellitus, instrumentación previa en el tracto urinario, sexo femenino y edad mayor a los 65 años (Dhillon y Clark, 2012).

La prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos difiere entre países, aumentando incluso en aquellos lugares en donde se aplican estrictos controles para el uso de antibióticos y donde la farmacorresistencia es poco común. Usualmente, los viajeros importan bacterias resistentes a antibióticos a países con menores prevalencias. La información epidemiológica nacional y global es de gran importancia debido a que brinda formas de detectar el surgimiento de clonas bacterianas o nuevos mecanismos de resistencia. Una perspectiva más amplia sobre el panorama de resistencia bacteriana le da al personal de salud el conocimiento para tratar a pacientes provenientes de otra parte del país o del mundo (Brolund, 2014; Iredell y col., 2015).

Las técnicas moleculares tienen el potencial para jugar un rol importante en el laboratorio para el tamizaje, seguimiento y monitoreo de un gran número

de aislamientos productores de BLEE, tanto en la comunidad como en hospitales. No solo la vigilancia epidemiológica es necesaria, sino también el cambio urgente en la forma de prescribir y utilizar los antibióticos. Aunque se desarrollen nuevos medicamentos, si no se modifican los comportamientos actuales, la resistencia a los antibióticos seguirá representando una grave amenaza (Shaikh y col., 2015).

## **ANTECEDENTES**

### **Antibióticos**

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas, disminuyendo el número de microorganismos viables. Su categoría contiene muchos grupos diferentes de fármacos que difieren en espectro de acción, perfiles de efectos adversos, farmacocinética, farmacodinamia y utilidad clínica (World Health Organization, 2016).

Entre los distintos grupos de antibióticos se encuentran los aminoglucósidos, beta-lactámicos, glicopéptidos, lincosamidas, macrólidos, nitrofuranos, nitroimidazoles, polimixinas, polipéptidos, quinolonas, sulfamidas, tetraciclinas, entre otros. De acuerdo con la interacción fármaco-microorganismo, los antibióticos pueden dividirse en bactericidas y bacteriostáticos. En los primeros, la acción es letal, llevando a la lisis bacteriana, mientras que en los fármacos bacteriostáticos no hay destrucción de las células, sino que las concentraciones alcanzadas en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, permitiendo que el sistema inmunológico logre combatir la infección (Gallagher y MacDougall, 2014; Seija y Vignoli, 2006; World Health Organization, 2016).

### **Antibióticos Beta-lactámicos**

Los antibióticos beta-lactámicos son un grupo ampliamente utilizado, tanto a nivel hospitalario como comunitario, para tratar infecciones causadas por bacterias Gram positivas o Gram negativas. Esta clase de antibióticos se encuentra compuesta por penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos y carbapenémicos. (Guillén y col., 2016; Iredell y col., 2015).

Los beta-lactámicos son compuestos de acción bactericida lenta, que interrumpen la formación de la pared celular como resultado de su unión covalente a las proteínas de unión a penicilina (PBPs por sus siglas en inglés correspondientes a *penicillin-binding proteins*), las cuales son enzimas esenciales que se encuentran involucradas en los pasos terminales del entrecruzamiento del peptidoglicano, tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas (Bush y Bradford, 2016; Seija y Vignoli, 2006).

Otros grupos de antibióticos pueden presentar efectos secundarios como ototoxicidad, nefrotoxicidad, daño a sistema nervioso, entre otros; o limitaciones respecto a los pacientes a los que se les puede administrar, al no poderse prescribir a mujeres embarazadas o infantes, ya que algunos antibióticos, como las tetraciclinas, se depositan en huesos o dientes en desarrollo. Los beta-lactámicos son bien tolerados y eficaces. Su mayor toxicidad está relacionada con una respuesta alérgica en un pequeño porcentaje de pacientes que reaccionan a los determinantes relacionados a la cadena lateral; usualmente estas reacciones son más comunes en el uso de penicilinas y cefalosporinas, con una reactividad mínima causada por monobactámicos (Bush y Bradford, 2016).

### **Uso de los Beta-lactámicos**

Los beta-lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. En Estados Unidos, durante los años 2004 al 2014, el 65.24% de los antibióticos inyectables prescritos, correspondían a beta-lactámicos. Estos antibióticos se suelen utilizar como primera opción de tratamiento cuando se trata de infecciones en piel y tejidos blandos, infecciones de vías respiratorias, endocarditis bacteriana, infecciones del sistema nervioso central, infecciones intraabdominales, urinarias y osteoarticulares (Bush y Bradford, 2016; Seija y Vignoli, 2006).

## Susceptibilidad a los Antibióticos

Usualmente la susceptibilidad de un organismo específico a un antibiótico se determina mediante la concentración mínima inhibitoria, comúnmente abreviada como MIC (debido a las siglas en inglés de *minimum inhibitory concentration*). Para ello se cultiva el microorganismo con distintas concentraciones del fármaco. La combinación con la concentración más baja de antibiótico, donde no se observa crecimiento del microorganismo, se conoce como MIC. Para cada microorganismo y antibiótico existe una MIC particular que define su susceptibilidad, la cual es llamada punto de corte. Ya que los puntos de corte están basados en varios datos farmacológicos y clínicos usando técnicas *in vitro* e *in vivo*, se consideran como fuertes predictores de posibles resultados clínicos. Los valores de MIC obtenidos de una prueba de susceptibilidad pueden ser interpretados mediante sus puntos de corte (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017; Gallagher y MacDougall, 2014).

### Categorías Interpretativas

Las categorías son derivadas de características microbiológicas, parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos y datos de resultados clínicos, si se cuenta con ellos.

**Sensible.** Esta categoría está definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una MIC igual o menor al punto de corte susceptible son inhibidos por la concentración usualmente lograda del agente antimicrobiano cuando se utiliza la dosis recomendada para tratar el sitio de infección, resultando en una probable eficacia clínica.

**Intermedio.** Categoría definida por un punto de corte que incluye aislamientos con MICs dentro del intervalo intermedio, que se aproximan

a los niveles sanguíneos y tisulares normalmente alcanzables y para los cuales las tasas de respuesta pueden ser inferiores a las de los aislados susceptibles. Esta categoría implica la eficacia clínica en sitios corporales donde los fármacos están fisiológicamente concentrados o cuando se puede usar una dosificación superior a la normal de un fármaco.

**Resistente.** Se define por un punto de corte que implica que los aislamientos con una MIC igual o por encima del punto de corte de resistencia no son inhibidos por las concentraciones usualmente alcanzadas por el antimicrobiano mediante los esquemas de dosificación normales y/o que demuestran MICs que caen en el intervalo en el que son probables mecanismos específicos de resistencia microbiana, y la eficacia clínica del agente contra el aislamiento no se ha demostrado de manera fiable en los estudios de tratamiento (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

### **Resistencia a los Antibióticos**

La resistencia a los antibióticos puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, género, especie o grupo bacteriano y esta situación no es variable; el antibiótico nunca ha tenido efecto sobre el microorganismo. La resistencia adquirida es variable y es obtenida por una cepa de una especie bacteriana (Vignoli y Seija, 2006).

Las definiciones de resistencia se clasifican según el número y la clase de antibióticos afectados. La multiresistencia se define como la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un fármaco en tres o más de los grupos de antibióticos; la resistencia extrema se refiere a la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en dos

de ellas o menos, y la resistencia a todos los antimicrobianos se define como panresistencia (Rodríguez-Noriega y col., 2014; Vignoli y Seija, 2006).

### **Causas de Resistencia**

Si bien la resistencia a antibióticos puede ser adquirida naturalmente debido a una mutación cromosómica, usualmente es más frecuente la resistencia asociada a elementos genéticos móviles. Entre los más relevantes por su importancia en la adquisición de genes de resistencia se encuentran los plásmidos, transposones e integrones (Giedraitienė y col., 2011; Martínez-Martínez, 2006).

**Plásmidos.** Son moléculas de ADN circular bicatenario extra-cromosómico que pueden existir y replicarse independientemente del ADN cromosómico. Aunque el ADN plasmídico no porta información genética esencial para la sobrevivencia de la bacteria, juegan un papel importante en la diseminación y adquisición de genes de resistencia que le son útiles para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes (Betancor y col., 2006; Ramírez y col., 2014).

**Transposones.** Los elementos transponibles son segmentos de ADN capaces de moverse de un plásmido a otro o al genoma. Tienen secuencias repetitivas terminales que tienen un rol en la recombinación, reconociendo proteínas necesarias para insertarse o removerse de regiones genómicas específicas. Los transposones no se pueden replicar y se encuentran más comúnmente implicados en la resistencia a macrólidos, glicopéptidos y aminoglucósidos en Gram positivos (Betancor y col., 2006; Garza-Ramos y col., 2009; Pitout y Laupland, 2008).

**Integrones.** Son elementos de expresión genética que incorporan genes sin promotor, de tal modo que se convierten en genes funcionales. En

consecuencia, el integrón actúa como un casete de expresión para los genes que se inserten y, por lo general, más de un gen se integra con frecuencia (Garza-Ramos y col., 2009; Pitout y Laupland, 2008).

### **Adquisición de Genes de Resistencia**

Una bacteria inicialmente sensible puede adquirir genes de resistencia exógenos por tres procesos: conjugación, transformación o transducción.

**Conjugación.** Transferencia de material genético contenido en plásmidos, de una bacteria a otra, a través de una hebra sexual o *pilus*. Este proceso es el más importante por su frecuencia y por las consecuencias clínicas que ocasiona (Cabrera y col., 2007).

**Transformación.** Es el proceso por el cual fragmentos de ADN liberados por una bacteria donadora, son captados por una bacteria receptora. La recombinación se da entre moléculas de ADN transformante y el cromosoma de una célula receptora. Para que se dé una transformación activa los fragmentos de ADN deben ser por lo menos de 500 nucleótidos. A la capacidad de estas bacterias para captar ADN extracelular y transformarlo se le conoce como célula competente y va a depender del estado fisiológico de la bacteria. La frecuencia de transformación de las células muy competentes es alrededor de  $10^{-3}$  si se utiliza un exceso de ADN, es decir una célula de cada mil capta e integra el ADN. La competencia se desarrolla en la etapa final de la fase exponencial de crecimiento y antes de que la población bacteriana entre en la fase estacionaria. También es posible que las bacterias competentes capten ADN intacto de un bacteriófago, o bien ADN plasmídico (Perea-Mejía e Inzunza-Montiel; 2014).

**Transducción.** En este caso la transferencia de material genético es a través de bacteriófagos, que actúan como vectores del donador a la célula receptora. Los fagos se han clasificado en dos tipos según su funcionalidad, los fagos virulentos (líticos) los cuales producen lisis de la bacteria hospedera como efecto de la síntesis de una gran cantidad de viriones dentro de la célula infectada. Por otro lado, los fagos temperados, pueden tener un crecimiento lítico o entrar en una etapa de latencia (profago) donde la célula hospedera infectada continúa sus funciones de crecimiento y división, transmitiendo a la descendencia un genoma del profago que puede ser inducido a producir fagos en un proceso similar al desarrollo de fagos líticos. La célula bacteriana que alberga un profago latente está en un estado de lisogenia. Los fagos temperados median la transducción, a través de dos tipos de transducción, la generalizada en la que cualquier tipo de gen bacteriano tiene la misma posibilidad de transducirse a una célula receptora y la especializada en la que sólo ciertos genes son transducidos (Perea-Mejía e Inzunza-Montiel; 2014).

**Transducción generalizada.** Los fagos se reproducen inyectando su ADN dentro de la bacteria hospedera, formando una progenie viral en el citoplasma con la consecuente ruptura de la célula hospedera. Durante la replicación de dichos virus, el cromosoma bacteriano se rompe en fragmentos y algunas de las nuevas cápsides del fago envuelven fragmentos de ADN bacteriano en vez de ADN viral, la selección de las secuencias es al azar, debido a un empaquetamiento accidental del ADN del hospedero dentro de la cápside del fago (Perea-Mejía e Inzunza-Montiel; 2014).

**Transducción especializada.** Los fagos en cuestión están integrados al cromosoma de la célula en estado de lisogenia, la integración suele restringirse a un solo sitio denominado *att* (unión). Cuando la célula lleva

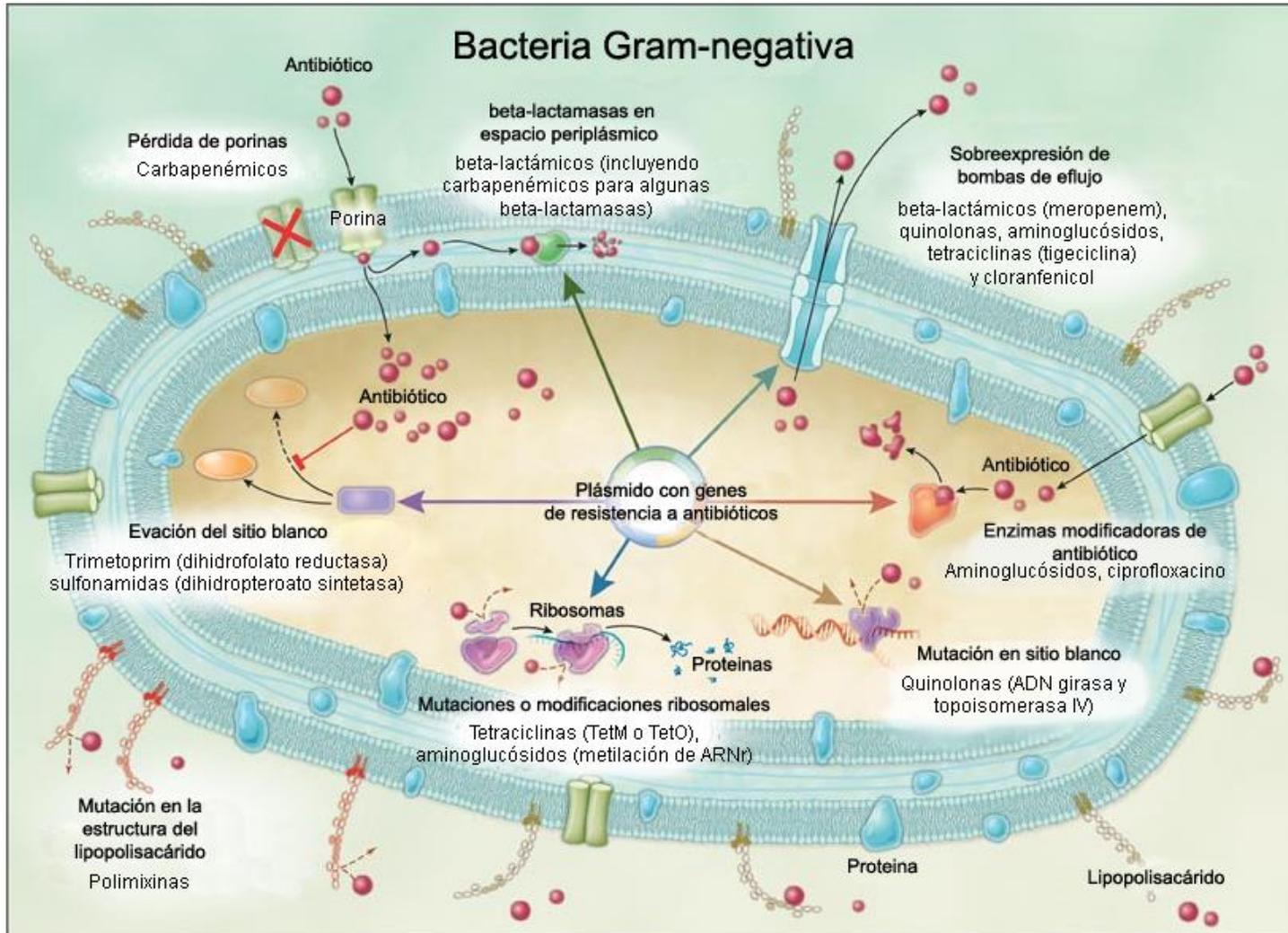
un profago de este tipo, se induce la producción de viriones, algunas veces la escisión del genoma viral del cromosoma bacteriano se realiza de forma incorrecta, llevándose genes de la bacteria adyacentes al sitio *att*. El virión resultante puede ser infeccioso o defectuoso (si carece de uno o más genes) y en cualquiera de los dos casos puede darse la adsorción a una célula sensible, inyectando el ADN y la integración del genoma del fago al cromosoma de la nueva célula huésped llevando a cabo la recombinación necesaria para garantizar la reproducción de los genes transducidos (Perea-Mejía e Inzunza-Montiel; 2014).

### **Mecanismos de Resistencia**

De manera frecuente se reportan nuevos mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos. La resistencia adquirida a un antibiótico se puede dar por distintos mecanismos (Figura 1), agrupándose en tres principales categorías:

**Prevención de acceso al sitio blanco.** Con estos mecanismos de resistencia, se minimizan las concentraciones intracelulares de estos antibióticos como resultado de una pobre penetración a la bacteria o por presencia de bombas de eflujo (Blair y col., 2015).

**Reducción de permeabilidad.** En comparación con las especies Gram positivas, las bacterias Gram negativas son intrínsecamente menos permeables a muchos antibióticos, ya que su membrana externa forma una barrera de permeabilidad. Los antibióticos hidrofílicos traspasan por difusión a través de las proteínas de las porinas que se encuentran en la membrana externa. En la mayoría de las enterobacterias, se cree que las porinas principales funcionan como canales inespecíficos. Por lo tanto, la reducción de la permeabilidad de la membrana externa y la limitación de la entrada de los antibióticos en la célula bacteriana se consigue



**Figura 1.** Mecanismos de resistencia a antibióticos debido a plásmidos en bacterias Gram negativas. Fuente: Peleg y Hooper, 2010.

mediante la regulación de porinas o su sustitución por porinas con canales más selectivos (Blair y col., 2015).

**Bombas de eflujo.** Transportan activamente muchos antibióticos al exterior de la célula y son grandes contribuyentes a la resistencia intrínseca de bacterias Gram negativas a muchos de los fármacos que pueden ser utilizados para tratar infecciones ocasionadas por bacterias Gram positivas. Cuando son sobreexpresadas, las bombas de eflujo también pueden conferir altos niveles de resistencia a antibióticos previamente útiles en la clínica. Algunas bombas presentan una estrecha especificidad de sustratos, pero muchas transportan una amplia gama de sustratos estructuralmente distintos y con conocidas como bombas de eflujo multidrogo-resistentes (Blair y col., 2015).

**Modificación del sitio blanco del antibiótico.** Mecanismos que modifican el blanco del antibiótico por mutación genética o modificación post-traducciona del sitio blanco (Blair y col., 2015).

**Cambios en el blanco del antibiótico por mutación.** La mayoría de los antibióticos se unen específicamente a sus blancos con una gran afinidad, previniendo así la actividad normal del blanco. Una mutación puntual en una de las múltiples copias de genes que codifican para los sitios blanco, puede llevar a cambios en su estructura que evitan la unión eficiente del antibiótico. Si la mutación permite al sitio blanco llevar a cabo su función normal, este cambio puede conferir resistencia (Blair y col., 2015).

**Modificación y protección del blanco.** La protección por modificación del blanco también puede ser una forma efectiva de resistencia a los antibióticos que no requiere una mutación en los genes codificantes para sitios blanco. La modificación se da por la adición de un grupo químico

que también previene la unión del antibiótico sin alterar la secuencia primaria de la proteína, por lo que retiene su actividad (Blair y col., 2015).

**Modificación del antibiótico.** Se modifica directamente el antibiótico, inactivándolo por hidrólisis o modificación (Blair y col., 2015).

**Inactivación por hidrólisis.** La modificación de antibióticos catalizada por enzimas es uno de los más importantes y relevantes mecanismos de resistencia desde los primeros usos de los antibióticos, con el descubrimiento de la penicilinasa en 1940. Han sido identificadas miles de enzimas capaces de degradar y modificar antibióticos de diferentes clases, incluyendo beta-lactámicos, aminoglucósidos, fenoles y macrólidos (Blair y col., 2015).

**Inactivación por transferencia de grupo químico.** La adición de grupos químicos por enzimas bacterianas a los sitios vulnerables a las moléculas antibióticas causa resistencia a antibióticos al prevenir que este se una al sitio blanco, como resultado de un impedimento estérico. Varios grupos químicos diferentes pueden ser transferidos, incluyendo los grupos acilo, fosfato, nucleotidil y ribitoil. Las enzimas responsables por estas transferencias forman una gran y diversa familia de enzimas que confieren resistencia a los antibióticos (Blair y col., 2015).

### **Resistencia a los Antibióticos Beta-lactámicos**

Para los antibióticos beta-lactámicos, los mecanismos de resistencia más comunes son la alteración de las PBPs o sitio blanco en las bacterias Gram positivas y la hidrólisis del antibiótico en las bacterias Gram negativas. Las enzimas que hidrolizan a un antibiótico beta-lactámico se denominan beta-lactamasas. Estas enzimas, hidrolizan los anillos beta-lactámicos, formando derivados acíclicos incapaces de fijarse en sus dianas en la pared celular

bacteriana y, en consecuencia, volviéndolos ineficaces en su actividad antimicrobiana (Castro-Alarcón y col., 2014; Giedraitienė y col., 2011).

### **Clasificación de las Beta-lactamasas**

Las beta-lactamasas han sido clasificadas por dos sistemas: la clasificación molecular de Ambler en el año 1980 y la clasificación funcional por Bush-Jacoby-Madeiros, en 1995 y actualizada por Bush y Jacoby en 2010.

#### **Clasificación Molecular de Ambler**

Esta clasificación es la más sencilla ya que divide las beta-lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D). Se basa en la homología de las proteínas, tomando en consideración los aminoácidos conservados y aquellos que han cambiado. Las clases A, C y D incluyen enzimas que hidrolizan sus sustratos mediante la formación de una acil-enzima a través de una serina del sitio activo. La clase A está conformada por las primeras cuatro serin-beta-lactamasas encontradas y secuenciadas, la clase C por cefalosporinasas, y la clase D por enzimas que hidrolizan oxacilina. Las beta-lactamasas de clase B son metalo-enzimas que utilizan al menos un ion zinc en el sitio activo para facilitar la hidrólisis del beta-lactámico (Bush y col., 1955; Carrillo y García, 2007).

#### **Clasificación Funcional de Bush-Jacoby**

La clasificación realizada por Bush-Jacoby consta actualmente de tres grupos y diversos subgrupos. Se basa en las características funcionales, teniendo en cuenta distintos criterios como las propiedades bioquímicas (masa molecular, secuenciación de nucleótidos), las propiedades físicas (punto isoeléctrico), el

espectro de hidrólisis, el espectro de inhibición, la codificación (plasmídica o cromosómica), etc. Esta clasificación es mucho más importante en el diagnóstico microbiológico por el laboratorio (Bush y Jacoby, 2010; Carrillo y García, 2007).

**Grupo 1.** Incluye a las cefalosporinas, las cuales son más activas contra cefalosporinas que hacia bencilpenicilinas, usualmente son resistentes al ácido clavulánico y son activas en cefamicinas.

**Grupo 2.** Está compuesto por serin-beta-lactamasas. Este representa al grupo más grande de beta-lactamasas, debido principalmente a la creciente identificación de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) durante los últimos 20 años.

**Subgrupo 2a.** Representa un pequeño grupo de beta-lactamasas penicilinasas con un espectro de actividad hidrolítica relativamente limitado y son las beta-lactamasas predominantes en cocos Gram positivos, incluyendo estafilococos y ocasionalmente enterococos. Las beta-lactamasas de este subgrupo tienen una mayor afinidad por bencilpenicilina y son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam.

**Subgrupo 2b.** Estas beta-lactamasas hidrolizan fácilmente penicilinas y cefalosporinas de primera generación, como cefaloridina y cefalotina. Son fuertemente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam.

**Subgrupo 2be.** Se encuentran las BLEE, las cuales permanecen sensibles a la inhibición por ácido clavulánico, característica que, en conjunto con el perfil de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, se utiliza para su detección en laboratorio.

**Subgrupo 2br.** Incluye a las enzimas beta-lactamasas de espectro amplio, las cuales producen resistencia bacteriana a las amino- y carboxipenicilinas, pero con sensibilidad a las cefalosporinas,

monobactámicos y carbapenémicos además de presentar resistencia a ácido clavulánico e inhibidores de beta-lactamasas relacionados.

**Subgrupo 2ber.** Enzimas que combinan un espectro extendido con una resistencia relativa a inhibición por ácido clavulánico.

**Subgrupo 2c.** Estas penicilinasas se caracterizan funcionalmente por su habilidad para hidrolizar carbenicilina o ticarcilina al menos 60 % tan rápidamente como bencilpenicilina y con hidrólisis de cloxacilina u oxacilina a tasas inferiores a la mitad para bencilpenicilina. Generalmente son inhibidas de forma fácil por ácido clavulánico o tazobactam.

**Subgrupo 2ce.** Contiene a las recientemente descritas carbenicilinasas de espectro extendido, que tiene una actividad expandida contra cefepime y cefpiroma, ambas cefalosporinas de cuarta generación.

**Subgrupo 2d.** Incluye beta-lactamasas que se distinguen por su habilidad para hidrolizar cloxacilina u oxacilina a tasas mayores del 50 % que para bencilpenicilina.

**Subgrupo 2de.** Enzimas que hidrolizan cloxacilina u oxacilina con un espectro extendido que incluye a cefalosporinas, pero no carbapenémicos.

**Subgrupo 2df.** Enzimas con las características del subgrupo 2d que son capaces de hidrolizar a carbapenémicos. Típicamente, estas enzimas no muestran respuesta a la inhibición por ácido clavulánico.

**Subgrupo 2e.** Cefalosporinasas con habilidad para hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y que no presentan buena actividad hidrolítica contra penicilinas ni aztreonam; son inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam.

**Subgrupo 2f.** Enzimas capaces de hidrolizar carbapenémicos y que son débilmente inhibidas por ácido clavulánico; contienen una serina en su sitio activo.

**Grupo 3.** Aquí se encuentran las metalo-beta-lactamasas, correspondientes a la clase B de Ambler, subdivididas con base a su estructura o función. Difieren estructuralmente de las serin-beta-lactamasas por su requerimiento de un ion zinc en el sitio activo y su poca afinidad en la hidrólisis en monobactámicos, además de no ser inhibidas por ácido clavulánico ni tazobactam (Bush y Jacoby, 2010; Carrillo y García, 2007).

### **Beta-lactamasas de Espectro Extendido**

En la actualidad se han identificado más de 1500 beta-lactamasas. Entre las de mayor importancia clínica, se encuentran las beta-lactamasas de espectro extendido o BLEE, que confieren resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación y al monobactámico aztreonam, pero no a cefamicinas y carbapenémicos. Las primeras enzimas clasificadas como BLEE, eran descendientes evolutivas de beta-lactamasas de espectro estrecho. Mutaciones en el sitio activo de las enzimas predecesoras, expandieron la cantidad de sustratos que la enzima podía hidrolizar (Curello y MacDougall, 2014; Dahiya y col., 2015; Lahey Clinic, 2016).

### **Principales Microorganismos Productores de BLEE**

La principal familia asociada a la producción de BLEE es la *Enterobacteriaceae*, siendo las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae* las más importantes. Su prevalencia varía entre países, algunas partes del mundo reportan que 60% o más de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* son resistentes a los

antibióticos beta-lactámicos mayormente utilizados en hospitales, como cefalosporinas de tercera generación, por ejemplo, cefotaxima (Brolund, 2014; Iredell y col. 2015). Los datos del informe de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), muestran que en el continente americano hay una elevada resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas. La resistencia de *K. pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación también es elevada y generalizada (World Health Organization, 2014).

Las bacterias productoras de BLEE han emergido como el principal problema tanto en pacientes hospitalizados, como ambulatorios. Las enterobacterias son de importancia clínica, causantes de infecciones en el sistema nervioso central, abscesos intraabdominales, infecciones relacionadas con dispositivos médicos, tracto respiratorio inferior, septicemia, tracto gastrointestinal y urinario, pero también son colonizadores comunes en el tracto gastrointestinal (Brolund, 2014; Castro-Alarcón y col., 2014).

### **Principales Tipos de BLEE**

Hasta los años noventa, la mayoría de las BLEE detectadas en los microorganismos patógenos correspondían principalmente a los tipos TEM y SHV, pertenecientes al Grupo 2 de la clasificación de Bush-Jacoby. La presencia de estas enzimas se asociaba principalmente con aislamientos de *K. pneumoniae* implicados en brotes hospitalarios en unidades de cuidados intensivos. Posteriormente fueron desplazadas por las BLEE tipo CTX-M que en la actualidad son las más frecuentemente identificadas. *E. coli* está desplazando en forma paulatina, aunque con menor carácter epidémico, a *K. pneumoniae*, siendo cada vez más frecuente el aislamiento de estas bacterias fuera del ámbito hospitalario (Galván y col., 2016).

**TEM.** La primer beta-lactamasa mediada por plásmidos en bacterias Gram negativas fue descubierta en Grecia en 1963. Fue nombrada TEM por la paciente llamada Temoniera, de quien fue aislada. Posteriormente, una enzima sumamente parecida fue descubierta y llamada TEM-2. Esta era idéntica en propiedades bioquímicas a la más común TEM-1, pero diferían en un solo aminoácido, resultando en un cambio en el punto isoeléctrico de la enzima. En 1982, se describió en el Reino Unido la primer BLEE del tipo TEM, la cual portaba un plásmido de resistencia a ceftazidima y hoy se conoce como TEM-12 (Carrillo y García, 2007). Con base en distintas combinaciones de cambios, actualmente se han descrito 223 enzimas del tipo TEM. La mayoría de ellas son BLEE, otras son resistentes a inhibidores de beta-lactamasas, y unas pocas son BLEE y resistentes a inhibidores. Estas enzimas están codificadas por genes *bla*<sub>TEM</sub> (Lahey Clinic, 2016; Muñoz-Price y Jacoby, 2013).

**SHV.** La primera enzima beta-lactamasa del tipo SHV fue descrita por Pitton en 1970. En ese momento se pensó que era codificada cromosómicamente, pero en 1979, se demostró que el gen *bla*<sub>SHV-1</sub> se encontraba presente en plásmidos que podían transferir resistencia fenotípica a otras bacterias (Chaves y col., 2001). En 1983, en Alemania se descubrió un asilamiento de *Klebsiella ozaenae*, el cual poseía una beta-lactamasa del tipo SHV, que hidrolizaba eficientemente cefotaxima, y en menor medida, ceftazidima. La secuenciación de aminoácidos mostró que la beta-lactamasa difería de SHV-1, debido al reemplazo de una glicina por una serina en la posición 238. Con esta sola mutación, la enzima obtuvo propiedades de espectro extendido y se designó como SHV-2. Las BLEE del tipo SHV son más frecuentemente encontradas en aislamientos clínicos. Su nombre hace referencia a “*sulfhydryl variable*”, debido a sus propiedades bioquímicas (Carrillo y García, 2007); Paterson

y Bonomo, 2005). Se conocen 193 variedades de beta-lactamasas tipo SHV y pueden ser encontradas en todo el mundo (Lahey Clinic, 2016).

**CTX-M.** De acuerdo con Shaikh y colaboradores (2015), Bauernfeind y colaboradores reportaron en 1989 un aislamiento clínico de *E. coli* resistente a cefotaxima en Alemania, el cual producía una BLEE que no pertenecía al tipo TEM o SHV; se le denominó CTX-M-1, debido a su actividad hidrolítica contra cefotaxima. Mientras que las BLEE de tipo TEM y SHV fueron generadas por sustituciones en aminoácidos a partir de las enzimas parentales, las BLEE de tipo CTX-M fueron adquiridas por transferencia horizontal de otras bacterias. La secuenciación de genes codificantes para enzimas CTX-M mostró una alta similitud a aquellas beta-lactamasas producidas por las especies de *Kluyvera*. Fue hasta la primera década del siglo XXI que las enzimas CTX-M alcanzaron prominencia sobre las otras BLEE, cuando la evolución acelerada y extraordinaria dispersión de estas enzimas fue observada. Se encontraban no solo en hospitales, sino también en la comunidad, siendo *E. coli* el más importante patógeno productor de estas enzimas (Bonnet, 2004; Cantón y col., 2012). Existen 168 enzimas del tipo CTX-M, las cuales pueden ser divididas en cinco grupos en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (Lahey Clinic, 2016; Paterson y Bonomo, 2005). Estos grupos de enzimas se subclasifican según el porcentaje de similitud de aminoácidos que presentan, como se muestra en la tabla I.

Los fenotipos de multirresistencia frecuentemente vistos en microorganismos productores de BLEE se deben a plásmidos que contienen elementos de resistencia para antibióticos no beta-lactámicos como trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacino. Los aislamientos productores de BLEE tipo CTX-M presentan mayor

**Tabla I.** Grupos de enzimas CTX-M y principales subclasificaciones.

| Grupo    | Subclasificaciones   |
|----------|--|
| CTX-M-1  | CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-29 y CTX-M-30  |
| CTX-M-2  | CTX-M-2, CTX-M-4, CTXM-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 y CTX-M-44  |
| CTX-M-8  | CTX-M-8  |
| CTX-M-9  | CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-18, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27 y CTX-M-45 |
| CTX-M-25 | CTX-M-25 y CTX-M-26  |

Fuente: Cantón y col., 2012

resistencia a ciprofloxacino que aquellos que no tienen el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> (Curello y MacDougall, 2014; Pitout y Laupland, 2008).

**Otras BLEE.** Entre las enterobacterias, las BLEE de tipo TEM, SHV y CTX-M son las más comunes, pero existen otras BLEE que no se encuentran estrechamente relacionadas a estas tres familias ya establecidas. Algunas de estas enzimas de menor frecuencia son tipo SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER y VEB. Estas BLEE han sido encontradas principalmente en aislamientos de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y no son derivadas de simples mutaciones puntuales de beta-lactamasas conocidas (Naas y col., 2008).

Otras enzimas capaces de hidrolizar una amplia variedad de beta-lactámicos, incluyendo carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam, son las carbapenemasas, las cuales se encuentran clasificadas en el grupo 3 y subgrupo 2f de Bush-Jacoby. En este subgrupo destacan las enzimas KPC, ya que por su localización plasmídica cuentan con un gran potencial de dispersión. Son encontradas principalmente en *K. pneumoniae*, pero también se han reportado en especies de *Enterobacter* y *Salmonella* (Dahiya y col., 2015).

En el grupo 3 de metalo-beta-lactamasas, destacan las enzimas IMP y VIM, las cuales hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, pero no aztreonam. Se encuentran codificadas en plásmidos, han aparecido en todo el mundo y se encuentran principalmente en bacterias no fermentativas, pero también en enterobacterias (Bush y Jacoby, 2010; Dahiya y col., 2015).

## **Multirresistencia asociada a BLEE**

Usualmente, los genes *bla* no son los únicos genes encontrados que codifican para resistencia a los antibióticos en aislamientos productores de BLEE. Como se mencionó anteriormente, la resistencia a ciprofloxacino, una quinolona, es muy común. Varios mecanismos de resistencia se encuentran asociados a este antibiótico. El mecanismo más común es la modificación y protección del sitio blanco, el cual es dado por genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*) que codifican proteínas pentapeptídicas de repetición que se unen a las enzimas girasa y ADN topoisomerasa tipo II (sitio blanco del antibiótico) y las protege de su inhibición por quinolonas. Otros mecanismos han sido identificados en la resistencia a quinolonas, incluyendo los causados por los genes *aac(6')-Ib-cr* (acetiltransferasa) y *qepA*, *oqxA* y *oqxB* (bombas de eflujo). Usualmente se refiere al conjunto de estos genes, como PMQR, acrónimo de *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance* (Resistencia a Quinolonas Mediada por Plásmidos) (Strahilevitz y col., 2009).

## **Identificación de BLEE**

La búsqueda de organismos productores de BLEE en los aislamientos clínicos es necesaria para evitar un tratamiento fallido y tomar las precauciones necesarias con los pacientes colonizados o infectados, así como para evitar la transmisión de estas bacterias en el hospital. La identificación de BLEE en microorganismos se puede realizar de manera fenotípica o genotípica (Shaikh y col., 2015).

## **Identificación Fenotípica**

Esta práctica es realizada habitualmente en los laboratorios clínicos. El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI por sus siglas en inglés) de Estados Unidos y la Agencia de Protección de la Salud (*Health Protection Agency*, HPA) de Reino Unido han publicado guías para la detección de BLEE en enterobacterias, especialmente para *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. y *Salmonella* spp. Estas guías se basan en el principio de que la mayoría de las BLEE hidrolizan cefalosporinas de tercera generación y son inhibidas por ácido clavulánico. El CLSI recomienda iniciar un tamizaje con 8 mg/L de cefpodoxima y 1 mg/L de cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, o aztreonam para determinar la MIC. Los equipos automatizados, como Vitek2 o MicroScan, que utilizan principios de detección semejantes a estos, han demostrado ser muy populares en los laboratorios clínicos (Pitout y Laupland, 2008; Shaikh y col., 2015). Se recomienda realizar la confirmación de la presencia de BLEE mediante alguna de las siguientes pruebas:

**Prueba de combinación de discos.** Se utilizan dos discos, uno que contiene solo una cefalosporina de tercera generación y otro que contiene la cefalosporina y ácido clavulánico. Los discos se colocan en una placa con agar Muller-Hinton inoculada con una suspensión bacteriana. Se confirma la presencia de BLEE cuando el halo de inhibición de la combinación es  $\geq 5$  mm con respecto al halo de la cefalosporina sola (Drieux y col., 2008).

**Técnica de doble difusión con discos.** Técnica inicialmente diseñada para diferenciar entre cepas resistentes a cefotaxima productoras de cefalosporinasas de aquellas cepas productoras de BLEE. Se coloca el o los discos de cefalosporina (comúnmente cefotaxima y/o ceftriaxona, pero también se pueden adicionar a la prueba ceftazidima y/o aztreonam)

a 30 mm de distancia de un disco con inhibidor de beta-lactamasa (amoxicilina-ácido clavulánico). Si aparece una ampliación entre los halos de inhibición en alguno de los antimicrobianos y el disco con el inhibidor de beta-lactamasa se considera que existe BLEE (Álvarez-Almanza, 2010; Drieux y col., 2008).

**Tiras E-test.** Se emplean tiras de papel impregnadas con gradientes de un antibiótico, (usualmente cefotaxima, ceftazidima o cefepime) en un extremo de la tira, mientras que el otro extremo contiene al antibiótico combinado con ácido clavulánico. Se considera positiva la sinergia con el ácido clavulánico cuando la MIC disminuye en dos o más diluciones. Se recomienda utilizar tiras de ceftazidima y cefotaxima ya que no todas las enzimas hidrolizan por igual estos antibióticos (Álvarez-Almanza, 2010; Drieux y col., 2008).

Sin duda, estas pruebas son útiles, pero la presencia de enzimas que hidrolizan carbapenémicos o hiperproducen penicilinasas y un alto nivel de producción de enzimas tipo AmpC (enzimas serin-beta-lactamasas que no son afectadas por inhibidores de beta-lactámicos) puede resultar en falsos resultados positivos y negativos, respectivamente (Gazin y col., 2012).

Se han desarrollado otras técnicas fenotípicas para la identificación de BLEE, incluyendo modificaciones en el método de doble disco usando cefalosporinas de cuarta generación, agar cromogénico y métodos de microdilución que utilizan ácido clavulánico en combinación con diferentes beta-lactámicos. Desafortunadamente, la mayoría de estas pruebas o son demasiado costosas para su implementación rutinaria o requieren de procedimientos y/o criterios difíciles de interpretar, lo cual ha limitado su uso para detectar bacterias productoras de BLEE (Pitout y Laupland, 2008).

## **Identificación Genotípica**

Entre los múltiples usos de las técnicas moleculares, se encuentra la detección de los genes responsables de la producción de BLEE. Entre las principales técnicas genotípicas para su detección, se encuentra la reacción en cadena de la Polimerasa o PCR. Con esta técnica se puede ampliar de manera exponencial un gen de interés; es ampliamente utilizada debido a su simplicidad, la relativa facilidad de manipular sus pasos durante la práctica y el procedimiento automatizado (Rapley, 2010).

**PCR.** Para su uso se requiere conocer la secuencia de ADN que flanquea al segmento de ADN que se desea amplificar. A partir de esta información se sintetizan dos iniciadores, cada uno complementario a una de las cadenas del gen de interés que se amplificará. La técnica de PCR consta de tres etapas con distinta duración y temperatura de incubación: desnaturalización, alineamiento y extensión. En el primer ciclo, se desnaturaliza la doble cadena del ADN al calentar a más de 90°C. La región que se desea amplificar se vuelve accesible, por lo que inmediatamente después se enfría a una temperatura entre 40 – 60°C para que los iniciadores se unan a las cadenas de ADN desnaturalizadas. La temperatura óptima para esta etapa debe ser definida de acuerdo a los iniciadores utilizados para asegurar la correcta amplificación. Al unirse los iniciadores, la enzima *Taq* Polimerasa sintetiza o extiende la cadena, a una temperatura de 72 °C, utilizando desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) previamente agregados en la mezcla de reacción. Cada uno de estos pasos se repite entre 30 y 40 veces, en lo que se denomina ciclos (Rapley, 2010).

**Secuenciación de nucleótidos.** Es un procedimiento que puede ser aplicado después de la ampliación exponencial de un gen mediante PCR. Esta técnica es esencial para diferenciar entre enzimas parentales

y sus distintas variantes, como es el caso de las enzimas BLEE. Algunas de ellas, como TEM y SHV, no pueden ser definidas como de espectro extendido mediante PCR, ya que los oligonucleótidos actuales para TEM y SHV no permiten amplificar solamente aquellos genes codificantes para BLEE, por lo que la secuenciación es un paso necesario si se desea conocer la variante de la enzima parental. La técnica de secuenciación determina el orden de la secuencia de bases a lo largo del ADN. Para lograr esto, dos técnicas han sido desarrolladas, una está basada en un método enzimático frecuentemente llamado como secuenciación de Sanger, el cual es el nombre de su creador, y un método químico llamado Maxam y Gilbert, llamado así por la misma razón.

Actualmente, la secuenciación de Sanger es por mucho el método más popular y muchos equipos comerciales se encuentran disponibles para su uso. Esta técnica imita en muchas formas a la habilidad que posee la enzima DNA polimerasa para extender una creciente cadena de nucleótidos en un templado existente. Se requiere que el ADN a secuenciar se encuentre en forma de una cadena sencilla, la cual se hibrida con un oligonucleótido complementario a la región 3' del ADN. El oligonucleótido actuará como un iniciador para la síntesis de la cadena complementaria catalizada por la DNA polimerasa. Los dNTP's que se utilizan para extender la cadena son marcados radioactivamente de manera distinta cada uno con  $P^{32}$  o  $S^{35}$ , de esta forma la cadena sintetizada estará marcada.

Los avances en el marcaje químico han llevado al desarrollo de técnicas automatizadas de secuenciación de alto rendimiento. Al producto sintetizado se le realiza electroforesis en un gel desnaturalizante para después ser excitado con un láser. Considerando que los cuatro dNTP's han sido previamente marcados con diferente trazador, emitirán luz a una longitud característica para cada uno. Una rejilla de difracción separa las

emisiones que son captadas por un dispositivo de carga acoplado para después ser interpretada la secuencia en tiempo real (Rapley, 2010).

Estas técnicas genotípicas indudablemente son muy útiles en la identificación de los genes responsables de la resistencia a antibióticos. Existen otros métodos que, aunque no brindan información del tipo de BLEE producido, permiten caracterizar los aislamientos bacterianos y brindar información epidemiológica para conocer su evolución y relación entre microorganismos, virulencia y capacidad de transmisión de genes de resistencia.

**Electroforesis de campo pulsado.** Este procedimiento permite separar fragmentos de ADN de hasta de  $2 \times 10^3$  kb, lo que permite la separación de cromosomas completos, mientras que otros métodos de electroforesis sólo permiten diferenciar fragmentos de 60 kilobases (kb) o menos. El fundamento de la electroforesis de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés de *Pulsed-field gel electrophoresis*), es el uso de dos campos eléctricos aplicados alternativamente a diferentes ángulos, por periodos de tiempo definidos, en un gel de agarosa que contiene el material genético de interés.

La activación del primer campo eléctrico causa que las moléculas espirales se estiren en el plano horizontal y se comiencen a desplazar a través del gel. La interrupción de este campo y la aplicación del segundo, fuerza a la molécula a moverse en una nueva dirección. Puesto que existe un comportamiento de relajación, dependiente de la longitud de los fragmentos, cuanto más pequeña es una molécula, más rápido se realinea con el nuevo campo y es capaz de continuar moviéndose a través del gel. Las moléculas más grandes tardan más en realinearse. De esta manera, con la inversión continua del campo, las moléculas más pequeñas se adelantan a las moléculas más grandes y son separadas según su tamaño. Esta técnica es especialmente utilizada cuando se

trata de identificar brotes de bacterias en alimentos, hospitales o comunidad (Rapley, 2010).

**Perfiles de plásmidos y conjugación.** Un gran número de plásmidos, en general los de mayor tamaño (capaces de portar hasta 50 o 100 genes), suelen ser capaces de transferirse de una bacteria a otra mediante la conjugación. El perfil de plásmidos se realiza mediante la extracción del ADN plasmídico y la electroforesis del mismo, empleando un marcador de peso molecular conocido para después realizar una estimación del tamaño del plásmido.

La conjugación se basa en la presencia de dos genes codificantes para resistencia a antibióticos, donde uno de ellos permite la selección de las bacterias que contienen el plásmido al ser desarrolladas en un medio de cultivo que contenga el antibiótico apropiado. Aquellas que contengan el plásmido crecerán formando colonias. La realización en conjunto de estas técnicas en laboratorio permite conocer la capacidad de transferencia que posee una bacteria para transmitir su información genética a otra y conocer si la resistencia a antibióticos se debe a uno o más plásmidos (Betancor y col., 2006).

**Filogrupo.** Una de las bacterias más estudiadas en todo el mundo es *E. coli*. Los análisis filogenéticos han demostrado que *E. coli* se puede clasificar en cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Las cepas virulentas extra-intestinales corresponden principalmente al grupo B2 y en menor medida, al grupo D, mientras que las cepas comensales pertenecen al grupo A. Estudios posteriores revelaron que existen otros tres filogrupos: D, E y F. Otro grupo fue agregado donde se clasifican nuevos linajes de *Escherichia* que son genéticamente distintos, pero fenotípicamente indistinguibles. Uno de estos linajes es *Escherichia* clade I, que también debe ser considerada como un filogrupo de *E. coli* debido

a la extensa recombinación detectada entre cepas pertenecientes a clade I y *E. coli* (Clermont y col., 2000; Clermont y col., 2013).

La clasificación del filogrupo se realiza por medio de PCR múltiple, evaluando la presencia y ausencia de genes. Para la clasificación de los primeros cuatro grupos filogenéticos se realiza la búsqueda de tres genes: *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2. *ChuA* es un gen requerido para hemotransporte en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7. El gen *yjaA* codifica a una proteína inducida por estrés y se encuentra relacionada a la producción de biopelículas. TSPE4.C2 se caracterizó como un gen putativo de esterasa lipasa. Para la clasificación de todos los filogrupos se realiza la búsqueda de un gen más, siendo cuatro en total. Los estudios filogenéticos brindan un mejor entendimiento de como las cepas patogénicas adquieren genes de virulencia (Clermont y col., 2000; Clermont y col., 2013).

A pesar de la valiosa información que proporciona la identificación genotípica de los aislamientos, estos procedimientos no se utilizan en la práctica clínica habitual de la mayoría de los hospitales. Esto se debe principalmente a restricciones económicas, por lo que su uso se limita a estudios epidemiológicos (Pitout y Laupland, 2008; Shaikh y col., 2015).

### **Tratamiento de Infecciones Causadas por Bacterias Productoras de BLEE**

La farmacoterapia de enfermedades infecciosas es única debido a la enorme cantidad de cepas patógenas que existen. El hecho de que la farmacoterapia de enfermedades infecciosas involucre microorganismos que constantemente están mutando y adaptándose a los antibióticos, crea confusiones en cuanto al tratamiento a seguir, pero el acercamiento al paciente es relativamente simple y consistente. El entender el enfoque que se debe seguir es el primer paso en el

desarrollo de un correcto uso de antibióticos y tratamiento de enfermedades infecciosas (Gallagher y MacDougall, 2014).

El uso de antimicrobianos durante el tratamiento se puede clasificar en tres categorías: uso profiláctico, uso empírico y tratamiento definitivo. La administración profiláctica de antibióticos tiene la finalidad de prevenir una infección que aún no ha sido desarrollada. La profilaxis debería ser limitada a pacientes con alto riesgo de desarrollar una infección, como los pacientes que se encuentran con terapia inmunosupresiva, que padecen algún tipo de enfermedad maligna o que se someterán a cirugía. Estos pacientes presentan un sistema inmunológico debilitado que los hace susceptibles a infecciones (Gallagher y MacDougall, 2014).

El tratamiento empírico es utilizado en aquellos pacientes que se sospecha o han manifestado una infección, pero el microorganismo causante aún no ha sido identificado. Esta terapia es comúnmente utilizada tanto en pacientes hospitalizados como ambulatorios. Debido a que las técnicas de identificación fenotípicas no proporcionan resultados inmediatos respecto al microorganismo causante y su susceptibilidad a los antibióticos, comúnmente la terapia empírica permite el manejo inicial del paciente. Los antibióticos administrados deben ir dirigidos a posibles agentes causantes, por lo que no es recomendable utilizar antibióticos de muy amplio espectro (Gallagher y MacDougall, 2014).

A diferencia de la terapia empírica, en la terapia definitiva se conoce a que organismo debe dirigirse el tratamiento y que fármacos podrán utilizarse. En esta fase es prudente elegir agentes antibacterianos que sean seguros, eficaces, de espectro estrecho y de bajo costo. Esto permite evitar la toxicidad innecesaria, fracasos del tratamiento, la posible aparición de resistencia microbiana a los antibióticos y también permite administrar los costos del manejo del paciente (Gallagher y MacDougall, 2014).

El no seguir estos pasos para la correcta administración de antibióticos, lleva a las bacterias a la adaptación y resistencia a ellos. Cuando el microorganismo causante de infección es identificado como productor de BLEE, existen otras alternativas de tratamiento:

### **Cefamicinas**

Estos antibióticos beta-lactámicos no son hidrolizados por enzimas BLEE, pero puede presentarse co-resistencia por pérdida de porinas en la pared celular, minimizando la cantidad de antibiótico que ingresa a la célula (Falagas y Karageorgopoulos, 2009).

### **Carbapenémicos**

El surgimiento de enzimas carbapenemasas, capaces de hidrolizar a estos antibióticos, han hecho que los carbapenémicos se consideren la primera opción de tratamiento solamente en casos de infecciones graves ocasionadas por enterobacterias productoras de BLEE (Falagas y Karageorgopoulos, 2009).

### **Inhibidores de Beta-lactamasas**

Los inhibidores usados actualmente en la práctica clínica son tazobactam, ácido clavulánico y sulbactam, mismos que son administrados en conjunto con antibióticos beta-lactámicos. El grado de inhibición contra la hidrólisis producida por BLEE varía dependiendo del tipo de inhibidor, así como del tipo de BLEE. Tazobactam es un inhibidor más potente en comparación con el ácido clavulánico cuando se trata de BLEE tipo CTX-M y estos dos inhibidores son más potentes que sulbactam al inhibir BLEEs del tipo TEM y SHV. Después de años de uso, se han encontrado aislamientos resistentes a esta combinación de

medicamentos, mediante enzimas beta-lactamasas (comúnmente enzimas tipo AmpC producidas por *Enterobacter* spp. o *Pseudomonas aeruginosa* o metalo-beta-lactamasas) no susceptibles a inhibidores o por hiperproducción de enzimas (Drawz y Bonomo, 2010; Falagas y Karageorgopoulos, 2009).

### **Tigeciclina**

Pertenece a la clase de las glicilglicinas, las cuales son análogas a las tetraciclinas. Este antibiótico fue aprobado en el año 2005 para infecciones intraabdominales, así como para infecciones complicadas de piel y tejidos blandos. Los efectos secundarios predominantes relacionados al uso de tigeciclina son náusea y vómito. No se administra a niños ni a mujeres embarazadas, ya que el antibiótico se deposita en huesos y dientes en desarrollo (Iredell y col., 2015; Stein y Babinchak, 2013).

### **Eravaciclina**

Es un novedoso antibiótico de las fluorociclinas, tolera los mecanismos usuales de resistencia a tetraciclinas, tiene amplia actividad contra patógenos entéricos Gram negativos, incluyendo aislamientos multirresistentes y bacterias anaerobias. Podría ser tan seguro y efectivo como el ertapenem en infecciones intra-abdominales complicadas (Iredell y col., 2015).

### **Polimixinas**

Las Polimixinas B y E (colistina) se encuentran disponibles para su uso clínico. Desafortunadamente estos agentes de segunda línea, a diferencia de los beta-lactámicos, presentan una alta nefrotoxicidad y son propensos al surgimiento de resistencia, por lo que generalmente se requiere la utilización de un segundo

agente, como tigeciclinas, carbapenémicos o aminoglucósidos (Hsu y Tamma, 2014; Iredell y col., 2015).

### **Fosfomicina**

Es un antibiótico bien tolerado y empleado para tratar infecciones en vías urinarias; los niveles bactericidas se mantienen en orina por 72 horas después de una sola dosis. Se ha utilizado exitosamente de forma intravenosa en pacientes críticos, no obstante, generalmente se administra en combinación con otro agente activo. Durante el tratamiento puede surgir resistencia debido a un menor ingreso a la bacteria, modificación del sitio activo o del antibiótico (Iredell y col., 2015).

Algunos de los tratamientos para aislamientos productores de BLEE presentan limitaciones o no deben utilizarse de manera injustificada con la finalidad de prevenir el surgimiento o aumento de prevalencia de resistencia para estos antibióticos.

### **Prevención de Infecciones por Bacterias Productoras de BLEE**

Las instituciones de salud, así como sus trabajadores, tienen un rol primordial en la prevención de la propagación de infecciones por bacterias productoras de BLEE. Entre las acciones preventivas se encuentran:

1. Conocer las tendencias de resistencia a antibióticos en la institución de salud donde se labora, así como de las que se encuentren cercanas.
2. Aplicar las guías del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por su nombre en inglés de *Center for Disease Control and Prevention*) para la oportuna detección, prevención, seguimiento y reporte de infecciones.

3. Seguir lineamientos relevantes y precauciones al tratar a cada paciente y protegerlos de infecciones farmacorresistentes.
4. Remover los equipos médicos temporales, como catéteres y ventiladores, tan pronto no sean requeridos.
5. Si se realizará el traslado de un paciente con una infección farmacorresistente, notificar al área o institución a donde se trasladará, para tomar las precauciones necesarias y evitar una propagación de la bacteria.
6. Finalmente, una de las medidas de mayor importancia dentro de las instituciones de salud, es la promoción del correcto uso de los antibióticos.

Los pacientes y sus familiares también pueden contribuir pidiendo que el personal del hospital y visitantes que estarán en contacto con la persona hospitalizada, se laven las manos. Para su propio beneficio y el de los demás, es necesario que el paciente tome los antibióticos única y exactamente como fueron prescritos (Center for Disease Control and Prevention, 2013).

### **Programas de Vigilancia Epidemiológica**

La vigilancia epidemiológica es un sistema que recolecta información sobre los diversos eventos de interés médico epidemiológico, capaz de analizar la información y proporcionar un panorama sólido que permita iniciar, profundizar o rectificar acciones de prevención y control. La información respecto a los daños y riesgos para la salud representa un insumo importante de la vigilancia epidemiológica (NOM-017-SSA2-2012).

El monitoreo de los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos es determinante para la evaluación de los regímenes de terapia empírica en una institución porque permite generar alertas a los profesionales involucrados en la

atención sobre la presencia de mecanismos de resistencia inusuales o emergentes. Una terapia antimicrobiana empírica efectiva permitirá reducir la mortalidad asociada a infecciones por bacterias multidrogo resistentes (Martínez-Buitrago y col., 2014).

En México, en 2015, se aportaron datos de un estudio donde la prevalencia de resistencia de *E. coli* para cefalosporinas de tercera generación es de 58% y para carbapenémicos es de 2%. En el mismo estudio, las resistencias reportadas para *K. pneumoniae* son de 53% para cefalosporinas y 14% para carbapenémicos (The center for disease dynamics, economics & policy, 2017).

Mientras otros países aportan datos sobre la resistencia a los antibióticos de cientos o miles de aislamientos analizados, la información que México provee mundialmente a este respecto es escasa. Los datos aportados por el país han provenido de un solo hospital, por lo que no se consideran prevalencias de otros estados del país (The center for disease dynamics, economics & policy, 2017).

Debido al incremento en el aislamiento de microorganismos resistentes a los antibióticos en los últimos años y a los pocos reportes en México, es necesario iniciar un programa de caracterización genotípica y vigilancia epidemiológica de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE en el estado de Sonora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Instituciones Participantes

Se llevó a cabo un estudio transversal con muestreo por conveniencia en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora durante el periodo comprendido entre el 15 de febrero y el 15 de agosto de 2016.

Las instituciones participantes fueron: Hospital Dr. Fernando Ocaranza del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), esta institución atiende a derechohabientes trabajadores del gobierno federal, cuenta con 101 camas y diariamente atiende 212 pacientes. Hospital San José (HSJ), de carácter privado, cuenta con 120 camas y diariamente atiende 150 pacientes. Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDIC), atiende a pacientes derechohabientes trabajadores del gobierno estatal (ISSSTESON), cuenta con 113 camas censables y 55 no censables, diariamente atiende entre 3,500 y 4,500 pacientes en sus distintas áreas. El Centro Integral de Atención a la Salud (CIAS) Unidad Sur perteneciente al ISSSTESON es una clínica donde no hay pacientes hospitalizados y solamente se atiende a pacientes de consulta externa; en el laboratorio clínico de esta institución diariamente son atendidos cerca de 65 pacientes. Con la finalidad de no revelar las prevalencias en cada institución de microorganismos resistentes a antibióticos, de manera aleatoria se les nombró como institución de salud "A", "B", "C" o "D".

Las instituciones participantes proporcionaron los aislamientos que, mediante los equipos Vitek2 o MicroScan, dependiendo de la infraestructura de cada institución, fueran identificados como *E. coli* o *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Los informes de identificación y susceptibilidad a antibióticos, así como la información de cultivos bacteriológicos procesados durante el período de recolección, fueron proporcionados por las instituciones.

### **Criterios de Inclusión**

Aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* identificados como productores de BLEE mediante los equipos Vitek2 y MicroScan.

### **Criterios de Exclusión**

Aislamientos clínicos que, al ser proporcionados, no pudieron ser recuperados o se encontraban contaminados con otros microorganismos. También se excluyeron aquellos aislamientos que no contaban con el informe completo.

### **Criterios de Eliminación**

Se eliminaron los aislamientos del mismo origen pertenecientes al mismo paciente que se realizaron durante la misma semana. También se eliminaron los aislamientos que contaban con informe incongruente, es decir, aquellos aislamientos que sus características no concordaban con lo proporcionado en el informe.

### **Obtención de Aislamientos e Informes**

Al identificarse en las instituciones participantes un aislamiento de *E. coli* y/o *K. pneumoniae* productor de BLEE, el laboratorista encargado realizó un subcultivo en un vial con agar semisólido SIM previamente proporcionado. El vial se incubó de 18 a 24 horas a 37 °C, pasado este tiempo, el vial se refrigeró a 4 °C hasta su recolección y embalaje de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCT2-2011, para su transporte a los laboratorios de la Universidad de Sonora.

Los aislamientos fueron subcultivados en agar tripticasa soya y MacConkey para corroborar la pureza y morfología del microorganismo, respectivamente. Los aislamientos corroborados fueron almacenados en medio BHI con glicerol al 20%, a -20 °C.

Al momento de la recolección de los aislamientos por parte del personal de la Universidad de Sonora, cada institución participante proporcionó el informe de la bacteria con el microorganismo identificado, muestra clínica, servicio hospitalario de obtención y resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. La información de cada aislamiento se ingresó en una base de datos que se manejó bajo un estricto control de confidencialidad.

### **Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de los aislamientos que cumplieron los criterios de inclusión utilizando un *kit* comercial QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, U.S.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó y se estimó su pureza en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, U.S.A.).

### **Identificación Preliminar del Tipo de BLEE Mediante PCR**

Mediante PCR uniplex, se realizó la búsqueda de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, en todos los aislamientos recolectados, utilizando los iniciadores indicados en la Tabla II (Chia y col., 2005). La mezcla de reacción para TEM, SHV, CTX-M-1 y CTX-M-9 se elaboró con agua deionizada estéril, Buffer 5X, dNTP's (200 µM cada uno), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), iniciadores F y R (0.4 µM) y 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Promega, U.S.A.). A la mezcla de reacción se le adicionaron 3 µL de ADN purificado (Modificado de Chia y col., 2005).

**Tabla II.** Iniciadores utilizados para la detección de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub>

| Iniciador | Secuencia (5'-3')       |
|-----------|-------------------------|
| TEM-F     | ATGAGTATTCAACATTTCCGT   |
| TEM-R     | TTACCAATGGTTAATCAGTGA   |
| SHV-F     | CCGGGTTATTCTTATTTGTCGC  |
| SHV-R     | TAGCGTTGCCAGTGCTCG      |
| CTX-M-1-F | AATCACTGCGGCAGTTCACGCT  |
| CTX-M-1-R | GAACGTTTCGTCTCCCAGCTGT  |
| CTX-M-2-F | ATGATGACTCAGAGCATTCG    |
| CTX-M-2-R | TGGGTTACGATTTTCGCCGC    |
| CTX-M-9-F | TACCGCAGATAATACGCAGGTG  |
| CTX-M-9-R | CAGCGTAGGTTTCAGTGCGATCC |

Fuente: Chia y Col., 2005

Para CTX-M-2, se utilizaron las mismas cantidades en la mezcla de reacción, excepto que la concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizada fue de 1.5 mM (Modificado de Cabral y col., 2012). Las condiciones establecidas para amplificación de TEM, SHV, CTX-M-1 y CTX-M-9 fueron las siguientes: un periodo a 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos a 95 °C por 60 segundos, 58 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos y finalmente un periodo a 72 °C por 10 minutos (Modificado de Chia y col., 2005). Para CTX-M-2, se cambió solamente la temperatura de alineamiento, de 58 °C, a 62 °C (Modificado de Cabral y col., 2012). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador iCycler (Bio-Rad, U.S.A.). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa a 1.5% y fueron teñidos con SYBR Green (Invitrogen, U.S.A.).

Los geles fueron fotodocumentados y se cuantificó el peso de las bandas obtenidas con el *software* TotalLab TL100 (Nonlinear Dynamics, Ltd., United Kingdom). Como control negativo de PCR, se utilizó el ADN de *E. coli* ATCC 25922 y como control positivo, el ADN de tres cepas previamente caracterizadas que contenían el tipo de BLEE buscado, proporcionadas por el Grupo de Resistencia Bacteriana del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). La cepa INSP-14262 contenía los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>, INSP-819 contenía el gen *bla*<sub>TEM</sub> y la cepa INSP-CTX-M-2 contenía el gen para dicha BLEE.

Para posteriores experimentos, se seleccionó una submuestra de los aislamientos considerando institución de procedencia, microorganismo, consulta (externa u hospitalaria), perfil de resistencia a antibióticos y tipo de BLEE encontrado. Se eligieron 45 aislamientos: 36 de *E. coli* y nueve de *K. pneumoniae*. A esta submuestra se le realizó la confirmación de BLEE mediante la prueba de combinación de discos, acorde a las recomendaciones del CLSI 2017. Se utilizaron los antibióticos cefotaxima, cefotaxima/ácido clavulánico, ceftazidima y ceftazidima/ácido clavulánico. Se incluyó la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 como control de calidad (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

## Identificación de PMQR

En los aislamientos seleccionados, se realizó la búsqueda de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*; *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*, *oqxA* y *oqxB*, mediante PCR. La búsqueda de genes *qnr* y *oqx* se realizó por PCR-múltiple y se confirmó mediante PCR individual. La mezcla de reacción para los genes *qnr* se preparó con Buffer 10X, 2.5 µL, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP's (200 µM cada uno), iniciadores F y R (5 pmol/µL; Tabla III) y 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Promega, U.S.A.). A cada mezcla de reacción se le adicionaron 3 µL de ADN purificado. La amplificación se realizó de la siguiente manera: un periodo a 95 °C por 10 minutos, 35 ciclos a 95 °C por 60 segundos, 60 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos y finalmente un periodo a 72 °C por 10 minutos (modificado de Cattoir y col., 2007). Para *oqx*, la mezcla de reacción se preparó con Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP's (200 µM cada uno), iniciadores F y R (5 pmol/µL; Tabla III) y 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa. A cada mezcla de reacción se le adicionaron 3 µL de ADN purificado (modificado de Kim y col., 2009).

Los genes *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*, se analizaron mediante PCR sencilla con iniciadores específicos para cada gen (Tabla III). La mezcla de reacción para *aac(6')-Ib-cr* se preparó con Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP's (200 µM cada uno), 2.0 µL iniciador F (5 pmol/µL), iniciadores F y R (5 pmol/µL; Tabla III) y 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa. A cada mezcla de reacción se le adicionaron 3 µL de ADN purificado (Silva-Sánchez y col., 2011).

Para *qepA*, se utilizan las mismas indicaciones, excepto que se agregó un potenciador (*Enhancer* 10X). Las condiciones de amplificación fueron un periodo a 95 °C por 10 minutos, 35 ciclos a 95 °C por 60 segundos, 58 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos, finalmente un periodo a 72 °C por 10 minutos (Silva-Sánchez y col., 2011).

**Tabla III.** Iniciadores utilizados para la detección de genes PMQR.

| <b>Iniciador</b>       | <b>Secuencia (5'-3')</b>          | <b>Referencia</b>          |
|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| <i>qnrA-F</i>          | AGAGGATTTCTCACGCCAGG              | Cattoir y col., 2007       |
| <i>qnrA-R</i>          | TGCCAGGCACAGATCTTGAC              | Cattoir y col., 2007       |
| <i>qnrB-F</i>          | GGMATHGAAATTCGCCACTG <sup>1</sup> | Cattoir y col., 2007       |
| <i>qnrB-R</i>          | TTTGCYGYGCGCCAGTCGAA <sup>1</sup> | Cattoir y col., 2007       |
| <i>qnrS-F</i>          | GCAAGTTCATTGAACAGGGT              | Cattoir y col., 2007       |
| <i>qnrS-R</i>          | TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG             | Cattoir y col., 2007       |
| <i>aac(6')-Ib-cr-F</i> | TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA           | Minarini y col., 2008      |
| <i>aac(6')-Ib-cr-R</i> | CTCGAATGCCTGGGCTGTTT              | Minarini y col., 2008      |
| <i>qepA-F</i>          | GGACATCTACGGCTTCTTCG              | Silva-Sánchez y col., 2011 |
| <i>qepA-R</i>          | CATGACGCAGTACCTGCAG               | Silva-Sánchez y col., 2011 |
| <i>oqxA-F</i>          | CTCGGCGCGATGATGCT                 | Kim y col., 2009           |
| <i>oqxA-R</i>          | CCACTCTTCACGGGAGACGA              | Kim y col., 2009           |
| <i>oqxB-F</i>          | TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC             | Kim y col., 2009           |
| <i>oqxB-R</i>          | CTCGGCCATTTTGGCGCGTA              | Kim y col., 2009           |

<sup>1</sup>M= A o C; H= A o C o T; Y= C o T.

## Filogrupos

La submuestra de 36 aislamientos de *E. coli* fue sometida a PCR-múltiple para la identificación de cuatro filogrupos. La mezcla de reacción se preparó con Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), cada uno de los seis iniciadores (20 pmol/μL), dNTP's (200 μM cada uno) y 1.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa por cepa a probar (4.0 μL de ADN purificado). Los iniciadores utilizados se encuentran en la tabla IV. La amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 periodo a 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos y 72 °C por 45 segundos y finalmente un periodo a 72 °C por 7 minutos (Clermont y col., 2000).

## Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

Los aislamientos previamente seleccionados se analizaron mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE). La preparación de los discos de agarosa con el ADN bacteriano se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Kaufmann (1998). La digestión del ADN se realizó utilizando la enzima *Xba*I, la separación de los fragmentos se realizó en el equipo CHEF Map-per II (BioRad, U.S.A.). Se utilizó un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en amortiguador TBE al 0.5X a un voltaje de 6 V/cm y ángulo de 120° con pulsos de cambio de linealidad de 1 a 30 segundos a 14 °C, durante 23 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio para posteriormente fotodocumentarse (Kaufmann, 1998). Los dendrogramas para el análisis de patrones de PFGE se generaron por el método de apareamiento por media aritmética sin ponderación (UPGMA, por sus siglas en inglés de *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*) y el coeficiente de Dice en el programa Bionumerics versión 6.5 (Applied Maths, Belgium), siguiendo los criterios de Tenover y colaboradores (1995).

**Tabla IV** Iniciadores utilizados para la clasificación por filogrupo de aislamientos de *Escherichia coli* identificados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

| Iniciador        | Secuencia (5'-3')     |
|------------------|-----------------------|
| <i>ChuA-F</i>    | GACGAACCAACGGTCAGGAT  |
| <i>ChuA-R</i>    | TGCCGCCAGTACCAAAGACA  |
| <i>YjaA-F</i>    | TGAAGTGTCAGGAGACGCT   |
| <i>YjaA-R</i>    | ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC |
| <i>TspE4C2-F</i> | GAGTAATGTCGGGGCATTCA  |
| <i>TspE4C2-R</i> | CGCGCCAACAAAGTATTACG  |

Fuente: Clermont y col., 2000

## Conjugación y Aislamiento de Plásmidos

A partir de los aislamientos seleccionados, se tomaron los ocho aislamientos que co-expresaron los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>. La conjugación se realizó a 30 °C utilizando el método descrito por Miller (Miller, 1972) donde la bacteria receptora de plásmido fue *E. coli* J53-3. Las transconjugantes se seleccionaron en medios suplementados con rifampicina (10 mg/mL) y cefotaxima (10 mg/mL) y medios mínimos. Las transconjugantes obtenidas se probaron en agar Luria con ampicilina (100 mg/mL), cefotaxima (10 mg/mL), cloranfenicol (30 mg/mL), ciprofloxacino (5 mg/mL), gentamicina (20 mg/mL), ácido nalidíxico (8 mg/mL) y tetraciclina (12.5 mg/mL). La extracción de ADN plasmídico de las bacterias que transfirieron su plásmido se realizó mediante el método de Kieser (1984). El ADN se visualizó después de electroforesis horizontal en gel de agarosa 0.7%, teñido con bromuro de etidio. El ADN plasmídico de la cepa *Escherichia coli* NCTC 50192 se utilizó como marcador de tamaño molecular para analizar las longitudes de los segmentos de ADN. Para determinar el tamaño de los plásmidos que conjugaron se graficó el tamaño de los plásmidos del marcador 50192 (154 kb, 66 kb, 48 kb y 7 kb) contra la movilidad relativa (milímetros) de los plásmidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Descripción de Aislamientos

En las cuatro instituciones de salud participantes durante el 15 de febrero y el 15 de agosto de 2016, se recolectaron 207 aislamientos que cumplieron con los criterios de inclusión. De ellos, 192 (92.8%) correspondieron a *E. coli* y 15 (7.2%) a *K. pneumoniae*. En este periodo, la institución “A” procesó 1,079 aislamientos; la institución “B” 909; la institución “C” 5,422 y la institución “D” 2,714 aislamientos.

Todos los informes proporcionados especificaban las muestras clínicas de las cuales se obtuvieron los aislamientos. De los 207 aislamientos recolectados, 169 fueron de origen comunitario, es decir, provenían de pacientes ambulatorios que no han sido internados dentro de un hospital o que se encuentran en el área de urgencias. Los 38 aislamientos restantes fueron de origen hospitalario y pertenecían a pacientes ingresados en los distintos servicios del hospital.

### Aislamientos Productores de BLEE

Los aislamientos identificados como *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras y no productoras de BLEE, se muestran en la Tabla V. En las cuatro instituciones de salud analizaron 1,785 aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* durante el 15 de febrero y 15 de agosto de 2016. De los aislamientos identificados como *E. coli*, el 11.9% fueron productores de BLEE, mientras que en *K. pneumoniae*, lo fue el 8.7%. Para ambos microorganismos, la resistencia mediada por BLEE se dio con mayor frecuencia en cepas de origen comunitario que hospitalario.

**Tabla V.** Aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* identificados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

| BLEEs | Institución de Salud "A"<br>N=471 |                   | Institución de Salud "B"<br>N=145 |                   |
|-------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
|       | <i>Ec</i><br>n=413                | <i>Kp</i><br>n=58 | <i>Ec</i><br>n=124                | <i>Kp</i><br>n=21 |
|       | 17 (4.1 %)                        | 2 (3.4 %)         | 17 (13.7 %)                       | 4 (19.1 %)        |

| BLEEs | Institución de Salud "C"<br>N=783 |                   | Institución de Salud "D"<br>N=386 |                   |
|-------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
|       | <i>Ec</i><br>n=722                | <i>Kp</i><br>n=61 | <i>Ec</i><br>n=353                | <i>Kp</i><br>n=33 |
|       | 135 (18.7 %)                      | 7 (11.5 %)        | 23 (6.5 %)                        | 2 (6.1 %)         |

| BLEEs | Acumulado<br>N=1,785 |           |                    |          |
|-------|----------------------|-----------|--------------------|----------|
|       | <i>Ec</i><br>n=1,612 |           | <i>Kp</i><br>n=173 |          |
|       | 192 (11.9 %)         |           | 15 (8.7 %)         |          |
|       | C<br>n=157           | H<br>n=35 | C<br>n=12          | H<br>n=3 |

N: Aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* identificados; *Ec*: *Escherichia coli*; *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*; C: Comunidad; H: Hospital; BLEEs: Beta-lactamasas de Espectro Extendido.

Navarro-Navarro y col. en 2011 realizaron un estudio de prevalencia de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE en tres hospitales de Hermosillo, Sonora, dos de los cuales son incluidos en este estudio. Ellos encontraron que el 17.9% de los aislamientos de *E. coli*, hospitalarios y comunitarios, fueron productores de BLEE, así como el 15.8% de los aislamientos de *K. pneumoniae*. Un estudio realizado en 2016 por Nevárez-López en seis instituciones de salud en la misma ciudad reportó una prevalencia de 16.8% de *E. coli* y 16.4% de *K. pneumoniae* productores de BLEE. Ambos estudios obtuvieron prevalencias mayores que en el presente trabajo, lo cual puede ser influenciado debido a la ausencia de un hospital de gran capacidad que había participado en los estudios anteriores.

En Monterrey, Nuevo León, en 2011, Garza-González y colaboradores reportaron prevalencias nosocomiales de 30% y 35.9% para *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, respectivamente. Bajo las mismas condiciones, Morfín-Otero y colaboradores en Guadalajara, Jalisco, en 2013, reportaron prevalencia de 16.3% para *E. coli* y 26.9% para *K. pneumoniae*. En Lima, Perú, Galván y colegas realizaron un estudio con pacientes ambulatorios en 2016, mostró que el 16.3% de los aislamientos de *E. coli* procesados eran productores de BLEE.

Uno de los estudios más grandes acerca de resistencia antibiótica en México, fue realizado por Morfín-Otero y colaboradores en 2015, donde participaron 16 instituciones de salud del país hasta por siete años, durante 2005 y 2012. Durante este periodo, encontraron una prevalencia de 39% y 25% de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, respectivamente.

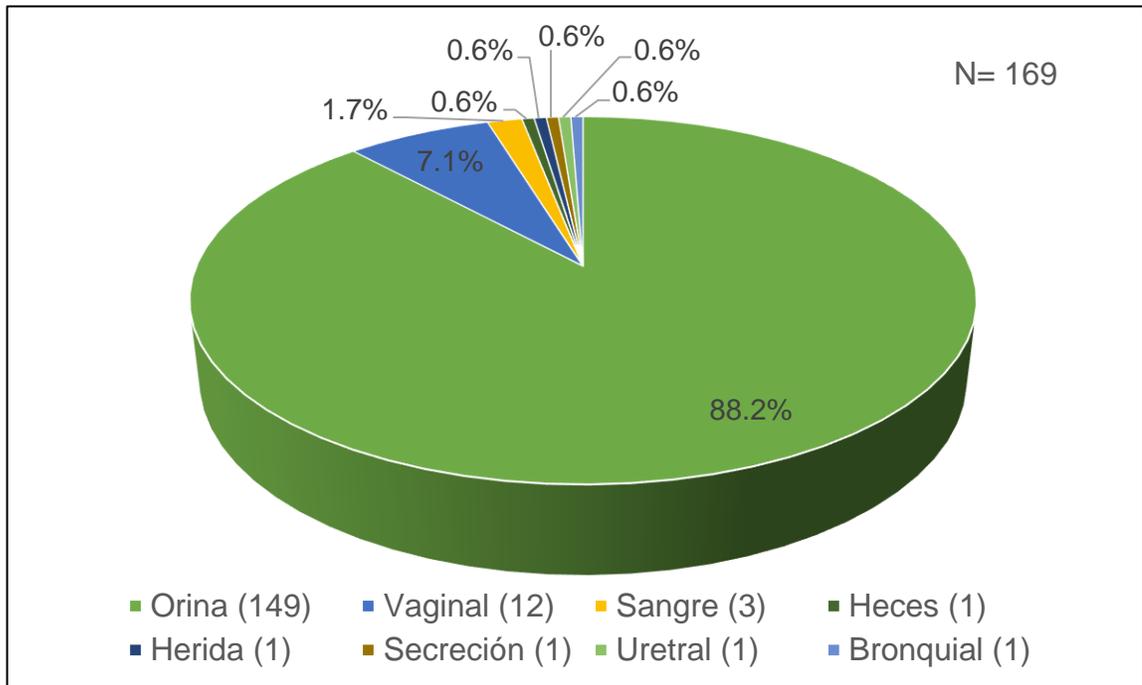
## **Muestras Clínicas**

Los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE de origen comunitario se encontraron mayormente en muestras clínicas de orina, seguidas por muestras vaginales, de sangre, heces, herida, secreción, uretra y bronquial, como se aprecia en la Figura 2. Para los aislamientos de origen hospitalario, las muestras clínicas más frecuentes fueron orina, herida, bronquial, secreción, expectoración, líquido cefalorraquídeo (LCR), sonda Foley, catéter central, sangre y heces (Figura 3). Los servicios hospitalarios donde más frecuentemente se tomaron estas muestras fueron medicina interna (31.6%), unidad de cuidados intensivos (23.7%), cirugía (23.7%), traumatología (10.5%), pediatría (7.9%) y quirófano (2.6%).

En el estudio de Navarro-Navarro y colaboradores (2011) encontraron que las muestras clínicas donde más frecuentemente se encontraron aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE en la comunidad fue en vías urinarias (94.1%) y tracto genital, tracto gastrointestinal y otros (sistema nervioso central, tracto respiratorio y líquidos diversos) (5.1%). En aislamientos hospitalarios se encontraron más frecuentemente en vías urinarias (41.8%), piel y tejido blando (29.1%), sangre (16.4%) y tracto genital, gastrointestinal y otros (12.7%). Estas frecuencias son semejantes a las obtenidas en el presente estudio.

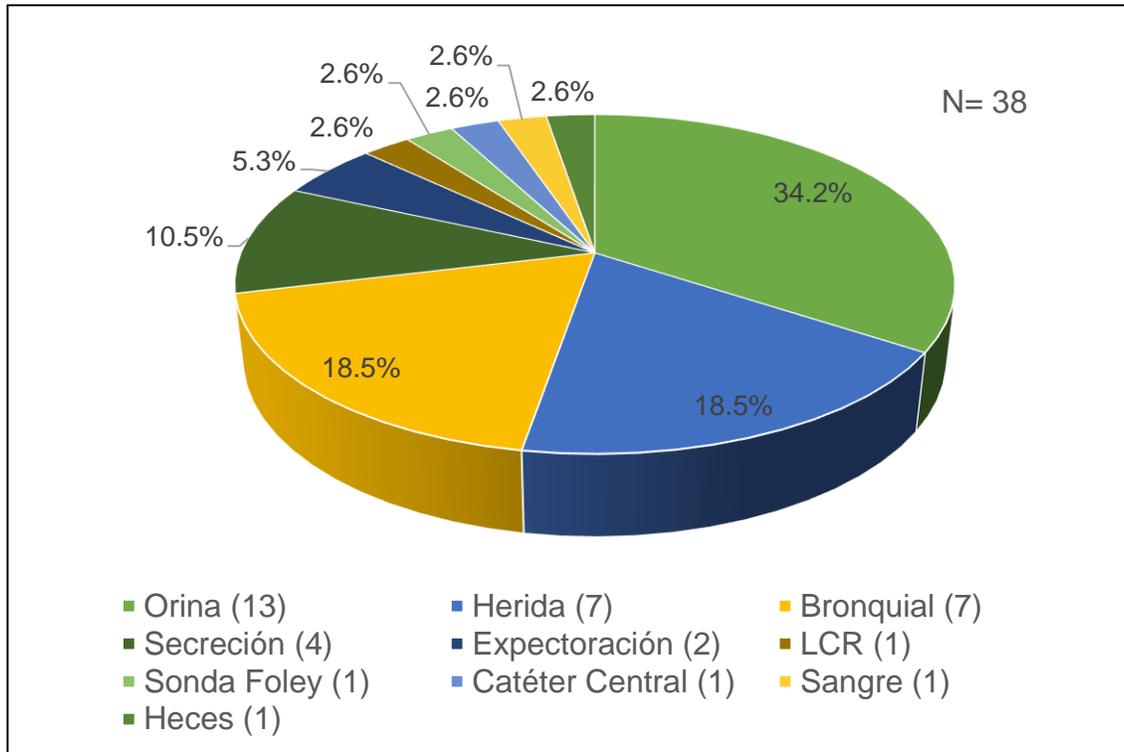
## **Susceptibilidad a los Antibióticos**

Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos contenidos en los informes de los aislamientos incluyeron los antibióticos ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, ceftriaxona, cefepime, aztreonam, ertapenem, meropenem,



**Figura 2.** Muestras clínicas de las que se recuperaron aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE de origen comunitario en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

N: Aislamientos.



**Figura 3.** Muestras clínicas de las que se recuperaron aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE de origen hospitalario en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

N: Aislamientos

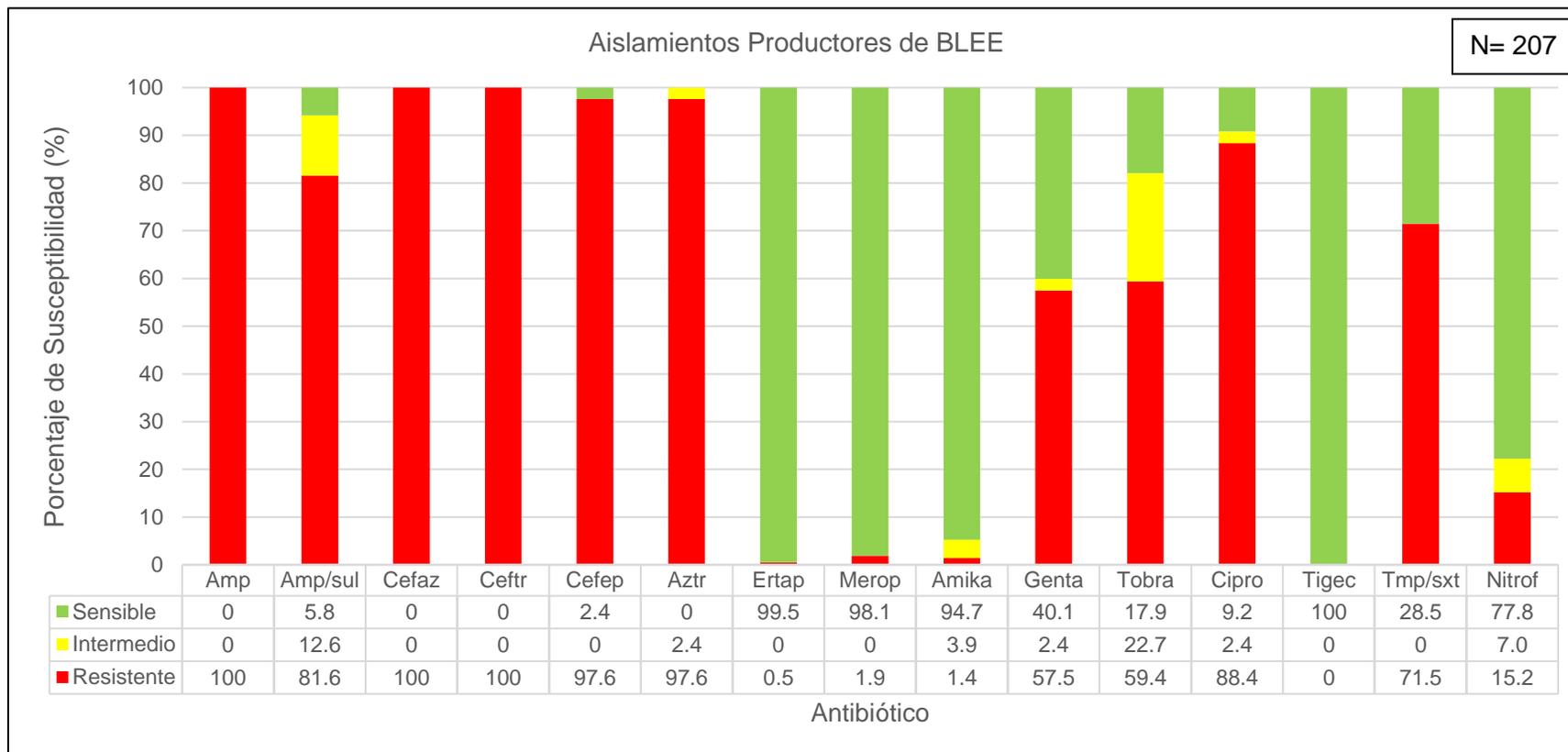
amikacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, tigeciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y nitrofurantoína.

En la Figura 4 se observan los porcentajes de susceptibilidad a los antibióticos para todos los aislamientos recolectados, mientras que en las Figuras 5 y 6 se observan los porcentajes para los aislamientos de origen comunitario y hospitalario, respectivamente.

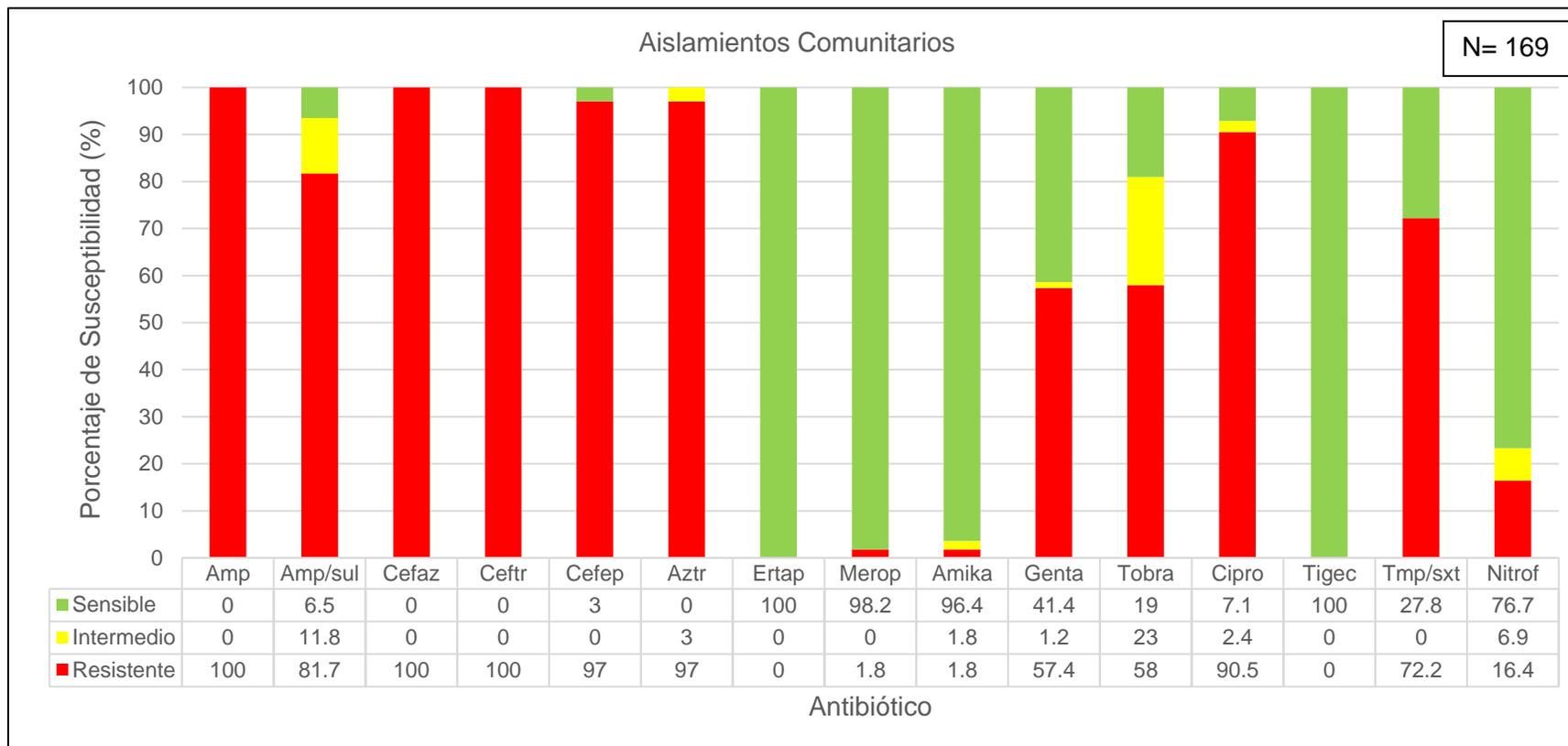
Al ser aislamientos productores de BLEE, la resistencia a beta-lactámicos fue extremadamente alta, como era de esperarse, oscilando entre 97.6% a 100%. La resistencia para beta-lactámico con inhibidor fue de 81.6%. No obstante, solamente cuatro aislamientos de los estudiados (1.9%) fueron resistentes al carbapenémico meropenem y el 100% de los aislamientos en los que se evaluó tigeciclina, fueron susceptibles a este antibiótico. La resistencia a carbapenémicos se encontró solamente en *E. coli*. De acuerdo con *The center for disease dynamics, economics & policy*, en México en 2015 se reportó en *E. coli* una prevalencia de 2% de resistencia a carbapenémicos y 0.0 % de resistencia a tigeciclina, resultados similares a los obtenidos en este estudio (The center for disease dynamics, economics & policy, 2017).

La resistencia a aminoglucósidos detectada fue sumamente variable, ya que solo el 1.4% fueron resistentes a amikacina, pero el 57.5% y 59.4% mostraron resistencia hacia gentamicina y tobramicina, respectivamente. Esto puede deberse a que gentamicina y tobramicina son los aminoglucósidos más comúnmente utilizados, especialmente gentamicina por su excelente sinergia con beta-lactámicos y su bajo costo. Amikacina es generalmente reservada para patógenos resistentes a estos dos antibióticos y pacientes con infecciones graves (Gallegher y MacDougall, 2014).

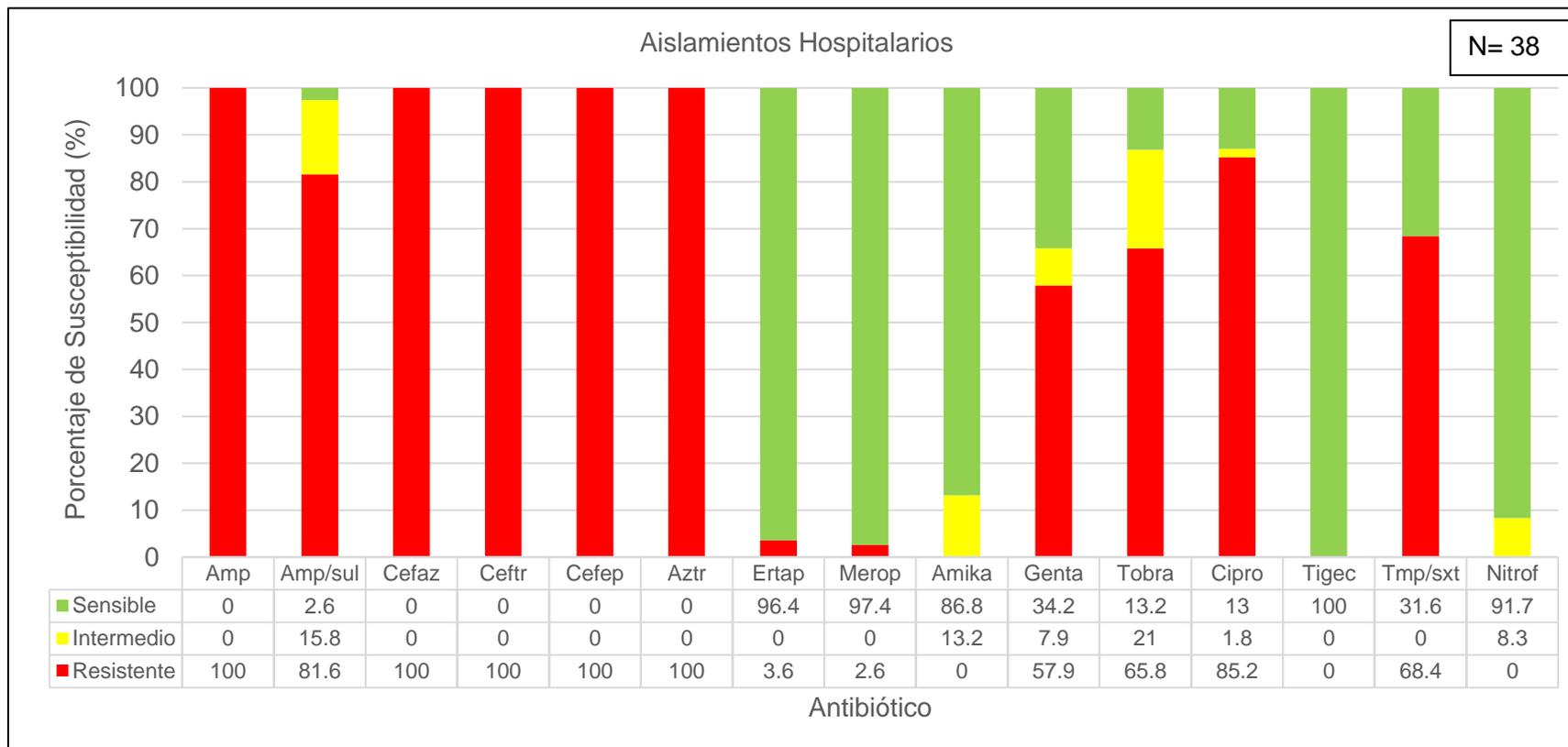
En el presente trabajo se encontró que el 88.4% de los aislamientos productores de BLEE fueron resistentes a ciprofloxacino, 71.5% a trimetoprim/sulfametoxazol y 15.2% a nitrofurantoína, antibióticos comúnmente



**Figura 4.** Porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos de 207 aislamientos productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016. N: Aislamientos; Amp: Ampicilina; Amp/sul: Ampicilina/Sulbactam; Cefaz: Cefazolina; Ceftr: Ceftriaxona; Cefep: Cefepime; Aztr: Aztreonam; Ertap: Ertapenem; Merop: Meropenem; Amika: Amikacina; Genta: Gentamicina; Tobra: Tobramicina; Cipro: Ciprofloxacino; Tigec: Tigeciclina; Tmp/sxt: Trimetoprim/Sulfametoxazol; Nitrof: Nitrofurantoína.



**Figura 5.** Porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos de 169 aislamientos productores de BLEE, de origen comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016. N: Aislamientos; Amp: Ampicilina; Amp/sul: Ampicilina/Sulbactam; Cefaz: Cefazolina; Ceftr: Ceftriaxona; Cefep: Cefepime; Aztr: Aztreonam; Ertap: Ertapenem; Merop: Meropenem; Amika: Amikacina; Genta: Gentamicina; Tobra: Tobramicina; Cipro: Ciprofloxacino; Tigec: Tigeciclina; Tmp/sxt: Trimetoprim/Sulfametoxazol; Nitrof: Nitrofurantoína.



**Figura 6.** Porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos de 38 aislamientos productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016. N: Aislamientos; Amp: Ampicilina; Amp/sul: Ampicilina/Sulbactam; Cefaz: Cefazolina; Ceftr: Ceftriaxona; Cefep: Cefepime; Aztr: Aztreonam; Ertap: Ertapenem; Merop: Meropenem; Amika: Amikacina; Genta: Gentamicina; Tobra: Tobramicina; Cipro: Ciprofloxacino; Tigec: Tigeciclina; Tmp/sxt: Trimetoprim/Sulfametoxazol; Nitrof: Nitrofurantoína.

utilizados para el manejo terapéutico de infecciones en vías urinarias. Generalmente se acepta que para el tratamiento empírico de infecciones no complicadas de vías urinaria se utilice trimetoprim/sulfametoxazol o nitrofurantoína, mientras que el uso de quinolonas (ciprofloxacino) debe ser justificado en casos complicados o de susceptibilidad. Las guías para el tratamiento de infecciones de vías urinarias no complicadas consideran que debe individualizarse el tratamiento en función de la resistencia local y de las condiciones epidemiológicas de cada región. En áreas con una resistencia local menor a 15% o 20% a trimetoprim/sulfametoxazol, se debería utilizar un antibiótico alternativo, como nitrofurantoína, la cual está limitada a infecciones del tracto urinario inferior (Gallagher y MacDoughall, 2014; Rendón y col., 2012).

En México, el tratamiento más comúnmente utilizado en el tratamiento de infecciones en vías urinarias ha sido trimetoprim/sulfametoxazol, sin embargo, debido a los altos niveles de resistencia, este medicamento ya no es una opción terapéutica en la actualidad (Miranda-Romero y col., 2016). En aislamientos productores de BLEE, la prevalencia de resistencia a quinolonas también es alta, por lo que el tratamiento con nitrofurantoína parecería ser una mejor opción en el manejo de infecciones de vías urinarias. Desafortunadamente, como se aprecia en las Figuras 5 y 6, los resultados del presente trabajo muestran niveles importantes de resistencia a este antibiótico en los aislamientos provenientes tanto de individuos ambulatorios como hospitalizados.

Usualmente los plásmidos que contienen genes codificantes para BLEE, también contienen genes de resistencia a aminoglucósidos (especialmente gentamicina), ciprofloxacino y trimetoprim/sulfametoxazol (Pitout y Laupland, 2008), por lo que al estudiar solamente aislamientos productores de BLEE, se esperaban altas prevalencias de resistencia hacia estos antibióticos.

En las Figuras 5 y 6 se aprecian diferencias en los porcentajes de susceptibilidad a antibióticos entre aislamientos de origen comunitario y hospitalario. Varios estudios han reportado la relación que existe entre la cepa extra-intestinal *E. coli* ST131 y la producción de BLEE tipo CTX-M-15 y su frecuencia en la comunidad como causante de infecciones de vías urinarias. Un estudio en Francia y otro en España encontraron diferencias significativas en la resistencia a ciprofloxacino, gentamicina, amikacina y trimetoprim/sulfametoxazol al comparar aislamientos productores de BLEE de *E. coli* ST131 con distintas cepas de dicha bacteria (Nicolas-Chanoine y col., 2014).

### **Tipos de BLEE Identificados**

Los 207 aislamientos estudiados presentaron uno o varios de los genes codificantes para BLEE buscados. El término BLEE se empleará para referirse a CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9, ya que TEM y SHV podrían ser beta-lactamasas de espectro estrecho y no extendido. El tipo de BLEE más frecuentemente encontrado fue CTX-M-1 (87.9%), seguido de TEM (33.3%), SHV (8.2%), CTX-M-9 (4.8%) y CTX-M-2 (0.5%), como se aprecia en la Tabla VI. La frecuencia observada es mayor a 100% debido a que algunos aislamientos portan más de un gen de manera simultánea, como se aprecia en la Tabla VII. De los 207 aislamientos, el 71.0% presentaron un gen BLEE, el 23.2% presentaron dos genes beta-lactamasa y 5.8% presentaron tres genes.

En el estudio realizado en Monterrey en 2011 por Garza-González y colaboradores, determinaron el tipo de BLEE que presentaron 24 aislamientos de *E. coli* y 33 aislamientos de *K. pneumoniae*. En *E. coli* el 66.6% de los aislamientos pertenecían a CTX-M-15 (correspondiente al grupo de CTX-M-1), el 62.5% presentó TEM-1 (no BLEE) y el 29.2% portaban genes codificantes

**Tabla VI.** Identificación preliminar del tipo de BLEE de 207 aislamientos productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

|                                      | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub><br>(+) | <i>bla</i> <sub>TEM</sub><br>(+) | <i>bla</i> <sub>SHV</sub><br>(+) | <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub><br>(+) | <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub><br>(+) |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i><br>n=192     | 171<br>(89.1%)                       | 58<br>(30.2%)                    | 3<br>(1.6%)                      | 9<br>(4.7%)                          | 1<br>(0.5%)                          |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>n=15 | 11<br>(73.3%)                        | 11<br>(73.3%)                    | 14<br>(93.3%)                    | 1<br>(6.7%)                          | 0<br>(0.0%)                          |
| Total<br>N=207                       | 182<br>(87.9%)                       | 69<br>(33.3%)                    | 17<br>(8.2%)                     | 10<br>(4.8%)                         | 1<br>(0.5%)                          |

N: aislamientos

**Tabla VII.** Presencia de uno o más genes codificantes para beta-lactamasa en 207 aislamientos de cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

|                                       | Un gen beta-lactamasa<br>(+) | Dos genes beta-lactamasa<br>(+) | Tres genes beta-lactamasa<br>(+) |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i><br>n= 192     | 144<br>(75.0%)               | 46<br>(24.0%)                   | 2<br>(1.0%)                      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>n= 15 | 3<br>(20.0%)                 | 2<br>(13.3%)                    | 10<br>(66.7%)                    |
| Total<br>N= 207                       | 147<br>(71.0%)               | 48<br>(23.2%)                   | 12<br>(5.8%)                     |

N: aislamientos

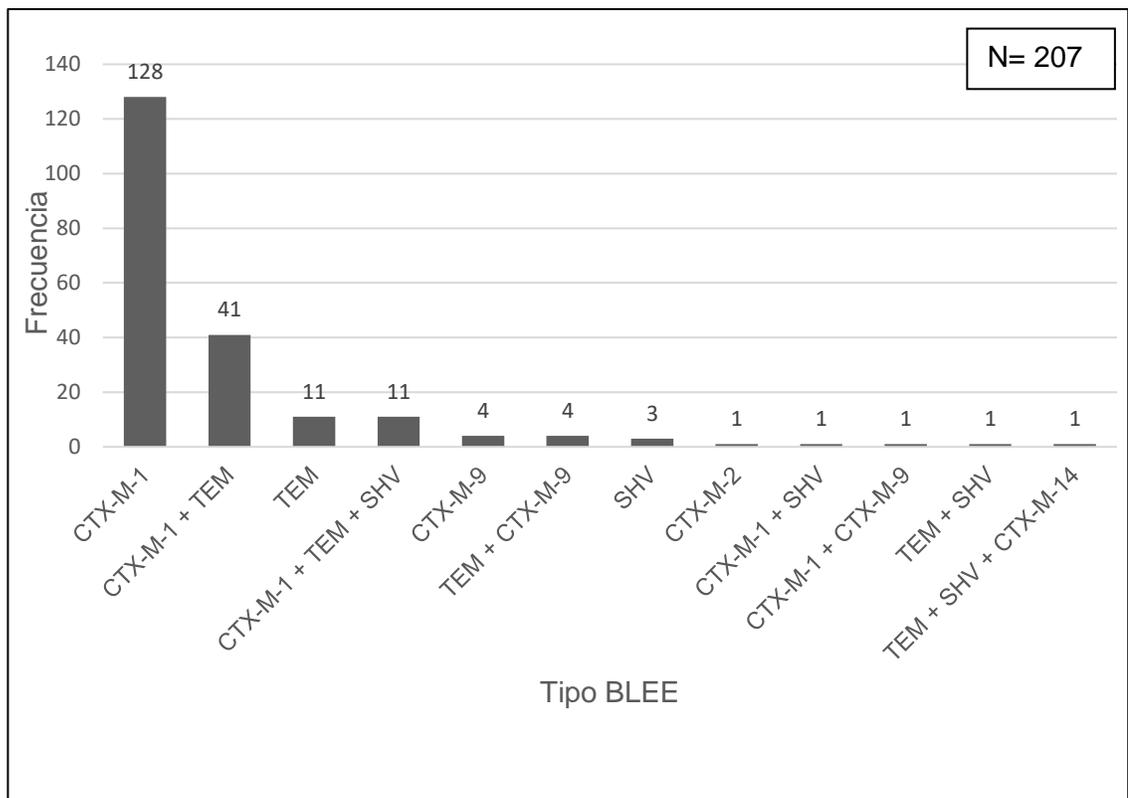
para distintas SHV. En *K. pneumoniae*, el 90.9% de los aislamientos eran BLEE tipo SHV, 42.4% tipo TEM y 6.1% tipo CTX-M-15.

En el trabajo publicado por Morfín-Otero en 2013, encontraron que CTX-M se encontraba presente en el 85% de los aislamientos de *E. coli* y 76% de *K. pneumoniae* productores de BLEE, mientras que SHV se encontró en el 86% de los aislamientos de *K. pneumoniae* y en el 17% de los aislamientos de *E. coli*.

En un estudio reciente realizado en Ciudad Obregón, Sonora (Miranda-Romero y col., 2016) se caracterizaron molecularmente aislamientos comunitarios y hospitalarios de *E. coli*. Los autores encontraron que el tipo de BLEE más frecuente fue CTX-M-15 (97.0%), seguido del tipo SHV (13.5%). Los tres estudios realizaron adicionalmente la búsqueda del gen *bla*<sub>TLA-1</sub>, el cual no fue contemplado en este estudio, sin embargo, en dos de los anteriores trabajos no se detectaron aislamientos portadores de este gen, mientras que, en el realizado en Monterrey, Nuevo León, se encontró en baja frecuencia (5.5%).

Es necesario mencionar que los estudios de Monterrey y Guadalajara se realizaron solamente en aislamientos de origen hospitalario, en cambio, los aislamientos obtenidos en Ciudad Obregón, cerca del 40% eran de origen comunitario y el 60% restante se clasificó de origen hospitalario. En el presente estudio predominaron los aislamientos comunitarios con un 81.6%, mientras que el resto fueron obtenidos de pacientes hospitalizados.

En los estudios de Garza-González y Morfín-Otero encontraron aislamientos con dos genes codificantes para beta-lactamasas, en cambio, Miranda-Romero y colaboradores encontraron que el 8.1% de los aislamientos de *E. coli* presentaron tres genes. En la Figura 7 se pueden observar las frecuencias de beta-lactamasas y sus distintas combinaciones encontradas en este estudio. Los escasos estudios realizados en México acerca de



**Figura 7.** Frecuencia de las distintas combinaciones de beta-lactamasas encontradas en 207 aislamientos productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

N: aislamientos.

caracterización molecular de aislamientos productores de BLEE, realizan la búsqueda de no más de tres genes, los cuales usualmente son para identificar a los tipos CTX-M-1, TEM, SHV y/o TLA-1. En este estudio se decidió incluir la búsqueda para los grupos CTX-M-2 y CTX-M-9 ya que son comunes en Sudamérica y Estados Unidos, respectivamente.

### **Identificación de PMQR**

En 36 aislamientos de *E. coli* y nueve de *K. pneumoniae* se buscaron los genes relacionados con disminución de susceptibilidad a quinolonas. Los aislamientos comunitarios y hospitalarios se analizaron por separado, tanto para *E. coli* como para *K. pneumoniae*. El 50% de los aislamientos comunitarios de *E. coli* presentaron genes codificantes para resistencia a quinolonas (Tabla VIII), mientras que, en los hospitalarios, el 33.3 % presentaron genes *qnr* (Tabla IX).

En 58.3% de los aislamientos de *E. coli*, se encontró el gen *aac(6')-Ib-cr*. Para los aislamientos de *K. pneumoniae* comunitarios (Tabla X) y hospitalarios (Tabla XI), la prevalencia de *qnr* fue de 66.7% en ambos casos, mientras que la frecuencia del gen de acetiltransferasa fue 77.8%. En los aislamientos analizados, el gen *qnrB* fue el más frecuente (72.7%), seguido de *qnrS* (36.4%); la frecuencia observada es mayor a 100% debido a que dos aislamientos presentaron simultáneamente ambos genes. Ningún aislamiento fue positivo para el gen *qnrA*. En cuanto a la búsqueda de genes relacionados con bombas de eflujo, el 5.6% de los aislamientos de *E. coli* presentaron el gen *oqxA*, mientras que el 88.9% de los aislamientos de *K. pneumoniae* contenía el mismo gen; solo uno (11.1%) de esos aislamientos contenía el gen *oqxA* y *oqxB*. Ningún aislamiento presentó el gen *qepA*.

**Tabla VIII.** Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en 26 aislamientos de *E. coli* productores de BLEE, de origen comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, 15 febrero – 15 agosto, 2016.

| No. Aislamiento | Institución | MIC Cipro. | Interpretación | <i>qnr</i> | <i>aac(6')-lb-cr</i> | <i>qepA</i> | <i>oqx</i> |
|-----------------|-------------|------------|----------------|------------|----------------------|-------------|------------|
| 3               | D           | ≥4         | S              | -          | -                    | -           | -          |
| 9               | C           | ≥4         | R              | B          | +                    | -           | -          |
| 11              | C           | ≥4         | R              | -          | -                    | -           | -          |
| 30              | C           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 55              | D           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 59              | C           | ≥4         | R              | S          | +                    | -           | -          |
| 88              | C           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 99              | C           | ≥4         | R              | S          | +                    | -           | -          |
| 102             | C           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 122             | D           | ≤0.25      | S              | -          | -                    | -           | -          |
| 133             | C           | ≥4         | R              | S / B      | +                    | -           | -          |
| 147             | C           | ≥4         | R              | B          | +                    | -           | A          |
| 148             | C           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 155             | D           | 0.5        | S              | -          | -                    | -           | -          |
| 156             | D           | ≥4         | R              | S          | -                    | -           | -          |
| 167             | C           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 182             | C           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 183             | C           | ≥4         | R              | -          | -                    | -           | -          |
| 197             | C           | ≥4         | R              | -          | -                    | -           | -          |
| 198             | C           | ≥4         | R              | S          | +                    | -           | -          |
| 202             | C           | ≥4         | R              | B          | -                    | -           | -          |
| 203             | C           | ≥4         | R              | S          | +                    | -           | -          |
| 206             | C           | ≥4         | R              | B          | -                    | -           | -          |
| 208             | D           | ≥4         | R              | B          | +                    | -           | -          |
| 211             | A           | >2         | R              | B          | -                    | -           | A          |
| 212             | B           | ≤0.25      | S              | B          | -                    | -           | -          |

Cipro: Ciprofloxacino

**Tabla IX.** Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en 10 aislamientos de *E. coli* productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, 15 febrero – 15 agosto, 2016.

| No. Aislamiento | Institución | MIC Cipro. | Interpretación | <i>qnr</i> | <i>aac(6')-lb-cr</i> | <i>qepA</i> | <i>oqx</i> |
|-----------------|-------------|------------|----------------|------------|----------------------|-------------|------------|
| 20              | C           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 26              | A           | >2         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 53              | C           | ≤0.25      | S              | B          | -                    | -           | -          |
| 61              | C           | 1          | S              | B          | -                    | -           | -          |
| 71              | A           | >2         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 78              | B           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 112             | C           | ≥4         | R              | -          | -                    | -           | -          |
| 143             | C           | ≥4         | R              | -          | -                    | -           | -          |
| 154             | A           | >2         | R              | -          | +                    | -           | -          |
| 216             | C           | ≥4         | R              | B          | +                    | -           | -          |

Cipro: Ciprofloxacino

**Tabla X.** Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en seis aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE, de origen comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, 15 febrero – 15 agosto, 2016.

| No. Aislamiento | Institución | MIC Cipro. | Interpretación | <i>qnr</i> | <i>aac(6')-lb-cr</i> | <i>qepA</i> | <i>oqx</i> |
|-----------------|-------------|------------|----------------|------------|----------------------|-------------|------------|
| 28              | D           | ≥4         | R              | B          | +                    | -           | A          |
| 66              | B           | 2          | I              | B          | +                    | -           | A          |
| 75              | A           | >2         | R              | -          | -                    | -           | A / B      |
| 98              | C           | ≥4         | R              | S / B      | +                    | -           | -          |
| 145             | B           | 2          | I              | B          | +                    | -           | A          |
| 166             | D           | ≥4         | R              | -          | +                    | -           | A          |

Cipro: Ciprofloxacino

**Tabla XI.** Detección, mediante PCR, de genes asociados con disminución de la susceptibilidad a quinolonas en tres aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, 15 febrero – 15 agosto, 2016.

| No. Aislamiento | Institución | MIC Cipro. | Interpretación | <i>qnr</i> | <i>aac(6')-Ib-cr</i> | <i>qepA</i> | <i>oqx</i> |
|-----------------|-------------|------------|----------------|------------|----------------------|-------------|------------|
| 38              | 2           | 4          | I              | B          | +                    | -           | A          |
| 120             | 1           | ≤1         | S              | -          | +                    | -           | A          |
| 135             | 2           | ≥4         | R              | S          | -                    | -           | A          |

Cipro: Ciprofloxacino

Algunos de los aislamientos analizados fueron interpretados como sensibles a quinolonas, aun cuando poseen genes PMQR. Esto se debe a que algunas variantes de la familia *qnrB* confieren baja resistencia a quinolonas (Strahilevitz y col., 2009). Ya que estos genes no fueron secuenciados, no se tiene la información de las variantes de los genes *qnr* encontrados. La alta prevalencia del gen *oqx* en *K. pneumoniae* a diferencia de *E. coli* se debe a que estos genes son cromosomales en *K. pneumoniae*, otorgando una resistencia intrínseca (Kim y col., 2009).

En 2013, Reyna-Flores y colaboradores analizaron aislamientos de *E. coli* productores de BLEE de origen comunitario obtenidos de un laboratorio de referencia. En una muestra de 56 aislamientos, tres (5.3%) contenían genes *qnr* (*A*, *B* y *S*), cuatro (7.1%) presentaron el gen *qepA*. La disminución de la sensibilidad a quinolonas en la mayoría de los aislamientos se relacionó con la presencia de *aac(6')-Ib-cr*, ya que se encontró en 52 aislamientos (92.9%). El estudio elaborado por Miranda-Romero (2016) arrojó resultados similares al de Reyna-Flores, siendo el gen de acetiltransferasa el que se asoció principalmente con la disminución de la sensibilidad a quinolonas en el 97.3% de los aislamientos, mientras que solo en uno (2.7%) se encontró el gen *qnrB* y ninguno fue portador del gen *qepA*.

De acuerdo con estudios realizados durante 2012 a 2015 en algunos países Latinoamericanos como Argentina, Chile, Ecuador, México y Venezuela, nuestro país fue el que presentó mayor prevalencia de resistencia a fluoroquinolonas con un 62% de aislamientos resistentes. Después de México, en Latinoamérica se encuentran Ecuador (59%), Venezuela (50%), Argentina (30%) y Chile (29%) en prevalencia de resistencia a quinolonas (*The center for disease dynamics, economics & policy*, 2017).

En un estudio realizado en Argentina en 2013, se evaluó la presencia de PMQR en enterobacterias productoras de BLEE. En 16 aislamientos de *K.*

*pneumoniae*, 10 (62.5%) presentaron el gen *qnrB* y 12 (75%) el gen *aac(6')-Ib-cr*. De los 10 aislamientos analizados de *E. coli*, tres (30%) contenían el gen *qnrB*, mientras que la mayoría (90%) poseía el gen *aac(6')-Ib-cr*. Un estudio similar en Brasil en ese mismo año mostró que el 12.3% de los aislamientos contenían genes *qnr*, principalmente del grupo B (76.9%), mientras que el resto fueron del grupo S. El gen *aac(6')-Ib-cr* se encontró en el 9.4% de los aislamientos totales, es decir, menor frecuencia que los genes *qnr*. El gen *qepA* no fue identificado en el estudio argentino ni en el de Brasil (Rincón-Cruz y col., 2013; Viana y col., 2013).

En la mayoría de los estudios relacionados con PMQR no se realiza la búsqueda de genes *oqx* ya que en su mayoría se encuentran asociados solamente a *K. pneumoniae*, sin embargo, esto debería llevarse a cabo puesto que estos genes se empiezan a detectar en otras enterobacterias. La presencia de estos genes se asocia con disminución de la susceptibilidad a quinolonas, pero también este mecanismo de expulsión de antibióticos puede otorgar resistencia a otros antibióticos, antisépticos y desinfectantes (Andres y col., 2013).

### **Filogrupos**

Se identificaron los filogrupos para 36 aislamientos de *E. coli*; 26 de origen comunitario y 10 hospitalarios. El grupo predominante en los aislamientos comunitarios fue D (n=12), seguido de B2 (n=11), por lo que se consideró que el 88.5% de los aislamientos evaluados presentaban factores de virulencia, mientras que las cepas comensales o del grupo A, fueron el 11.5% (n=3), como se aprecia en la Tabla XII. Dentro de los aislamientos hospitalarios, las cepas virulentas y las comensales se dieron en la misma proporción (Tabla XIII).

**Tabla XII.** Filogrupos de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE, de origen comunitario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

| No. Aislamiento | Hospital | Origen  | Filogrupo |
|-----------------|----------|---------|-----------|
| 3               | A        | Orina   | B2        |
| 9               | C        | Orina   | B2        |
| 11              | C        | Orina   | D         |
| 30              | C        | Orina   | A         |
| 55              | A        | Orina   | D         |
| 59              | C        | Orina   | B2        |
| 88              | C        | Orina   | B2        |
| 99              | C        | Orina   | B2        |
| 102             | C        | Orina   | B2        |
| 122             | A        | Orina   | D         |
| 133             | C        | Orina   | B2        |
| 147             | C        | Orina   | D         |
| 148             | C        | Orina   | D         |
| 155             | A        | Orina   | B2        |
| 156             | A        | Orina   | A         |
| 167             | C        | Uretra  | D         |
| 182             | C        | Orina   | D         |
| 183             | C        | Vaginal | D         |
| 197             | C        | Orina   | D         |
| 198             | C        | Orina   | B2        |
| 202             | C        | Orina   | D         |
| 203             | C        | Orina   | B2        |
| 206             | C        | Orina   | D         |
| 208             | A        | Orina   | B2        |
| 211             | B        | Orina   | A         |
| 212             | D        | Orina   | D         |

**Tabla XIII.** Filogrupos de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE, de origen hospitalario, recolectados en cuatro instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante el periodo comprendido entre el 15 febrero y el 15 de agosto de 2016.

| No. Aislamiento | Hospital | Origen    | Servicio Hospitalario | Filogrupo |
|-----------------|----------|-----------|-----------------------|-----------|
| 20              | C        | Orina     | Cirugía               | D         |
| 26              | B        | Herida    | Traumatología         | D         |
| 53              | C        | Bronquial | UCI                   | A         |
| 61              | C        | Sangre    | Pediatría             | A         |
| 71              | B        | Herida    | Quirófano             | A         |
| 78              | D        | Orina     | Medicina              | B2        |
| 112             | C        | Orina     | Medicina              | A         |
| 143             | C        | LCR       | Cirugía               | D         |
| 154             | B        | Bronquial | Traumatología         | B2        |
| 216             | C        | Herida    | UCI                   | A         |

En los últimos años, la clona de *E. coli* O25:H4-ST131 (comúnmente conocida como *E. coli* ST131) ha surgido como un importante patógeno extra-intestinal multidrogo-resistente a nivel mundial. Varios estudios epidemiológicos han mostrado a *E. coli* ST131 como una de las principales causas de infecciones de tracto urinario y bacteremias tanto en la comunidad como en los hospitales e instituciones de cuidado a la salud en Europa, Asia, África, Norteamérica y Australia. Esta cepa es productora de CTX-M-15, presenta resistencia a fluoroquinolonas y pertenece al filogrupo B2, que predominantemente comprende cepas virulentas de *E. coli* extra-intestinales (Totsika y col., 2011).

Un estudio de aislamientos de *E. coli* uropatógenas realizado por Molina-López y colaboradores en 2011 en la ciudad de México, encontró que el 36.1% de los aislamientos estudiados pertenecía al grupo B2, en los cuales el 76.9% fue identificado como la cepa *E. coli* ST131. Miranda-Romero y colaboradores (2016) reportaron que de los 37 aislamientos productores de BLEE analizados, el 45.9% pertenecía al grupo B2 (n=17/37) y 12 aislamientos (70.6%) se identificaron como la cepa ST131. En el presente estudio no se realizó la identificación de la cepa ST131, sin embargo, el filogrupo B2 se encontró presente en el 36.1% (n=13/36) de las cepas analizadas de distintos orígenes, encontrándose principalmente en orina, semejante a lo encontrado en el estudio realizado por Molina-López.

Tanto el estudio de Molina-López como el de Miranda-Romero reportaron la relación que encontraron en las cepas productoras de BLEE tipo CTX-M y la multirresistencia a antibióticos con la cepa ST131 encontradas en sus trabajos. Dado que en el presente estudio se trabajó con un gran número de aislamientos clínicos productores de BLEE, recuperados de muestras de orina, perteneciente al grupo CTX-M-1 (el cual incluye a CTX-M-15) y con resistencia a distintos grupos de antibióticos, sería conveniente realizar un estudio acerca de la

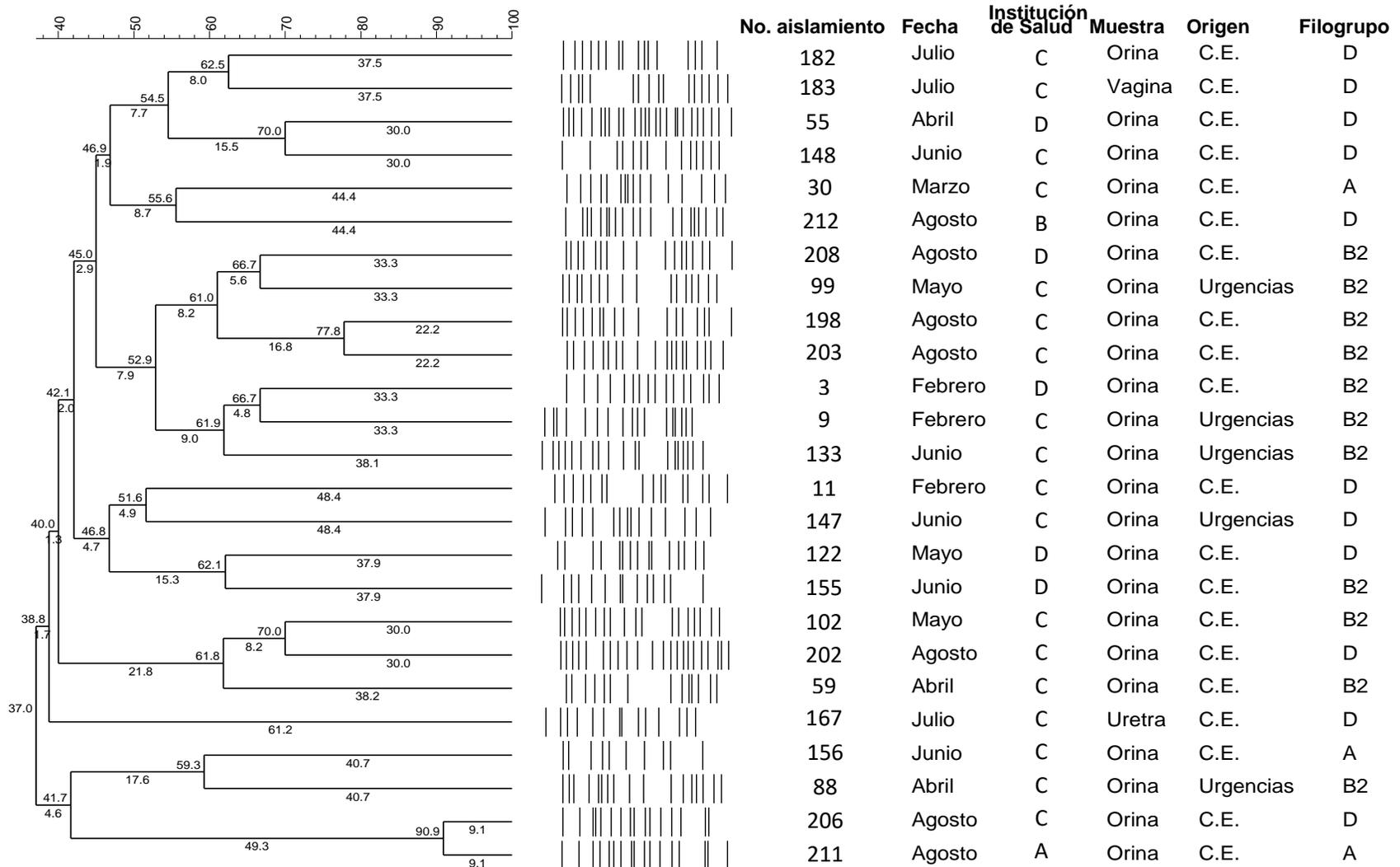
prevalencia de la cepa *E. coli* ST131 en instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora.

### **Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)**

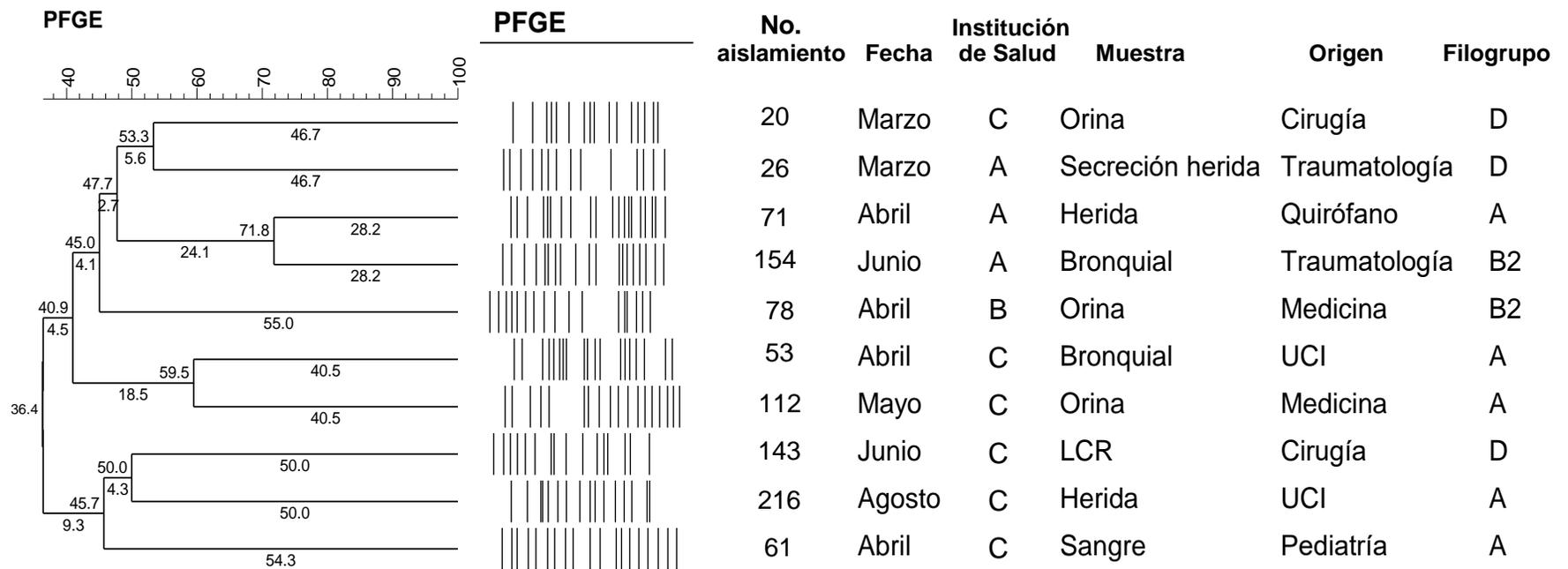
A partir de los 45 aislamientos seleccionados se obtuvieron patrones para 43 de ellos. En los dos aislamientos restantes, no se obtuvieron bandas debido a la degradación del ADN genómico, probablemente por ADNasas. La elaboración de los discos de ADN de esos aislamientos se realizó de nuevo, obteniéndose los mismos resultados. Los análisis de los resultados se realizaron por separado para los aislamientos de *E. coli* de origen comunitario y hospitalario (Figuras 8 y 9, respectivamente). Para *K. pneumoniae* no se realizó esta clasificación debido a la escasa cantidad de aislamientos procesados (Figura 10).

Se consideran cepas relacionadas cuando existe un porcentaje igual o mayor a 80% y clonas cuando existe 100% de similitud (Tenover y col., 1995). En los 43 aislamientos analizados no se encontraron clonas, solamente dos cepas de origen comunitario fueron relacionadas con un 90.9% de similitud, las cuales fueron aisladas en el mismo mes e institución de salud. En los aislamientos de origen hospitalario no se observaron aislamientos relacionados, la mayor similitud fue de 71.8 %. Los distintos patrones de PFGE dentro de los hospitales es indicio de que no hay brotes, lo que supone que en las instituciones de salud participantes hay buenas prácticas clínica.

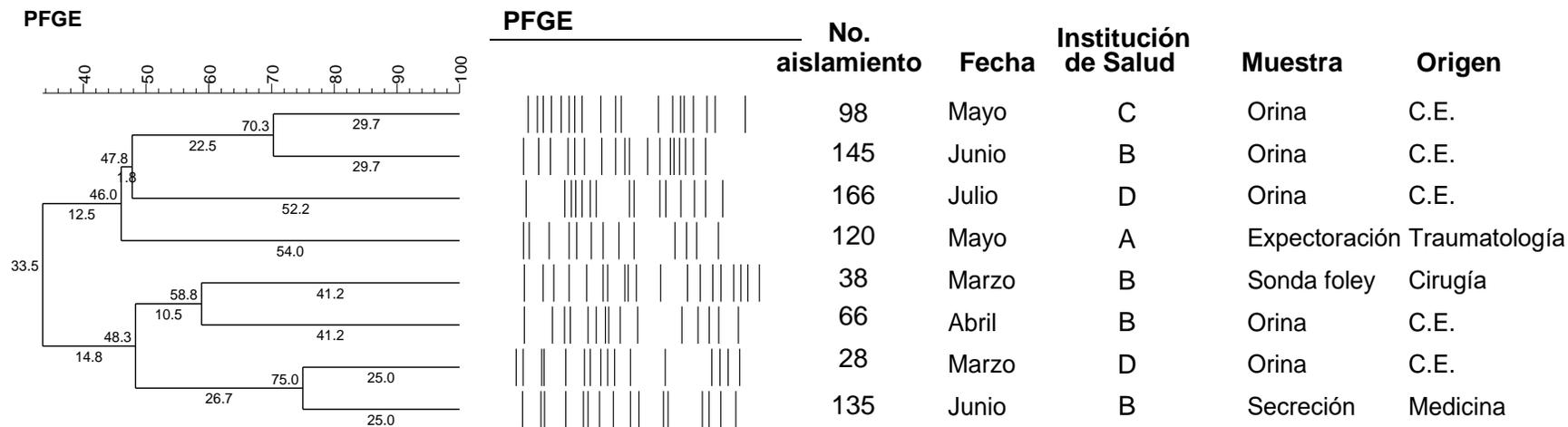
Las limitantes que se presentaron en este experimento fue la cantidad de aislamientos de origen hospitalario procesados, ya que sólo se realizó PFGE en el 34.2% de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* obtenidos en hospitales, donde es más común encontrar brotes de cepas. La segunda



**Figura 8.** Dendrograma de patrones de PFGE de aislamientos comunitarios de *E. coli* productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, 15 febrero-15 de agosto, 2016. C.E: Consulta externa.



**Figura 9.** Dendrograma de patrones de PFGE de aislamientos hospitalarios de *E. coli* productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, 15 febrero-15 de agosto, 2016. C.E: Consulta externa.



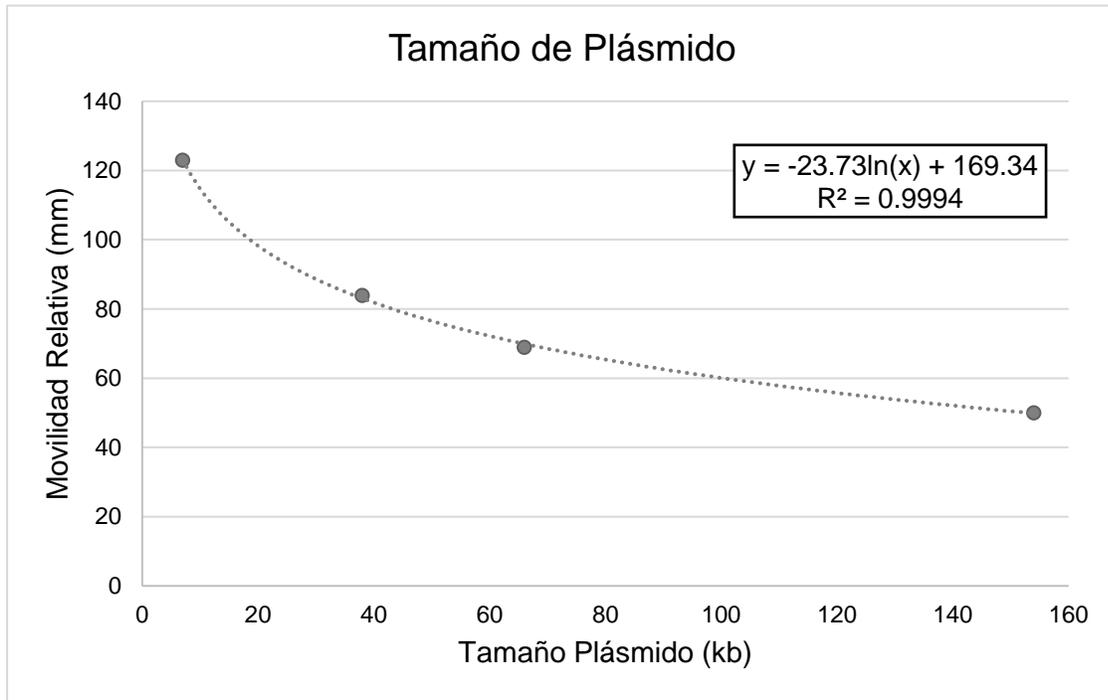
**Figura 10.** Dendrograma de patrones de PFGE de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE, recolectados en cuatro instituciones de salud de Hermosillo, Sonora, 15 febrero-15 de agosto, 2016. C.E: Consulta externa.

limitante está relacionada a la selección de los aislamientos. Estos fueron elegidos en base al tipo de BLEE encontrado y a la resistencia a antibióticos detectada, por lo que se seleccionaron aislamientos representativos de los agrupamientos obtenidos, pero que presentaban diferentes características fenotípicas.

### **Conjugación y Aislamiento de Plásmidos**

Se realizó la conjugación a ocho de los 12 aislamientos que presentaron tres genes de beta-lactamasas. De ellos, tres aislamientos (38, 66 y 147) fueron identificados como transconjugantes, al transferir su plásmido a la bacteria receptora. Se extrajo el ADN plasmídico de las cepas parentales 38, 66 y 147, de sus transconjugantes y de la cepa *Escherichia coli* NCTC 50192. En la Figura 11 se puede observar la gráfica y ecuación obtenidas para la determinación del tamaño de los plásmidos.

La cepa parental del aislamiento 38 contenía dos plásmidos (243 kb y 197 kb) y en al menos una colonia transconjugante se logró la transferencia de ambos plásmidos, mientras que, en otras dos, transfirió solo el de 197 kb. Los aislamientos 66 y 128 parentales poseían un plásmido cada uno, de 205 kb y 173 kb, respectivamente, el cual lograron transferir. La cepa receptora de *E. coli* J53-3 posee resistencia intrínseca a rifampicina y ácido nalidíxico. En la Tabla XIV se puede observar que los plásmidos transferidos contienen genes que otorgan resistencia a ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacino, gentamicina y tetraciclina. La resistencia a cloranfenicol no fue observada, ya que esta es codificada por genes cromosomales y no plasmídicos. Los aislamientos que transfirieron su plásmido fueron obtenidos en hospitales, lo que podría llevar a una rápida diseminación de multirresistencia.



**Figura 11.** Gráfico y ecuación para determinar el tamaño de plásmidos en aislamientos productores de BLEE transconjugantes.

**Tabla XIV.** Resistencia a los antibióticos de aislamientos productores de BLEE transconjugantes.

| <b>Antibiótico</b> | <b>Aislamiento 38</b> | <b>Aislamiento 66</b> | <b>Aislamiento 147</b> |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| Ácido Nalidíxico   | R                     | R                     | R                      |
| Ampicilina         | R                     | R                     | R                      |
| Cefotaxima         | R                     | R                     | R                      |
| Ciprofloxacino     | R                     | R                     | R                      |
| Cloranfenicol      | S                     | S                     | S                      |
| Gentamicina        | R                     | R                     | R                      |
| Tetraciclina       | R                     | S                     | R                      |

R: Resistente; S: Susceptible

Otros estudios realizados en México, como el de Silva-Sánchez y colaboradores en 2011, el de Reyna-Flores y colaboradores en 2013 y el estudio realizado por Miranda-Romero en 2016, han realizado, además de perfil de plásmidos, experimentos de conjugación. El porcentaje de aislamientos que tuvieron éxito en la obtención de transconjugantes fue de 33.3%, 28.2% y 56.3%, respectivamente, mientras que en el presente estudio fue de 37.5%. Silva-Sánchez y colaboradores encontraron que los aislamientos transconjugantes transfirieron solo un plásmido, cuyos tamaños variaban entre 80 y 250 kb. En el estudio realizado por Reyna-Flores no se mencionan las características de las transconjugantes en cuanto al tamaño de los plásmidos transferidos, sin embargo, se especifica que, en todos los aislamientos analizados, se encontraron de uno a cinco plásmidos con tamaños entre <40 kb y 220 kb. Miranda-Romero y colaboradores encontraron que en los transconjugantes se encontraban de uno a dos plásmidos transferidos, con tamaños entre 90 kb y 154 kb. En nuestro estudio, el tamaño de los plásmidos se encontró entre 173 kb y 243 kb (Silva-Sánchez y col., 2011; Reyna-Flores y col., 2013; Miranda-Romero y col., 2016).

En los estudios de Silva-Sánchez y Reyna-Flores no se mencionan resultados de resistencia a antibióticos, excepto por la búsqueda de genes de resistencia a beta-lactámicos y quinolonas mediante PCR en las transconjugantes. Miranda-Romero y colaboradores describieron que la mayoría de las transconjugantes obtenidas presentaron resistencia a cefotaxima, ceftazidima, kanamicina, gentamicina y tetraciclina, pero no a ácido nalidíxico, ampicilina, ciprofloxacino ni cloranfenicol.

## CONCLUSIONES

La resistencia a antibióticos encontrada en el presente estudio muestra mayores porcentajes en aislamientos comunitarios que en hospitalarios, mientras que en las instituciones de salud se presume que hay buenas prácticas de higiene al no encontrarse brotes de cepas. Los antibióticos ciprofloxacino y trimetoprim/sulfametoxazol parecen ser poco exitosos, ya que la mayoría de los aislamientos fueron resistentes a estos, lo cual es un problema dado que son tratamientos empleados en infecciones de vías urinarias, que, como se pudo observar, fue la principal muestra clínica de donde se recuperaron aislamientos productores de BLEE.

Es necesario tener conocimiento de la resistencia local y condiciones epidemiológicas de la región para que se brinden tratamientos adecuados contra las enfermedades infecciosas. Los tipos de BLEE encontrados varían con relación a otros estudios, incluso no presentan gran semejanza a los encontrados en la misma entidad federativa, en el año 2016. Por esta razón no sería recomendable suponer la prevalencia de los tipos de BLEE en Hermosillo, Sonora a partir de otros estudios.

La caracterización genotípica de los aislamientos productores de BLEE permite monitorear la resistencia a antibióticos que se esperaría observar tanto en la comunidad como dentro de instituciones de salud, pues no todos los tipos de BLEE o genes de resistencia a otros antibióticos confieren las mismas características de susceptibilidad.

Los genes PMQR usualmente están relacionados con disminución de susceptibilidad a quinolonas. Algunas variantes de los genes *qnr* no solo otorgan disminución de susceptibilidad, sino resistencia a este grupo de antibióticos. En las instituciones de salud participantes en Hermosillo, Sonora se

encontró una alta prevalencia de estos genes, lo que lleva a una disminución de susceptibilidad e incluso resistencia a quinolonas. Los resultados de la clasificación de filogrupos mostró un alto porcentaje de aislamientos comunitarios con mecanismos de patogenicidad, llevando a sospechar de la cepa *E. coli* ST131 como una probable causa de infecciones en vías urinarias en la comunidad. Los aislamientos que lograron transferir su plásmido contenían al menos tres genes de resistencia a antibióticos beta-lactámicos, además de genes que confirieron resistencia a otros grupos de antibióticos. El riesgo de estos aislamientos radica en que se obtuvieron dentro de las instituciones de salud, lo que podría ocasionar una diseminación de estas cepas de no tomar las precauciones necesarias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Almanza, D. 2010. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Rev Haban Cienc Med.* 9(4): 516-524.
2. Andres, P., Lucero, C., Soler-Bistué, A., Guerriero, L., Albornoz, E., Tran, T., Petroni, A. 2013. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(6): 2467-2475.
3. Betancor, L., Gadea, M., Flores, K. 2006. Genética bacteriana. Sección I en Temas de Bacteriología y Virología Médica. Oficina del libro FEFMUR, p. 59-79. Montevideo, Uruguay.
4. Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 13(1): 42-51.
5. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(1): 1-14.
6. Brolund, A. 2014. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol.* 4(1): 24555.
7. Bush, K., Bradford, P. 2016.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6:a025247.
8. Bush, K., Jacoby, G.A. 2010. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3): 969-976.
9. Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6): 1211–1233.

10. Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. 2003. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. *Clin Microb Rev.* 16(2): 175–188.
11. Cabral, A.B., Melo, R. de C., Maciel, M.A.V., Lopes, A.C.S. 2012. Multidrug resistance genes, including *bla<sub>KPC</sub>* and *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 45(5): 572-578.
12. Cabrera, C.E., Gómez, R.F., Zúñiga, A.E. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med.* 38(2): 149-158.
13. Cantón, R., González-Alba, J.M., Galán, J.C. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol.* 3: 1-19.
14. Carrillo, R.A., García, B.A. 2007. Betalactamasas de Espectro Extendido importancia clínica. Taller del Laboratorio Clínico. Asociación Española de Biopatología Médica. Curso, 2: 17-31.
15. Castro-Alarcón, N., Salgado-Gonzalez, J.F., Ocampo-Sarabia, R.L., Silva-Sánchez, J., Ruíz-Rosas, M. 2014. Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. Guerrero, México. *Tlamati.* 5(1): 14-23.
16. Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J., Nordmann, P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 60(2): 394-397.
17. Center for Disease Control and Prevention. 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States. CDC. U.S Department of Health and Human Services.

18. Center for Disease, Dynamics, Economics and Policy. 2017. Antibiotic Resistance Map. CDDEP. Disponible en: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php> (Fecha de acceso: 25 de julio de 2017).
19. Chaves, J., Ladona, M.G., Segura, C., Coira, A., Reig, R., Ampurdanés, C. 2001. SHV-1  $\beta$ -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(10): 2856-2861.
20. Chia, J.H., Chu, C., Su, L.H., Chiu, C.H., Kuo, A.J., Sun, C.F., Wu, T.L. 2005. Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M  $\beta$ -lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 43(9): 4486-4491.
21. Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 66(10): 4555-4558.
22. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 5(1): 58-65.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 27<sup>th</sup> informational supplement (M100-S27). Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
24. Curello, J., MacDougall, C. 2014. Beyond susceptible and resistant, part II: treatment of infections due to Gram-negative organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 19(3), 156-164.

25. Dahiya, S., Singla, P., Chaudhary, U., Singh, B. 2015. Carbapenemases: a review. *Int J Adv Health Sci.* 2(4): 11-17.
26. Dhillon, R.H., Clark, J. 2012. ESBLs: A Clear and Present Danger? *Crit Care Res Pract.* 2012:625170.
27. Doi, Y., Park, Y.S., Rivera, J.I., Adams-Haduch, J.M., Hingwe, A., Sordillo, E.M., Paterson, D.L. 2013. Community-Associated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase–Producing *Escherichia coli* Infection in the United States. *Clin Infect Dis.* 56(5): 641–648.
28. Drawz, S.M., Bonomo, R.A. 2010. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 23(1): 160-201.
29. Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.* 14(1): 90-103.
30. Falagas, M.E., Karageorgopoulos, D.E. 2009. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 73(4): 345-354.
31. Gallagher, J.C., MacDougall, C. 2014. Parts 1 and 2 in Antibiotics Simplified. Jones & Bartlett Learning, p. 1-91, 97-104. Burlington, MA.
32. Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., Tamariz, J. 2016. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Rev Med Hered.* 27(1): 22-29.
33. García-Vázquez, E., García-Hernández, A.M., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J.A., Gómez, J. 2011. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter.* 24(2):57-66.
34. Garza-González, E., Mendoza-Ibarra, S.I., Llaca-Díaz, J.M., González, G.M. 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of

- extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 60(1): 84-90.
35. Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E. 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mex.* 51(3): s439-s446.
36. Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S. 2012. Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 50(4):1140-1146.
37. Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilionis, A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 47(3): 137-146.
38. Guillén, R., Velázquez, G., Lird, G., Espínola, C., Laconich, M., Carpinelli, L., Menacho, C., Ortellado, J., Fariña, N., Franco, L., Rodríguez, F., Russomando, G. 2015. Detección molecular de betalactamasas de espectro (BLEE) en enterobacterias aisladas en Asunción. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 13(2):8-16.
39. Guzmán-Blanco, M., Labarca, J.A., Villegas, M.V., Gotuzzo, E. 2014. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. *Braz J Infect Dis.* 18(4): 421-433.
40. Hsu, A.J., Tamma, P.D. 2014. Treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections in children. *Clin Infect Dis.* 58(10): 1439-1448.
41. Iredell, J., Brown, J., Tagg, K. 2015. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. *BMJ* 351, h6420.
42. Kaufmann, M.E. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med.* 15: 33-50.

43. Kieser T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*.12:19–36.
44. Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.C., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. 2009. oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(8): 3582-3584.
45. Lahey Clinic. 2016.  $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzyme. Lahey Clinic. Disponible en: <http://www.lahey.org/Studies/> (Fecha de acceso: 08 de enero de 2017).
46. Martínez-Buitrago, E., Hernández, C., Pallares, C., Pacheco, R., Hurtado, K., Recalde, M. 2014. Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali-Colombia. *Infectio*. 18(1): 3-11.
47. Martínez-Martínez, L. 2006. Mecanismos de adquisición de resistencia a los antibióticos. *Jano*. 1.624: 75-80.
48. Massé, D.I., Cata Saady, N.M., Gilbert, Y. 2014. Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals (Basel)*. 4(2): 146–163.
49. Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harb. 352-355
50. Minarini, L.A., Poirel, L., Cattoir, V., Darini, A.L.C., Nordmann, P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother*, 62(3): 474-478.
51. Miranda-Romero, A.L., Silva-Sanchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios, H., Sánchez-Pérez, A., Reyna-Flores, F. 2016. Molecular characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from hospital-and community-acquired infections in NW Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 87(1): 49-52.

52. Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R.M., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M.E., Hernández-Castro, R., Manjarrez-Hernández, H.Á. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries*. 5(12): 840-849.
53. Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Silva-Sánchez, J., Rodríguez-Noriega, E., Laca-Díaz, J., Tinoco-Carrillo, P., Garza-Ramos, U. 2013. Characterization of *Enterobacteriaceae* isolates obtained from a tertiary care hospital in Mexico, which produces extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Microb Drug Resist*. 19(5): 378-383.
54. Morfin-Otero, R., Noriega, E.R., Dowzicky, M.J. 2015. Antimicrobial susceptibility trends among gram-positive and-negative clinical isolates collected between 2005 and 2012 in Mexico: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 14(1): 53-67.
55. Muñoz-Price, L.S., Jacoby, G.A., 2013. Extended-spectrum beta-lactamases. Disponible en: [http://iranuptodate.ir/contents/mobipreview.htm?29/53/30553?source=see\\_link](http://iranuptodate.ir/contents/mobipreview.htm?29/53/30553?source=see_link) (Fecha de acceso: 10 de enero de 2017).
56. Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P. 2008. Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 14(s1): 42-52.
57. Navarro-Navarro, M., Robles-Zepeda, R.E., Garibay-Escobar, A., Ruiz-Bustos, E. 2011. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de  $\beta$ -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Salud Publica Mex*. 53(4): 341-344.
58. Nevárez-López, A.R. 2016. Vigilancia epidemiológica de la resistencia bacteriana en seis instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo.

59. Nicolas-Chanoine, M.H., Bertrand, X., Madec, J.Y. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* 27(3): 543-574.
60. NOM-017-SSA2-2012. 2012. Para la vigilancia epidemiológica. Norma Oficial Mexicana. Disponible en:  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5288225&fecha=19/02/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5288225&fecha=19/02/2013)  
(Fecha de acceso: 10 de agosto de 2017).
61. NOM-051-SCT2-2011. 2011. Especificaciones para la clasificación de las sustancias infecciosas y especificaciones especiales y adicionales para la construcción y ensayo (prueba) de los envases y/o embalajes que transporten sustancias infecciosas de la división 6.2 categoría "A". Norma Oficial Mexicana. Disponible en:  
[http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5194833&fecha=13/06/2011](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5194833&fecha=13/06/2011)  
(Fecha de acceso: 23 de febrero de 2016).
62. Paterson, D. L., Bonomo, R. A. 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18(4): 657-686.
63. Peleg, A.Y., Hooper, D.C. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 362(19): 1804-1813.
64. Perea-Mejía, L.M, Inzunza-Montiel, A.E. 2014. Genética Bacteriana. Cap 2 en Bacteriología Médica Basada en Problemas. El manual moderno, p. 15-29. Ciudad de México.
65. Pitout, J.D., Laupland, K.B. 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 8(3): 159-166.
66. Poorabbas, B., Mardaneh, J., Rezaei, Z., Kalani, M., Pouladfar, G., Alami, M.H., Soltani, J., Shamsi-Zadeh, A., Abdoli-Oskooi, S., Saffar, M.J., Alborzi, A. 2015. Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. *Iran J Microbiol.* 7(3):127-135.

67. Ramirez M.S., Traglia G.M., Lin D.L., Tran T., Tolmasky M.E. 2014. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. *Microbiol Spectrum*. 2(5): 1-15.
68. Rapley, R. 2010. Molecular biology, bioinformatics and basic techniques. Ch 5 in *Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press, p. 138-194. Cambridge, UK.
69. Rendon, M.A., Reyes, A., Rosas, J.B., Rodríguez, F. 2012. Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. Coli* y *E. Coli* ESBL a quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y nitrofurantoína. *Med Int Mex*. 28(5): 434-439.
70. Reyna-Flores, F., Barrios, H., Garza-Ramos, U., Sánchez-Pérez, A., Rojas-Moreno, T., Uribe-Salas, F.J., Silva-Sanchez, J. 2013. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 76(3): 396-398.
71. Rincón-Cruz, G., Radice, M., Sennati, S., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., Gutkind, G., Di Conza, J.A. 2013. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(7): 924-927.
72. Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H. R., González-Díaz, E., Morfín-Otero, R. 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomedica*. 34(1): 181-190.
73. Seija, V., Vignoli, R. 2006. Principales grupos de antibióticos. Sección IV en *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del libro FEFMUR, p. 631-647. Montevideo, Uruguay.

74. Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S.M.D., Kamal, M.A. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 22(1): 90-101.
75. Silva-Sánchez, J. 2006. Resistencia a antibióticos. *Rev Latinoam Microbiol.* 48(2): 105-112.
76. Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Bello-Diaz, M., Sanchez-Perez, A., Rojas, T., Garza-Ramos, U. 2011. Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates in Mexico. *Microb Drug Resist*, 17(4): 497-505.
77. Stein, G.E., Babinchak, T. 2013. Tigecycline: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 75(4): 331-336.
78. Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 22(4): 664-689.
79. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33(9): 2233.
80. Totsika, M., Beatson, S.A., Sarkar, S., Phan, M.D., Petty, N.K., Bachmann, N., Schembri, M.A. 2011. Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. *PloS One*, 6(10): e26578.
81. Ventola, C.L. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P&T.* 40(4): 277–283.
82. Viana, A.L., Cayo, R., Avelino, C.C., Gales, A.C., Franco, M.C., Minarini, L.A. 2013. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *J Med Microbiol.* 62(9): 1326-1331.

83. Vignoli, R., Seija, V. 2006. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Sección IV en Temas de Bacteriología y Virología Médica. Oficina del libro FEFMUR, p. 649-662. Montevideo, Uruguay.
84. World Health Organization. 2014. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. World Health Organization. Disponible en:  
<http://who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/> (Fecha de acceso: 15 de marzo de 2017).
85. World Health Organization. 2016. Antibiotic Resistance. World Health Organization. Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> (Fecha de acceso: 30 de agosto de 2017).