



**Universidad
Norbert Wiener**

**UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA
MÉDICA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE CEPAS
PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO
EXTENDIDO AISLADAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS, 2018**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA
EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Presentado por:

Bachilleres: ANCAJIMA BALLENA, MARIA ELENA

SOTELO ALEJOS, ROCIO MARIBEL

LIMA – PERÚ

2019

Dedico este trabajo a Dios por brindarme la fortaleza necesaria para poder seguir adelante y continuar luchando día tras día para el logro de mis metas.

A todas las personas que amo, en especial a mis padres Alberto e Isabel por estar siempre a mi lado, por forjarme los conocimientos necesarios para ser mejor persona cada día y apoyarme en todo momento.

Autora: María Ancajima B.

Dedico este trabajo a mí amado esposo Willians por su sacrificio y esfuerzo constante, por apoyarme en mi carrera pensando en nuestro futuro.

A mí querida hija Liana, por ser mi fuente de inspiración.

A mis padres Estéban y Rosa por ser mi pilar y modelo de superación y trabajo.

Autora: Rocío Sotelo A.

Agradecimientos

A todo el equipo del Proyecto de investigación sobre resistencia antimicrobiana nacional y al equipo del servicio de Microbiología donde se realizó el presente estudio, por las facilidades brindadas en este estudio.

A nuestro asesor el Dr. Juan Carlos Benites Azabache por brindarnos su apoyo y comprensión durante este proceso.

Al el Lic. T.M Jeel Moya-Salazar por la asesoría científica y metodológica en el presente estudio.

Autoras

ASESOR DE TESIS

Dr. Juan Carlos Benites Azabache

JURADO

Presidente

Dr. Pedro Javier Navarrete Mejía

Secretaria

Dra. Claudia Milagros Arispe Alburqueque

Vocal

Dr. Javier Francisco Casimiro Urcos

ÍNDICE

CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	10
1.1.Planteamiento del problema.....	10
1.2. Formulación del problema.....	11
1.3. Justificación.....	11
1.4. Objetivos.....	12
1.4.1. Objetivo General.....	12
1.4.2. Objetivos Específicos.....	12
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. Antecedentes.....	13
2.2. Base Teórica.....	26
2.3. Terminología básica.....	45
2.4. Hipótesis.....	45
2.5. Variables.....	45
CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO.....	47
3.1. Tipo y nivel de investigación.....	47
3.2. Población y muestra.....	47
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	48
3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	52
3.5. Aspectos éticos.....	53
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
4.1. Resultados.....	54
4.2. Discusión.....	57
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
5.1. Conclusiones.....	61
5.2. Recomendaciones.....	61
Referencias.....	63
Anexos.....	75

RESUMEN

Introducción: la resistencia a betalactámicos en población pediátrica no ha sido evaluada previamente en nuestra comunidad.

Objetivo: caracterizar fenotípica y molecularmente las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes pediátricos durante el segundo semestre del año 2018.

Metodología: estudio prospectivo, de corte transversal y descriptivo en 30 muestra de pacientes pediátricos, se identificaron las cepas productoras de BLEE por el método de susceptibilidad antimicrobiana y los puntos de corte de la CLSI, se caracterizaron los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX por PCR convencional.

Resultados: se analizaron principalmente muestras de orina (90%), los agentes bacterianos de mayor frecuencia fueron *E. coli* (76%) y *K. pneumoniae* (10%). Las cepas de *E. coli* presentaron el gen *bla*CTX (87%), gen *bla*TEM (83%) y *bla*SHV (74%). Dos cepas (66.7%) de *K. pneumoniae* presentaron los genes *bla*CTX y *bla*TEM simultáneamente, y dos cepas (66.7%) de *P. mirabilis* presentaron el gen *bla*CTX.

Conclusión: las características fenotípicas y moleculares de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en pacientes pediátricos fueron indicativos de resistencia bacteriana; el gen *bla*CTX se presentó en mayor frecuencia.

Palabras claves: resistencia a beta-Lactamasas, pediatría, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, reacción en cadena de la polimerasa.
(<http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>)

Abstract

Introduction: the resistance to β -lactamase in pediatric population not has been yet evaluate previously in our community.

Objective: characterized phenotypical and molecularly extended-spectrum β -lactamase-producing (ESBL) strains isolated of pediatric patients during 2018.

Methodology: Prospective, cross-sectional, descriptive study in 30 samples of pediatric patients where we analyzed producing-ESBL strains with CLSI antimicrobial susceptibility test and breakpoints. Likewise, we characterized *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX genes with conventional PCR.

Result: We analyzed mostly urine samples (90%) where *E. coli* (76%) was the most frequently bacterial genus, following of *K. pneumoniae* (10%). The 87% of *E. coli* isolates showed *bla*CTX gen, followed of *bla*TEM (83%) and *bla*SHV (74%) genes. Two (66.7%) strains of *K. pneumoniae* showed the *bla*CTX and *bla*TEM genes at the same time, and two (66.7%) strains of *P. mirabilis* showed the *bla*CTX gen.

Conclusion: the phenotypical and molecular characteristic of the extended-spectrum β -lactamase-producing strains isolated of pediatric patients were indicative of bacterial drug-resistance showing *bla*CTX gen as the most frequently.

Key words: resistance to beta-lactamases, pediatrics, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, polymerase chain reaction.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La generación de bacterias resistentes a drogas, “súper-bacterias”, preocupa a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y a las instituciones sanitarias en el mundo entero. Este fenómeno amenaza con ser la principal causa de mortalidad para el 2050.¹

Las enfermedades infecciosas, principalmente las infecciones bacterianas, se han incrementado amenazantemente debido a los altos niveles de resistencia antibiótica. Esta situación exige, cada vez con mayor frecuencia, el uso terapéutico de antimicrobianos que resultan costosos y cuyas dosis terapéuticas son más estrechas, sin descontar los nocivos efectos adversos.²

Una causa importante de resistencia a los antibióticos es la producción de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que impide la actividad antimicrobiana de los antimicrobianos β -lactámicos, fármacos de amplio uso debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro. Se han identificado BLEE en enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, entre otras.³⁻⁵ Estas bacterias son las principales responsables de las infecciones de tracto urinario en todos los grupos etarios; sin embargo, resulta prioritaria su atención en población pediátrica, vulnerable principalmente

a infecciones intrahospitalarias. Los tratamientos para agentes bacterianos resistentes deteriorar su calidad de vida.⁶⁻¹¹

En este sentido, caracterizar a los agentes infecciosos, no solo desde la fenotipificación sino también molecularmente, resulta necesario a fin de dilucidar las mejores estrategias de tratamiento y posteriores controles epidemiológicos.

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son las características fenotípicas y moleculares de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en pacientes pediátricos, 2018?

1.3. Justificación

Se han reportado con frecuencia cepas productoras de BLEE en diversos centros de salud de nuestra comunidad, en todos los niveles de complejidad de la atención sanitaria. Recae una responsabilidad en los laboratorios de conocer la frecuencia de aislamientos productores de BLEE, no solo fenotípicamente si no también el reconocimiento de sus componentes moleculares y por tanto, su impacto en la transmisión hospitalaria y comunitaria.

Es de interés conocer las cepas productoras de BLEE en población pediátrica, esta población en particular presenta alta vulnerabilidad a enfermedades infecciosas. Las infecciones en general, y en particular las nosocomiales, son en pediatría un desafío que deben enfrentar los sistemas de salud en todo el

mundo.

Los resultados de la investigación nos darán a conocer la real situación de resistencia bacteriana y las variables moleculares que las desencadenan; información valiosa no solo para tratamientos más eficaces, sino también para la formulación de estrategias de prevención y promoción.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Describir las características fenotípicas y moleculares de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en pacientes pediátricos, 2018.

1.4.2. Específicos

- Conocer las características fenotípicas de las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido de pacientes pediátricos según sexo y grupo etario.
- Identificar el género y especie bacteriana de aislamientos productores de betalactamasas de espectro extendido.
- Determinar la frecuencia del gen *bla*TEM en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido.
- Determinar la frecuencia del gen *bla*SHV en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido.
- Determinar la frecuencia del gen *bla*CTX en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Zhang X (2018) China; desarrolló una investigación epidemiológica molecular, se evaluaron los mecanismos de resistencia a los medicamentos de las cepas de CR-KP en pacientes pediátricos (Shanghai, China). El estudio se desarrolló en 41 aislados clínicos (CR-KP) de esputo, orina, sangre o drenaje. Las muestras fueron obtenidas entre julio del 2014 y mayo del 2015 (Shanghai Children's Medical Center). A todas las muestras se les realizó tipificación de secuencia multilocus (MLST), prueba de sensibilidad a antibióticos, amplificación por PCR y secuenciación de los genes asociados a la resistencia a los fármacos. El análisis de MLTS reveló 16 ST diferentes, la mayor frecuencia estuvo representada en ST11 (19.5%), ST25 (14.6%), ST76 (14.6%), ST37 (9.8%). Todos los casos de CR-KP mostraron fenotipos de MDR y fueron resistentes a ceftazidima, imipenem, piperacilina/tazobactam, ceftriaxona, ampicilina/sulbactam, y aztreonam. Se confirmaron como productores de carbapenemasas NDM-1 (56.1%, 23/41), IMP (26.8%, 11/41) y se detectaron KPC-2 (22.0%, 9/41). Todas las cepas de CR-KP contenían al menos una de β -lactamasa de espectro extendido (TEM, SHV, OXA-1, y CTX-M) y en seis casos se tuvieron genes con BLEE y AmpC (DHA-1). Entre los genes de penicilinasas y β -lactamasa los más frecuentes fueron SHV (92.7%,38/41), TEM-1 (68.3%,28/41), CTX-M-14 (43.9%,18/41), CTX-M-15 (43.9%,14/41) y OXA-1 (14.6%,6/41). La investigación concluye que los productores de NDM-1 fueron cepas predominantes de CR-KP de niños, seguidas por las cepas productoras de IMP y KPC. NDM-1 y IMP-4.

Además, resaltan que el conocimiento de la epidemiología molecular y el mecanismo resistente a los medicamentos de CR-KP puede tener un profundo efecto en el tratamiento clínico, medidas de control de infecciones y políticas de salud pública para niños.¹²

Varela Y (2017), Venezuela; desarrollaron un estudio para determinar la diversidad genética de cepas extraintestinales de *E. coli* (n=12) productoras de BLEE, como CTX-M, TEM, y SHV. Las cepas *E. coli* tuvieron sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro y el análisis de sensibilidad antimicrobiana fue realizado por concentración mínima inhibitoria (CIM). Se utilizó reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de los genes BLEE, los factores de virulencia y grupos filogenéticos. El estudio demostró que la totalidad de las cepas analizadas presentaron resistencia a las cefalosporinas, quinolonas y aminoglucósidos. Los grupos filogenéticos más frecuentes fueron los grupos A y B1, seguidos por D y B2. En el grupo B2 el gen más frecuente fue el fimH que intrínsecamente es un factor de virulencia. Todas las *E. coli* analizadas presentaron blaCTX-M (predominantemente del tipo blaCTX-M-8), y dos de estas cepas presentaron simultáneamente blaCTX-M-9, blaCTX-M-147 y blaCTX-M-65. El estudio concluye que en las cepas de *E. coli* evaluadas no predominó ningún filogrupo en particular, pero que estas presentaron diversidad genética y albergaron diferentes genes BLEE y de virulencia. Además, este fue el primer reporte de la variante blaCTX-M-65 en Venezuela y de la variante blaCTX-M-147 en el mundo entero.¹³

Yu J (2016), China; describió un brote de *Klebsiella pneumoniae* en la sala

neonatal de un hospital. Evaluó 27 cepas no repetitivas aisladas de neonatos y cinco cepas aisladas en todo el pabellón neonatal. Utilizaron PCR, el método de dilución en agar y la tipificación de secuencia multilocus (MLST) para analizar el (los) gen (es) de resistencia, la susceptibilidad antimicrobiana y la homología, respectivamente. Además, aplicaron estrictamente la educación del personal sanitario, la higiene de las manos, el cambio de toga exterior y el aislamiento del paciente infectado. Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana muestran que todas las cepas fueron resistentes a múltiples fármacos. Los resultados de MLST y PCR revelaron que, en este estudio, todas las cepas productoras de KPC-2 son Sequence Type (ST) 11 (ST11) (n= 22) y todas las cepas productoras de NDM- 1 son ST20 (n= 4) o ST888 (n=1). Las cepas ambientales se identificaron como *K. pneumoniae* ST11 (n= 3) KPC-2 positivo, y *K. pneumoniae* ST20 de NDM-1 positivo (n= 2). Los porcentajes de aislados con BLEE con CTX-M-15, blaCTX-M- 14, blaTEM-1 fueron de 9.4%, 84.3% y 68.8% respectivamente. Los genes AmpC β-lactamasa no se detectaron en los aislamientos. Concluyen que la *K. pneumoniae* ST11 KPC-2 positivo y *K. pneumoniae* ST20 NDM-1 se asociaron con este brote.¹⁴

Loyola S (2016), Perú; en la investigación se analizaron los teléfonos móviles del personal de salud. Se desarrolló un estudio de cohorte buscando identificar los niveles de contaminación por Enterobacteriaceae en teléfonos móviles y los factores de riesgo asociados; se evaluó al personal que portaba teléfonos en la UCI pediátrica. Realizaron una encuesta de referencia sobre los factores asociados con la contaminación a teléfonos. Los hisopos fueron recolectados de los teléfonos cada dos semanas. Durante cinco meses, las tres cuartas partes de

los trabajadores de la salud nunca descontaminaron sus teléfonos, y el 47% informaron que usaron los teléfonos en la UCI >5 veces mientras trabajaban. Los posibles factores de riesgo identificados no tenían una fuerte asociación con las muestras positivas (riesgo relativo, 0.7-1.5), independientemente de la importancia. La mitad de los teléfonos fueron colonizados con *Enterobacteriaceae* al menos una vez durante los 4 muestreos obtenidos en promedio durante el período de estudio. La mitad de los aislamientos fueron multirresistentes (MDR) y el 33% fueron productores de β -lactamasa de espectro extendido. El estudio concluye que la contaminación bacteriana en los teléfonos de los trabajadores de salud fue frecuente y aparentemente distribuida aleatoriamente a través de los hospitales sin una agrupación clara o factores de riesgo fuertemente asociados para tener una muestra positiva. Según este estudio, los teléfonos pueden considerarse depósitos bacterianos potenciales transmisores de cepas MDR y BLEE.¹⁵

Sethaphanich N (2016), Tailandia; realizó un estudio para identificar susceptibilidad bacteriana de enterobacterias productoras de BLEE; revisaron cepas aisladas de pacientes pediátricos para determinar las tasas de susceptibilidad a diversos antibióticos en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE y no productoras de BLEE. Se realizó una revisión de la prevalencia de la infección adquirida en la comunidad y la gravedad en 849 cepas analizadas, donde 40% fueron positivas para BLEE. Además de las cefalosporinas, las cepas productoras de BLEE también fueron menos probable que sea susceptible a otros antibióticos, como quinolonas, gentamicina, netilmicina y cotrimoxazol, más de 90% de los cuales aún eran

susceptibles a amikacina, carbapenémicos, colistina y tigeciclina. Alrededor del 20% de las infecciones comunitarias adquiridas fueron causadas por cepas productoras de BLEE. Se encontró que las cepas productoras de BLEE en la comunidad tenían más probabilidades de ser susceptibles a gentamicina, netilmicina y cefepima que los encontrados en el hospital. La Infección causada por las cepas productoras de BLEE no se asoció significativamente con el choque séptico. En conclusión, el aumento de la infección causada por Enterobacteriaceae productoras de BLEE limita la disponibilidad de antibióticos; dado que los carbapenémicos son necesarios para tratar infecciones graves, amikacina, cefepima y piperacilina / tazobactam son opciones posibles para terapia consolidativa o para infección no grave.¹⁶

Guillén R (2015), Paraguay; identificaron los genes CTX-M2, SHV, TEM, y PER-2 en 232 enterobacterias productoras de BLEE, estudio de diseño transversal entre julio del 2007 y abril del 2008, se incluyeron las muestras dos hospitales de referencia. La detección molecular de los genes se realizó por PCR empleando oligonucleótidos específicos. Se determinó que 192 cepas (83%) portaron al menos un gen BLEE. La frecuencia de los genes fue de 49% para el gen *bla*CTX-M2, 45% para el gene *bla*SHV, 40% para *bla*TEM y 7% para el gen *bla*PER-2. Cuarenta y siete por ciento de las cepas (90 aislamientos) presentó más de un gen, donde la combinación *bla*CTXM2 + *bla*TEM + *bla*SHV la más frecuente observada en 32 muestras analizadas. El estudio concluye que el gen BLEE más frecuente fue *bla*CTX-M2.¹⁷

García C (2015), Perú; describe las características fenotípicas y moleculares de

Klebsiella pneumoniae productora de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en centros de atención neonatal de Perú. Se recolectaron 176 aislamientos de *K. pneumoniae* consecutivos no duplicados, aislamientos de sangre de neonatos de ocho hospitales públicos generales de Lima, Perú. Destacan que la tasa general de producción de BLEE fue del 73,3% (n=129). Las tasas de resistencia fueron más altas entre los aislamientos BLEE en comparación con los no productores: 85.3% versus 12.8% para gentamicina ($p<0.01$), 59.7% versus 8.5% para trimetoprima-sulfametoxazol ($p<0.01$), 45.0% versus 8.5% para ciprofloxacina ($p<0.01$), y 36.4% versus 12.8% para amikacina ($p<0.01$). Detectaron un total de 359 genes β -lactamasa que codifica entre 129 cepas productoras de BLEE; 109 aislamientos (84.5%) portaban dos o más genes. Entre las 37 cepas productoras de BLEE aislados al azar, CTX-M-15 y CTX-M-2 fueron los BLEE más comunes. El estudio concluye señalando que la mayoría de los aislamientos (92%) pertenecían al grupo *K. pneumoniae*. La electroforesis en gel de campo pulsado mostró que circulaban múltiples clones de *K. pneumoniae* entre las ocho unidades neonatales incluidas.¹⁸

Görgeç S (2015), Turquía; estudio que determinó la prevalencia de los genes de beta-lactamasa, susceptibilidades a los antibióticos y relaciones clonales de los aislados de *E. coli* productores de BLEE, en 76 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de orina (n = 26), sangre (n = 25) y herida (n = 25). Las muestras incluidas fueron de pacientes hospitalizados identificados como agentes de infección nosocomial según los criterios de los CDC entre junio del 2010 y junio del 2011. La susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos se detectó mediante el método de difusión del disco Kirby-Bauer de acuerdo con las

recomendaciones de CLSI. La producción de BLEE se probó mediante el método de difusión de doble disco, y las E-test de cefotaxima / cefotaxima-ácido clavulánico (AB Biodisk, Suecia) se usaron para resultados indeterminados. Investigaron la presencia de genes de BLEE TEM, SHV, CTX-M, OXA-2, grupo OXA-10, PER, VEB y GES mediante PCR utilizando cebadores específicos. El método de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se utilizó para la detección de relaciones clonales entre las cepas. La mayoría de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se aislaron a partir de muestras de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (35%), medicina interna (16%) y cirugía general (13%). Todas las 76 cepas se encontraron susceptibles a imipenem, meropenem y amikacina; sin embargo, todos fueron resistentes a cefotaxima y ceftriaxona. Las tasas de susceptibilidad de los aislamientos a cefoxitina, ertapenem, cefoperazona/sulbactam, piperacilina-tazobactam, gentamicina, ciprofloxacina, cefepima, amoxicilina-ácido clavulánico, aztreonam y ceftazidima fueron del 96%, 83%, 63%, 61%, 50%, 41 %, 25%, 21%, 20% y 18%, respectivamente. Entre los aislamientos de *E. coli*, se encontró que la frecuencia de los genes CTX-M, TEM, OXA-2, PER, SHV y OXA-10 del grupo beta-lactamasa fue de 89.5%, 59.2%, 15.8%, 14.5%, 11.8% y 3.9%, respectivamente, mientras que ninguno de los aislados fue positivo para los genes BLEE VEB y GES. En una (1.3%) cepa, ninguno de los genes investigados fue detectados. Los análisis de PCR de los aislamientos revelaron que 25 albergaban genes CTX-M y TEM juntos, mientras que 20 albergaron solo CTX-M y dos genes TEM alojados únicamente. El único gen SHV no se detectó en ninguno de los aislados. El PFGE no demostró una relación clonal importante entre los aislamientos productores de BLEE. Los autores concluyen que las

enzimas tipo CTX-M eran altamente endémicas entre las cepas de *E. coli* nosocomiales productoras de BLEE en su hospital, con la diseminación policlonal de las bacterias productoras de BLEE sin ningún clon epidémico dominante. Consideran que se necesitan más estudios para explicar la relación entre los clones epidémicos y los plásmidos con el uso de análisis de plásmidos y métodos de tipificación de secuencia multilocus.¹⁹

Colquechagua AF (2015) Perú; el estudio describe la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de heces provenientes del Instituto Nacional de Salud del Niño en Lima, Perú durante julio del 2012 a marzo del 2013. Las colonias sospechosas se asilaron en agar Karmali, se identificaron con métodos convencionales de bioquímica, y fueron confirmados con el fenotipo BLEE por el método CLSI o americano. Utilizaron PCR para la determinación genotípica de los genes CTX-M. Se asilaron enterobacterias productoras de BLEE en 86.1% de muestras (n=235). El orden de frecuencia incluyó a *E. coli* con 86.1% a *K. pneumoniae* con 7.9%, *P. mirabilis* con 1.3% y otras con 4.6%. Ochenta y nueve por ciento de los aislamientos presentaron el gen *bla*CTX-M. La resistencia a la amikacina fue de 1,3% y todos los aislados fueron sensibles al imipenem y meropenem. Concluyen sobre la alta frecuencia del gen CTX-M en aislamientos de muestras de heces de pacientes ambulatorios del Instituto Nacional de Salud del Niño.²⁰

Uz Zaman T (2014), Arabia Saudita; es estudio investiga los genes de resistencia antibiótica entre los primeros aislamientos de la *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (CRKP) durante un brote en el

hospital. Para ello realizaron un análisis de susceptibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan Walkaway (Siemens, Alemania) y fueron confirmados por E-test (AB Biodisk, Suecia). Investigaron bla-CTX-M, -SHV, -TEM, -OXA-48, OXA-A, B, C, D, -KPC, -NDM, -VIM, -IMP, integron 1, y proteínas externas (OMP) 35 y OMP-36 por PCR y secuenciamiento directo de los productos de PCR. Los aislados se tipificaron por secuencia mediante tipificación de secuencia multilocus (MLST). Todos sus aislamientos fueron resistentes a cefotaxima, ceftazidima, cefepima, ciprofloxacina y piperacilina-tazobactam, y 91% (21/23) fueron resistentes a amikacina y gentamicina. Todos los aislamientos excepto dos de un solo paciente fueron resistentes a uno de los carbapenémicos. Los genes CTX-M y SHV se detectaron en todos los aislados, siendo los tipos CTX-M-15 y SHV-1 predominantes entre estas betalactamasas de espectro extendido (BLEE). El TEM-1 se encontró en todos excepto en un aislado (aislado 3). Significativamente, el gen OXA-48 también se encontró en todos los aislamientos. El gen OXA-D se encontró en tres de las 23 cepas aisladas. Los genes KPC, NDM, OXA-A, -B, -C, VIM e IMP estaban ausentes en todos los aislados. El MLST reveló que ST29 es el tipo de secuencia predominante (17/23 aislamientos, 74%). Tres eran ST709 y uno cada uno era ST37 y ST111; un aislado tenía un ST desconocido. Los autores concluyen que su estudio evaluó probablemente el primer brote reportado de infección por *Klebsiella* resistente multirresistente/carbapenémico al gen OXA-48 de Arabia Saudita. Además, aunque la presencia de BLEE tales como OXA, CTX-M, TEM y SHV son razones predecibles para la resistencia, las variaciones en el gen Omp-36 también podrían haber precipitado este fenómeno. El estudio también demostró que más de un tipo de clon fue responsable de este brote aparente

informado y que ST29, un clon no informado anteriormente en esta región, fue el principal clon responsable.²¹

Millán Y (2014) Venezuela; estudio que determinó el perfil de distribución de grupos filogenéticos y la detección genética de factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena (ECUP) productoras de β -lactamasa CTX-M-15. Veintiocho cepas fueron aisladas de pacientes con infección del tracto urinario (ITU) que asistieron al Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Venezuela, durante el lapso comprendido entre enero del 2009 y julio del 2011. La determinación de los grupos filogenéticos y la detección de seis genes de virulencia, fimH, fyuA, kpsMTII, usp, PAI y papAH, se realizó mediante amplificación por PCR. Quince cepas de 28 se ubicaron principalmente en el filogrupo A, seguidos por el B2 (12/28) y D (1/28). No se observó una relación directa entre la recurrencia o gravedad de la ITU y la distribución de los filogrupos. Todos los factores de virulencia estudiados se encontraron con la frecuencia más alta en el grupo B2. El perfil de virulencia prevalente estuvo conformado por la asociación de tres genes principales: fimH, fyuA y kpsMTII y en menor frecuencia, por la presencia de otros determinantes como usp, PAI y/o papAH. Estos resultados indican que la mayoría de ECUP estuvieron dotadas de tres propiedades virulentas importantes: adhesión, captación de hierro y evasión de la fagocitosis, las cuales favorecieron la producción de ITU recurrentes. Este es el primer trabajo que describe la asociación de grupos filogenéticos con el potencial de virulencia de cepas de ECUP productoras de β -lactamasa CTX-M-15 en Venezuela.²²

González AC (2013), Venezuela; el estudio determinó las características microbiológicas y moleculares asociadas con las infecciones causadas por *Klebsiella* productoras de BLEE. Para ello analizaron 17 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de neonatos de NHRU con infecciones nosocomiales y 11 aislamientos de pacientes hospitalizados en la UCIN entre junio y noviembre de 2009. Caracterizaron por la prueba de difusión de agar in vitro y la MIC, la producción de β -lactamasa, la presencia de genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M y genotipado, detectando un alto porcentaje de resistencia a los betalactámicos y la presencia de BLEE: TEM, SHV y CTX-M en 41.2 y 82% de las cepas obtenidas en HRNU y en ALCU, respectivamente. El fenotipo BLEE positivo se detectó en el 17,6% de las cepas HRNU y en el 91% de las cepas aLCU. El análisis genotípico por REP-PCR detectó varios clones que sugieren que los clones resistentes de *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE son endémicos, no solo la circulación específica y la transmisión de un único común entre los pacientes. En conclusión, describen que las cepas de *Klebsiella pneumoniae* que producen b- lactamasas circulan en estas unidades críticas estudiadas que representan un reto terapéutico necesario para luchar contra ellas.²³

Zhang WL (2011), China; estudiaron la resistencia a los medicamentos y los genotipos de la β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) y *Escherichia coli* productora de AmpC- β - lactamasa y *Klebsiella pneumoniae* aislada de recién nacidos en Uygur y Han en Urumqi. Para ello realizaron la prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer) para detectar la resistencia a los medicamentos de 299 cepas a 22 tipos de antibióticos. Los genes de resistencia de BLEE y las cepas

productoras de AmpC- β -lactamasa se amplificaron mediante PCR multiplex y los subtipos se confirmaron mediante el análisis de la secuencia de ADN. Se seleccionaron 148 cepas aleatorizados y se secuenciaron, estas incluían cepas productoras de BLEE: TEM, SHV, CTX-M-1 o CTX-M-9-positivas. Las tasas de resistencia a antibióticos entre Uygur y Han en recién nacidos difieren significativamente en las *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE a Sulfametoxazol- Trimetoprima (80.0% (40/50) y 56.0% (28/50), $\chi(2) = 6.6176$, $p=0.0101$), en *E. coli* que producen resistencia a Sulbactam y Cefoperazona (54.2% (32/59) y 94.0% (47/50), $\chi(2) = 21.4512$, $p=0.0000$), y en AmpC- β -lactamasa productora de *Klebsiella pneumoniae* a Sulbactam y Cefoperazona (100.0% (20/20) y 72.2% (26/36), $\chi(2) = 6.7633$, $p=0.0093$) y a Amikacin (65.0% (13/20) y 25.0% (9/36) , $\chi(2) = 8.6246$, $p=0.0033$). Aunque se detectó el gen SHV de *Escherichia coli* productora de BLEE en recién nacidos, solo el 3,4% (2/59) fue detectable en Uygur y no fue detectable en recién nacidos de Han, los genes del grupo TEM, CTX-M-1 y CTX-M-9 se detectaron en todos los aislados 38.0% (19/50). Entre las cepas detectadas, los subtipos de TEM y CTX-M-1 fueron principalmente TEM-1 y CTX-M-15, respectivamente; mientras que los subtipos de SHV y CTX-M-9 incluyeron SHV-1, 2, 11, 12, 27, 61, 99 y CTX-M-9, 14, 24, 27, 65, respectivamente. Las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que portan dos o más tipos de genotipos de BLEE fueron 56.7% (42/74) - 90.0% (63/70). Dos especies que portaban el gen AmpC en dos tipos de recién nacidos solo se agruparon en los subtipos de DHA-1 y CMY-44, y otros subtipos no se detectaron en absoluto. Además, se detectaron *E. coli* productoras de BLEE positivas a TEM de los recién nacidos en Uygur a una tasa mayor que la de los recién nacidos de Han (71.2% (42/59) y 50.0% (25/50), $p=0.0235$),

mientras que no hubo diferencias en otros genotipos detectados entre dos tipos de recién nacidos ($\chi^2 (2) < 3.7780, p > 0.05$). Los autores concluyen que no hubo diferencias significativas en la resistencia a los antibióticos y la distribución del genotipo de *K. pneumoniae* y *E. coli* entre dos recién nacidos de ambas ciudades, y que estas dos bacterias detectadas en este estudio tenían genes de resistencia múltiple y mostraron alta resistencia a los antibióticos de β -lactamasa.²⁴

Feizabadi MM (2010), Irán; el estudio identificó los genes que codifican cepas productoras de BLEE, incluidos los grupos TEM, SHV y CTX-M, entre 89 aislamientos de *K. pneumoniae* en el hospital de Labbafinejad, Irán, mediante PCR y caracterizarlos por secuenciación directa de productos de PCR. Se identificaron las *K. pneumoniae* con pruebas bioquímicas. La susceptibilidad de los aislamientos a 17 agentes antimicrobianos diferentes se determinó usando el método de difusión en disco de agar. Se utilizó como prueba confirmatoria fenotípica para seleccionar los aislados productores de BLEE. Para amplificar el bla (SHV), el ADN molde se extrajo por el método de ebullición. El ADN del plásmido se extrajo utilizando un kit de minipreparación y se usó como plantilla en la PCR para la detección de bla (TEM) y bla (CTX-M). Los productos de PCR seleccionados se secuenciaron y analizaron. Todas las cepas fueron susceptibles a imipenem. Las tasas de resistencia a diferentes antibióticos fueron en el siguiente orden: aztreonam (79.7%), cefexime (67.4%), cefpodoxima (66.2%), cefotaxima (65.1%), ceftazidima (61.7%). La prueba confirmatoria fenotípica detectó 62 aislamientos (69,7%) como *K. pneumoniae* productora de BLEE. La prevalencia de genes que codifican BLEE fue la siguiente: bla (TEM)

54% (n = 48), bla (SHV) 67,4% (n = 60), bla (CTX-MI) 46,51% (n = 40) y bla (CTX-M-III) 29% (n = 25). Los genes bla (CTX-M-II) y bla (CTX-M-IV) no se detectaron. Todos los tipos bla (TEM) se caracterizaron como bla (TEM-1) y todos los bla (CTX-M-I) se identificaron como bla (CTX-M-15). Los tipos de SHV se caracterizaron como SHV-5, SHV-11 y SHV-12. Los autores concluyen que la tasa de BLEE en el Hospital Labbafinejad fue un 25% mayor en un estudio de 4 años que finalizó en marzo de 2009. Al parecer el gene bla (TEM-1), bla (SHV-5), bla (SHV-11), bla (SHV -12), y bla (CTX-M-15) son los BLEE dominantes entre las cepas resistentes de *K. pneumoniae* en Irán.²⁵

2.2. Base Teórica

2.2.1. Generalidades

El primer antibiótico globalizado y descubierto por Alexander Fleming (1881-1955) en 1928 fue la penicilina. Luego, solo 10 años después que Ernest Chain (1906-1979) entendió el alcance del descubrimiento de Fleming y desde 1938 comenzó a trabajar en la penicilina con lo que se llamó el "Grupo de Oxford" que incluía al químico Chain, el fisiólogo Florey y dos bioquímicos y bacteriólogos Edward Abraham y Norman Heatley.²⁶

Los antibióticos son sustancias naturales, sintéticas, o una mezcla de ambas que inhiben, disminuyen o destruyen a los microorganismos que infectan a los seres vivos. Se agrupan conforme la función de su mecanismo de acción (destrucción de pared celular, alteración de bombas de flujo de membrana, daño a las subunidades ribosomales, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, etc.), y

conforme su actividad frente a microorganismos infecciosos.²⁷

La clasificación según su estructura química permite diferenciar varios grupos de antimicrobianos como las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, sulfamidas, principalmente. Estos medicamentos conformen su acción pueden ser denominados de amplio- espectro y afectan a las bacterias gram positivas y negativas.²⁸

La diferencia entre un antibiótico de amplio espectro frente a uno de corto espectro está en la utilidad más extensa del primero que actúa sobre un único y principal grupo de microorganismos target.

2.2.2. Betalactámicos

El efecto bactericida de los antibióticos betalactámicos implica la inhibición de la síntesis de la pared celular, y este efecto ocurre a través de la unión covalente a la proteína de unión a la penicilina (PBP por sus siglas en inglés), que es una enzima peptidoglicano transpeptidasa que cataliza los pasos finales en la formación de la pared celular. Hasta la fecha se han identificado varios PBP, y son exclusivos de las bacterias. Además, el espectro y los efectos de las diferentes betalactamasas están determinados por los PBP a los que estos antibióticos se unen.²⁹

Son compuestos de acción bactericida lenta con escasa toxicidad para el ser humano y que poseen un amplio espectro terapéutico frente a microorganismos.³⁰

2.2.2.1. Penicilinas

Fueron los primeros antibióticos de origen biológico usados como alternativa terapéutica. El primer tratamiento clínico exitoso con penicilina se logró en 1930 por George C. Paine en la Enfermería Real de Sheffield, cuando utilizó gotas de la solución de Fleming para tratar la conjuntivitis en recién nacidos. Aunque George C. Paine no publicó sus resultados, pero muchos años, esto dio campo y mostro una opción para las compañías farmacéuticas americanas comenzaron a producir penicilina G, en competencia con la Penicilina F producida en el Reino Unido, y con la Penicilina V descubierta en Austria (11,15).³¹ Todas las penicilinas son bactericidas debido a su capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, conforme describimos antes.

La Penicilina G es el antibiótico de primera elección en las infecciones causadas por estreptococos y en la sífilis.³² Sus principales representantes son dicloxacilina y oxacilina. Le sigue a esta penicilina, los aminopenicilinas, como la ampicilina y amoxicilina. Tanto la ampicilina como la amoxicilina (ambas α -aminopenicilinas), son dos penicilinas derivadas, tienen mayor estabilidad ácida y un mejor efecto sobre las bacterias Gram negativo productoras de penicilinas natural, y al asociarse con inhibidores de betalactamasa (sulbactam y/o ácido clavulánico) también son efectivas contra *Haemophilus influenzae*.

Luego, Beecham desarrollo estas aminopenicilinas, y también preparó meticilina en 1959 y nafcilina en 1960, dos derivados de penicilina adicionales que eran mucho más estables contra las betalactamasas, y estos fueron seguidos pronto

por los compuestos flucloxacilina y dicloxacilina, que mostró una estabilidad ácida aún mayor. Conforme se dieron nuevos desarrollos de drogas en esos años, en 1945, Brotzu y colaboradores aislaron el hongo *Cephalosporium acremonium* del agua de mar cerca de una salida de aguas residuales mientras se estudia un brote de fiebre tifoidea en Italia. Pese a que su grupo continuó trabajando en la extracción y producción de la sustancia activa, fue Abrahams en el laboratorio de Florey en Oxford, que analizó *C. acremonium* y evidenció que la cadena lateral en la molécula de β -lactama incluye en un efecto antibacterial. Luego de este hito, fue posible extraer penicilina N del hongo, y tuvo un efecto sobre los aislamientos Gram negativo más fuerte que la penicilina. Entre los productos de degradación de penicilina N, Abraham y colaboradores encontraron cefalosporina C, que resultó ser más estable que las penicilinas contra las betalactamasas bacterianas.³³ Este descubrimiento finalmente condujo a la producción semisintética de cuatro generaciones de cefalosporinas.

2.2.2.2. Cefalosporinas

Son antibióticos similares a las penicilinas que poseen modificaciones químicas del anillo 7-amino- cefalosporánico, estas modificaciones de penicilina fueron sintetizados por primera vez a partir de *Cephalosporium* como se ha descrito líneas arriba. Su clasificación convencional se muestra en la ilustración No 1.

Las primeras cefalosporinas semisintéticas (cefaloridina y cefalotina) se introdujeron a mediados de la década de 1960 y mostraron una acción algo limitada contra bacterias Gram negativas, pero contrariamente buena actividad

contra *Staphylococcus aureus* productor de penicilinasa.³⁴

Comparado con las penicilinas, resultó más fácil modular las cefalosporinas en la búsqueda de alterar su actividad antimicrobiana, especialmente para mejorar su efecto sobre las bacterias Gram negativas, y por lo tanto, muchos de estos agentes han aparecido en el mercado desde la introducción de la primera cefalosporina.^{12,35}

Ilustración 1. Clasificación de cefalosporinas. Se indican sus principales representantes (PR) y su función (FX). Abreviaturas, GP: Gram positivos, GN: Gram Negativos.

Cefalosporinas de Primera generación

PR: cefalexina, cefadroxilo, cefalotina, cefazolina.
Función: sobre bacterias GP y algunas GN.

Cefalosporinas de Segunda generación

PR: cefaclor, cefamandol, cefonicida, cefuroxima.
Función: contra pocos GP y GN en igual proporción.

Cefalosporinas de Tercera generación

PR: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona,, cefixima.
Función: sobre bacterias GN y pocas GP.

Cefalosporinas de Cuarta generación

PR: cefepima, cefpiroma
Función: contra P. aureginosa y otras GN

Cefalosporinas de Quinta generación

PR: ceftobipro y Ceftarolina
Función: contra GP (MRSA - VRSA)

Fuente: Modificación de: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R. Cephalosporins. 7th edition. New York: Elsevier and Churchill Livingstone; 2009.

El sistema utilizado para producir cefalosporinas se basa en las diferencias en la actividad microbiana. Por lo tanto, cuando se inició la síntesis de la segunda

generación de cefalosporinas a principios de la década de 1970, se realizaron esfuerzos para expandir la cobertura e incluir un impacto en bacterias gram negativas además del efecto sobre las gram positivo. La Cefuroxima se introdujo en 1984, y tenía una capacidad mejorada para penetrar la barrera sanguínea y cerebral, lo que significa que podría usarse en lugar de la tradicional bencilpenicilina o ampicilina como tratamiento inicial en casos de meningitis.³⁶

La tercera generación de cefalosporinas (también conocidas como oximino-beta-lactamas) incluyó compuestos tales como cefotaxima (descubierta en 1979), ceftazidima (descubierta en 1980) y ceftriaxona (descubierta en 1981), que ofrecía una cobertura extendida contra las bacterias gram negativas e incluso una mejor estabilidad que las betalactamasas (**Ilustración 1**).

En parte, estas cefalosporinas se desarrollaron debido al descubrimiento de betalactamasas de espectro-estrecho y algunas de ellas también tenían una buena biodisponibilidad oral, que podría usarse para administración oral para el tratamiento de la pielonefritis.

El efecto sobre las bacterias gram negativas se extendió aún más en la cuarta generación de cefalosporinas.³⁷ Posteriormente, se obtuvo un mejor efecto Gram-positivo en la quinta generación, y esto incluso se aplicó a *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM o MRSA) y, por lo tanto, estos agentes también se denominan cefalosporinas SARM-activas.

2.2.2.3. Monobactámicos y carbapenémicos

A finales de la década de 1960, Beecham y Merck utilizaron *Streptomyces* para desarrollar los carbapenémicos, que se encontraron altamente resistentes a la hidrólisis enzimática. En total, se han encontrado más de 50 carbapenémicos, pero muchos de ellos son demasiado inestables para usarse en el tratamiento de infecciones.²⁰ El primer carbapenémico en el mercado fue imipenem, que se descubrió en el año de 1979 e introducido en el mercado a mediados de 1984, y se tuvo que combinar con cilastatina para protegerlo contra la deshidropeptidasa renal.

La segunda generación de carbapenémicos incluidos meropenem (descubierto el año 1996), ertapenem (descubierto el año 2001) y doripenem (descubierto el año 2007), son resistentes a la deshidropeptidasa renal. Por otra parte, meropenem que puede penetrar en la sangre y atravesar la barrera hematoencefálica, tiene un mejor efecto sobre las bacterias gram negativas, pero se considera menos eficaz contra bacterias gram-positivas tales como *Enterococos*.

Los carbapenémicos son betalactámicos sintéticos que presentan actividad predominante contra las bacterias gram negativas resistentes a las penicilinas y cefalosporinas.³⁸ Los carbapenémicos también son los únicos antibióticos que tienen algún grado de efecto post-antibiótico en infecciones con bacterias gram negativas.^{36,39}

Los primeros antibióticos betalactámicos producidos por bacterias monocíclicas se describieron en 1979 y más tarde se llamaron monobactams (por ejemplo, aztreonam). EL principal representante de los monobactámicos es el Aztreonam. Por otro lado, imipenem, meropenem y ertapenem componen el grupo de los fármacos carbapenémicos. La producción de resistencia bacteria del tipo BLEE, por ejemplo, en enterobacterias, confiere resistencia al aztreonam, pero una sensibilidad al imipenem.⁴⁰

Los monobactámicos tienen un buen efecto gram negativo pero ningún efecto útil sobre las bacterias gram positivas.³⁴ En 1977, varios grupos científicos identificaron la betalactamasa inhibidores del ácido clavulánico en *Streptomyces*, y este compuesto, compuesto que actualmente se usa en combinación con amoxicilina. Otros agentes en este grupo incluyen sulbactam, que tiene buena actividad contra betalactamasas de clase A, y tazobactam, que es activo contra algunas betalactamasas de clase C. Así, tazobactam está disponible en combinación con piperacilina, que lo hace útil como un antibiótico de amplio espectro con buenos efectos sobre bacterias gram negativas y gram-positivas.^{34,41}

2.2.3. Betalactamasas

Las betalactamasas son el nombre colectivo de las enzimas que abren el anillo betalactámico mediante la adición de una molécula de agua al enlace betalactama común, y esto inactiva el antibiótico betalactámico desde las penicilinas a los carbapenémicos. Esta hidrolización fue observada por primera vez en 1940 por Abraham y Chain (penicilinas) en una cepa de *E. coli*.⁴² No

obstante, el efecto clínico de dicha hidrolización no se observó hasta principios de la década de 1950, cuando aparecieron los primeros aislamientos de *S. aureus* resistentes a betalactámicos en los hospitales.⁴³

Las betalactamasas en *S. aureus* se encuentran en los cromosomas y son a menudo inducibles, mientras que la primera betalactamasa mediada por plásmidos se detectó en bacterias gram negativas en Grecia en la década de 1960.⁴⁴ Se denominó TEM por el nombre del paciente donde se encontró por primera vez, así TEM-1 es la betalactamasa más común en bacterias Gram-negativas, y puede hidrolizar las penicilinas (como la ampicilina).

Las betalactamasas también se propagaron rápidamente a otras bacterias, y pronto, después de cambios en solo uno o algunos aminoácidos, estas enzimas pudieron hidrolizar cefalosporinas de espectro-estrecho y se encontraron en *Enterobacterias*, *Neisseria gonorrhoeae* y *H. influenzae*.⁴⁵ En comparación con los TEM, las betalactamasas sulfhidriladas (SHV) son similares en la estructura bioquímica, pero son más común en *Klebsiella spp.* Las cefalosporinas de tercera generación fueron estables frente a la hidrólisis por los TEM y SHV originales. Estas dos últimos dos tipos de betalactamasas, son enzimas que conceden resistencia a la ampicilina.

Las BLEE que derivan como mutantes de estos dos tipos, generalmente codifican mutaciones de tipo puntual con cambios de 1-4 aminoácidos. Estas sustituciones inducen a alteraciones en la enzima, a nivel del sitio enzimático, reduciendo, así la actividad frente a un grupo amplio de antibióticos como las

cefalosporinas de amplio espectro.

2.2.3.1. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

En 1983, Knothe encontró una única mutación de nucleótido en un SHV que representaba la primera betalactamasa codificada por plásmido que podía hidrolizar el espectro extendido de las cefalosporinas en un aislado de *K. ozaenae*, y a ese tipo se denominó SHV-2.⁴⁶

Los brotes de *Klebsiella spp* principalmente con TEM mutado y los derivados de la enzima SHV se informaron en los hospitales franceses a finales de la década de 1980, y, para distinguir estas enzimas de las betalactamasas de amplio espectro (principalmente TEM-1, TEM-2 y SHV-1), el término de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) fue acuñado por Philippon en 1989.⁴⁷ Las BLEE se definen como betalactamasas que tienen las siguientes características: A) Son transferibles. B) Pueden hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam. Y C) pueden ser bloqueados *in vitro* por inhibidores de betalactamasa como el ácido clavulánico.⁴⁸

Las betalactamasas generalmente se clasifican de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros o la clasificación estructural de Ambler.^{49,50,51} La mayoría de los BLEE se pueden dividir en tres grupos, que se designan las enzimas TEM (aproximadamente 200 variantes), SHV (más de 140 variantes) y CTX-M (aproximadamente 130 variantes).

La clasificación inicial para las betalactamasas fue propuesta por Bush, Jacob y

Medeiros (1995) que se basaba en el peso molecular de las enzimas, su punto isoeléctrico, el perfil del sustrato de acción y las propiedades de ser inhibidas en presencia de EDTA o con ácido clavulánico.⁵² En base a esa representación funcional es que se apuntaron cuatro grupos funcionales. Estos grupos se muestran en la ilustración 2. Aunque esta clasificación previa coincidía con la clasificación de Ambler, luego de un tiempo, Ambler dividió a las betalactamasas en cuatro clases principales. La base del esquema de Adler reincide en la homología de las proteínas (similitud de aminoácidos) y no en las características fenotípicas.⁵³

Ilustración 2. Clasificación de cuatro grupos de las betalactamasas según Bush, Jacob y Medeiros (1995).

Grupo 1

Enzimas con acción cefalosporinasa.
No inhibibles por ácido clavulánico ni por EDTA.
Correlacionadas con enzimas cromosómicas de bacilos gramnegativos de tipo AmpC.

Grupo 2

Formadas por penicilinasas y cefalosporinasas
Inhibibles por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Grupo 3

Inhibibles por EDTA, pero no inhibibles por el ácido clavulánico.
Correspondida con las metaloenzimas de tipo B.

Grupo 4

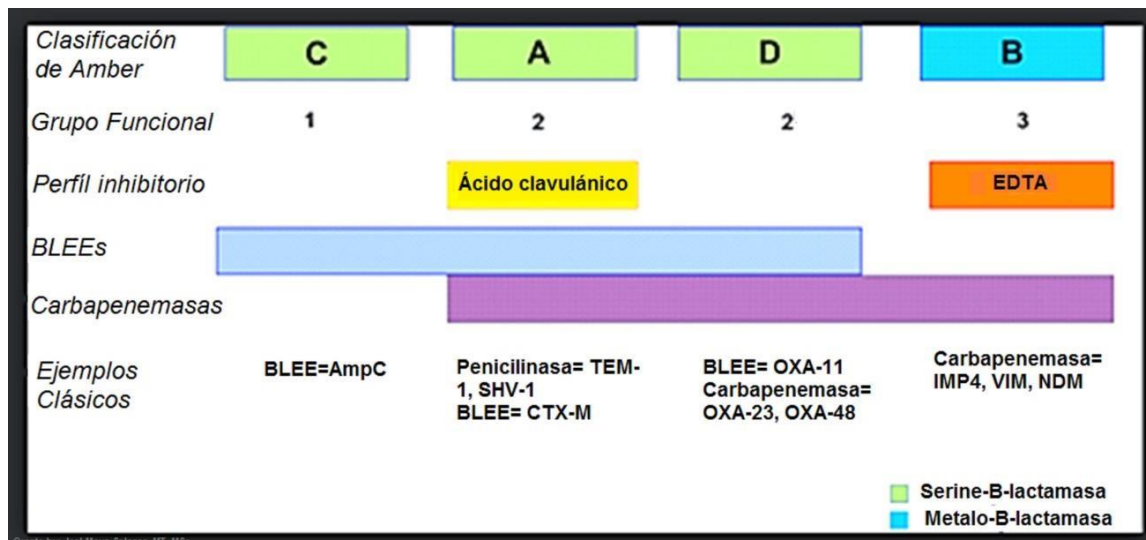
Incluye penicilinasas.
No-inhibibles por ácido clavulánico

Fuente: Modificado de Abraham EP, Newton GGF, Crawford K, Burton HS, Hale CW. Cephalosporin-N A new type of penicillin. Nature. 1953; 171(4347):343-9.

Los miembros del grupo CTX-M ahora son los BLEE más comunes en todo el mundo. El primer CTX-M fue descrito en Japón en 1986 por Matsumoto ET AL, quienes encontraron esta enzima en un perro de laboratorio utilizado para estudios farmacocinéticos de antibióticos betalactámicos.

En Alemania en 1989, Bauernfeind y colaboradores obtuvieron un aislado de *E. coli* que era resistente a la cefotaxima y produjo una enzima que no era TEM y no SHV, a la que denominaron CTX-M-1 debido a su actividad elevada contra la cefotaxima.⁵⁵

Ilustración 3. Clasificación de betalactamasas según Adler. Se resaltan los grupos funcionales, el perfil inhibitorio y los BLEE y Carbapenemasas discriminados según Adler y propiedad de b- lactamasa.



Fuente: Modificado de Bush K. Is it important to identify extended-spectrum B-lactamase-producing? Eur J Clin Microbiol Inf Dis. 1996; 15:361.

Las enzimas CTX-M son betalactamasas naturales que son producidas por *Kluyvera spp.*, y se encuentran en los cromosomas de esas bacterias y también

se han transferido a un plásmido que porta estas enzimas. Las enzimas CTX-M se pueden clasificar en cinco grupos principales, que se denominan CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, y CTX-M-25, Cada uno de estos incluye varias enzimas mediadas por plásmidos.⁵⁶

Basados en estos hallazgos un nuevo esquema de clasificación con mejor disponibilidad clínica fue propuesto recientemente y solo constituye tres categorías, aunque no se ha establecido internacionalmente.^{57,58}

1. **BLEEA**: Incluye un grupo grande y mixto de BLEE (mediados por transferencia de plásmidos - AmpC y OXA-BLEE).
2. **BLEEb**: Incluyen las betalactamasas clásicamente clasificadas como clase A (y clase 2be)^{35,37}
3. **BLEECARBA**: con actividad hidrolítica contra carbapenemicos.

Las betalactamasas AmpC son muy comunes, y generalmente son cromosómicas codificados y son inducibles en muchas bacterias gram negativas, como *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter spp.*, entre otras. En *E. coli*, estas betalactamasas-AmpC muestran poca resistencia a los antibióticos si son expresadas por genes cromosómicos, mientras que pueden ser tan resistentes como los BLEE si se transportan en plásmidos.

Las betalactamasas OXA se han encontrado en *P. aeruginosa* y en *E. coli*; no son tan comunes como las otras betalactamasas, pero pueden hidrolizar a oxacilina o antibióticos relacionados con la oxacilina. Otros BLEE que se han

descrito son PER-1 y -2, VEB-1 y -2, TLA-1, BES-1 y SFO- 1, entre otros.⁵⁹

2.2.4. Detección de BLEE

Para detectar BLEE en los laboratorios de análisis clínicos y de investigación se utilizan diversos métodos fenotípicos y genotípicos, y criterios que permiten caracterizarlos completamente con diferente grado de eficiencia y certeza.

Podemos mencionar los siguientes métodos de determinación fenotípica de BLEE: la prueba E-test (que contiene un gradiente predefinido y estable de concentraciones de antibióticos en una tira plástico que se deposita sobre los cultivos a analizar), y los sistemas automáticos como Vitek® y Phoenix®. En el mismo sentido, existen las pruebas de disco difusión y las de CIM con diferentes modificaciones.^{36, 60-63}

El *Clinical and Laboratory Standard Insitute* (CLSI) de Estados Unidos (USA) recomienda hacer un cribado de la posible producción de BLEE en, *a saber*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca*, y *Proteus mirabilis*, bajo sus propias recomendaciones y lineamientos para la identificación de BLEE en estos agentes.^{64, 65}

2.2.4.1. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

El éxito o fracaso de la terapia antimicrobiana en las infecciones bacterianas se predice mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, en la que los microorganismos se dividen en categorías tratables o no tratables en función de

los puntos de corte de la CIM. Hoy en día, los puntos de corte también son utilizados para facilitar la importante tarea de descubrir y controlar la resistencia fenotípica.⁶⁶ Por lo tanto, los puntos de corte son útiles tanto para guiar la terapia como para vigilar la resistencia emergente. Las dosis, las indicaciones clínicas, la farmacocinética, los mecanismos de resistencia, la distribución de la CIM, las distribuciones del diámetro de la zona y, más recientemente, la farmacodinámica y los valores de corte epidemiológico se utilizan en el proceso de establecimiento del punto de corte. Cuando cualquiera de estos datos de fondo cambia, los puntos críticos antimicrobianos pueden requerir una revisión. La concentración mínima inhibitoria (MIC o CIM) es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo posterior a su incubación de 24 horas.

El punto de corte Sensibilidad (S) / (I) Intermedio normalmente se basa en la dosis estándar y el punto de corte intermedio (I) / R (resistente) en la dosis máxima.⁶⁷ Los puntos de corte MIC están armonizados en Europa por EUCAST (El Comité Europeo de Prueba de susceptibilidad antimicrobiana)⁶⁶, en América por la CLSI⁶⁸ y en Reino Unido por British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) (53).⁶⁹ Aunque el EUCAST unifica los puntos de corte para la mayoría de los países europeos.

Mediante la base de datos de distribución MIC por cualquiera de estas instituciones, están disponibles las distribuciones de MICs totales de agentes antimicrobianos para especies individuales, tanto para organismos de tipo salvaje como no salvajes.

El MIC es una medida fundamental que forma la base para la mayoría métodos de prueba de susceptibilidad y contra los cuales los niveles de droga alcanzables en el cuerpo y los fluidos se pueden comparar para determinar puntos de corte para definir la susceptibilidad. Según EUCAST y CLSI un microorganismo se define como susceptible si tiene un nivel de actividad antimicrobiana asociada con una alta probabilidad de éxito terapéutico. Así, un microorganismo se clasifica como susceptible mediante la aplicación del punto de corte apropiado dentro de un sistema fenotípico definido. Por el contrario, la resistencia se define como una alta probabilidad de falla terapéutica. En la categoría intermedia, la actividad antimicrobiana está asociada con un efecto terapéutico incierto.^{66, 67} La determinación de MIC se puede realizar con diferentes métodos. La difusión de disco es una de los métodos más antiguos para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana y sigue siendo uno de los métodos ampliamente utilizados en laboratorios clínicos de rutina. Este análisis de susceptibilidad tiene como objetivo evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traducándose como factor predictivo de la eficacia clínica.⁷⁰ Se fundamenta en el hecho de conocer la MIC de una antimicrobiana necesaria para inhibir el desarrollo del microorganismo.^{41, 52, 71}

Un disco que contiene una cantidad definida de antibiótico se aplica a una superficie de agar y luego se incuba a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas. El crecimiento de microorganismos se inhibe por la presencia del antibiótico. El diámetro de la zona de inhibición se mide y esto se correlaciona con la MIC del aislado.

El antibiograma es usado comúnmente para la identificación de resistencia a drogas, y posteriormente para la identificación cuantitativa de BLEE. Basado en esto podemos mencionar los siguientes métodos fenotípicos para la identificación de BLEE:

2.2.4.2. Sistemas automatizados

Los sistemas automatizados se fundamentan en la determinación turbidimétrica de la rapidez de crecimiento del microorganismo en presencia de agentes antimicrobianos para obtener un análisis de regresión lineal y posteriormente determinar un algoritmo derivado de MIC.^{7, 42}

2.2.4.3. E- Test

Como ya mencionamos, este método utiliza tiras de material no poroso, que contienen el antimicrobiano en estudio y el mismo agente combinado con ácido clavulánico, en un gradiente de concentración que permite determinar el MIC.⁴⁸

2.2.4.4. Método de tamizaje según CLSI

Se utiliza el método de disco difusión mediante la técnica de Kirby-Baüer, donde se emplean discos de susceptibilidad antimicrobiana aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, que indican sospechosos de BLEE cuando los halos de inhibición iguales o inferiores a los diámetros referidos para

cada antibiótico.^{72,73}

2.2.4.5. Método americano confirmatorio de BLEE

Se utiliza sobre agar Mueller Hinton las cepas sospechosas, con los discos de ceftazidima, cefotaxima, y ceftazidima y cefotaxima con ácido clavulánico. Una diferencia ≥ 5 mm en los halos de inhibición entre cualquiera de los discos solos frente a los combinados indica una positividad.^{74,75,76}

2.2.4.6. Método de Jarlier confirmatorio de BLEE

Utiliza sobre agar Mueller Hinton las cepas sospechosas con discos de amoxicilina-ácido clavulánico en el centro de una placa, y rodeado a 25 mm de distancia con discos de ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y adicionalmente aztreonam y/o amoxicilina. El efecto sinérgico del inhibidor y los discos en forma de cola de pez o balón de futbol americano es característico de la presencia de BLEE.⁷⁷

2.2.4.7. Determinación de BLEE con el método Hodge

Se emplea agar preparado con el antibiótico a analizar, y se suspende inicialmente y luego se inocula sobre el agar la cepa de *E. coli* ATCC 25922. Sobre la superficie se realiza una estría de 2 cm de la cepa a investigar, desde el centro hacia afuera del disco. La presencia de la enzima se evidencia por la deformación del halo de inhibición de la cepa de *E.coli* al disco con el sustrato en forma de hendidura.⁷⁸

2.2.4.8. Método de pre-difusión para la determinación de BLEE

Basado en el método de pre-difusión para la identificación de cepas de *Acinetobacter* resistentes a colistina desarrollado en Argentina⁸¹, en este método previo al inóculo, se colocan dos discos de Amoxicilina sobre la placa con agar Mueller Hinton. Se deja dos horas a temperatura ambiente y posteriormente se retiran los discos. Luego se inócula la cepa y se colocaron dos discos de cefotaxima y ceftazidima cada uno de ellos encima de donde había estado uno de los discos de Amoxicilina previamente. De igual manera con los dos discos de cefotaxima y ceftazidima en forma paralela hacia el otro extremo. Se considera un resultado positivo la diferencia ≥ 5 mm entre el halo de inhibición de la cefotaxima mas inhibidor (amoxicilina) respecto del halo de cefotaxima sola. Igual para ceftazidima.⁸²

2.2.4.9. Determinación tridimensional de BLEE

En este bioensayo se basa en la determinación de mecanismos enzimáticos de resistencia presente en microorganismos con capacidad hidrolizable de antibióticos. Se inóculó una suspensión de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 sobre agar Mueller Hinton. Se colocan el antibiótico en mención al centro de la placa y se realizan surcos hasta de 2 cm de distancia que concluyen hacia el borde donde se realiza un orificio de 2 mm en la cual se inócula 20 μ L de la cepa problema. Una hendidura en el halo de inhibición en forma de V permite la identificación de la enzima correspondiente con el disco empleado como sustrato.^{79, 80}

2.3. Terminología básica

- **Antibióticos betalactámicos:** antibiótico que contiene un anillo β -lactámico en su estructura molecular, constituyen una amplia clase de antibióticos incluyendo derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactámicos, carbacefem, carbapenems e inhibidores de la betalactamasa (β -lactamasa).⁸
- **Betalactamasa (EC 3.5.2.6):** enzima producida por algunas bacterias y es responsable de la resistencia de éstas ante la acción de antibióticos betalactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (carbapenemasas).²⁷
- **β -lactamasas de espectro extendido:** nueva variedad de la enzima betalactamasas de los grupos TEM y SHV capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación.³²
- **Enterobacteriae:** Representante *ad solum* de la familia de bacterias Gram negativas (orden Enterobacteriales, clase Gammaproteobacteria, phylum Proteobacteria).
- **Infeción:** Acción y efecto de infectar o infectarse.

2.4. Hipótesis

No amerita hipótesis

2.5. Variables

Variable dependiente: cepas productoras de BLEE

Variable independiente: Identificación molecular de genes BLEE (*bla*TEM,

blaSHV, blaCTX).

Variables	Tipo de variable	Dimensión	Indicador	Escala de Medición	Valor
Cepas productoras de BLEE	Cualitativa nominal	No presenta	Producción de halo de inhibición	Valor numérico en milímetros	Halo >5mm = BLEE positivo Halo <5mm = BLEE negativo
Identificación molecular de genes BLEE	Cualitativa nominal	No presenta	Presencia/ausencia de genes: blaTEM, blaSHV, blaCTX	Expresión No expresión	Pares de bases

Fuente: Primaria. Elaboración Propia

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y nivel de investigación

Conforme los objetivos planteados este estudio reúnen las componentes de una investigación de tipo observacional, descriptivo, de corte transversal. Además, tendrá un diseño no experimental, prospectivo.

El enfoque del estudio será de tipo cuantitativo.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Nuestro universo poblacional estuvo conformado por todas las muestras provenientes de pacientes pediátricos que fueron recolectados dentro del Proyecto Nacional de Caracterización de Resistencia Bacteriana. Las muestras provinieron de hospitales nacionales (MINSA) de la Seguridad Social (EsSalud) y de los Institutos de Investigación y Clínicas Privadas de Lima, Perú durante el trienio 2016 – 2018.

3.2.2. Muestra

Las muestras la conformaron los aislamientos positivos que fueron resistentes a Betalactámicos y cumplieron con la categoría de resistentes y posibles productores de BLEE.

3.2.3 Muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia, incluyendo todas las cepas con resistencia a BLEE provenientes de pacientes pediátricos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión planteados previamente.

3.2.4. Criterios de selección

3.2.4.1. Criterios de Inclusión

- Cepas aisladas de pacientes sin tratamiento antimicrobiano previo.
- Cepas aisladas de pacientes pediátricos hospitalizados y ambulatorios.

3.2.4.2. Criterios de exclusión

- Cepas aisladas de pacientes con tratamiento para otras enfermedades (ejemplo: cáncer, diabetes), que pudieran interferir durante el análisis de susceptibilidad.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Todas las tomas de muestras siguieron el Manual de Procedimientos Estandarizados propios de cada institución. Para el caso de urocultivo el procesamiento de muestra fue en el lapso de 4 horas desde la toma de muestra y la selección de medios adecuados para su aislamiento. Para otros dispositivos médicos, se utilizó el método de rodamiento sobre los agares seleccionados y, por separado, el cultivo en una placa del dispositivo en mención.

3.3.1. Fase Analítica

3.3.1.1. Urocultivo e identificación

Para las muestras de orina, se utilizaron dos medios de aislamiento, Agar Sangre de Carnero y Agar Mac Conkey (ambos de Merck, Darmstadt, Germany) en una sola placa de plástico. Sobre estos se inoculó 1uL de muestra con un asa estéril calibrada. Todos los cultivos se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Los aislamientos se identificaron conforme el manual de la Sociedad Peruana de Microbiología.⁸³ Estos procedimientos incluyen la lectura de los medios al término de las 24 horas de incubación y las consideraciones de inclusión de colonias consideradas como representativas de infecciones urinarias (recuento de colonias multiplicado por el factor de dilución, positivos= ≥ 1000 UFC/ml). La identificación bioquímica (batería bioquímica) del género y especie se realizó posterior a su identificación morfológica con la coloración de Gram. Asimismo, los aislamientos fueron analizados en el sistema automatizado Vitek[®] 2 Compact (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) conforme los procedimientos del servicio.

3.3.1.2. Cultivo de dispositivos médicos

Para las muestras procedentes de otra fuente distinta a urocultivo, como dispositivos médicos (principalmente catéteres) se utilizaron las

recomendaciones de la guía de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas 2009.⁸⁹ Para ello se utilizó la técnica de rodamiento y conforme el tiempo y profundidad del catéter se procedió con la selección de medios de cultivo. Se consideró como punto de corte el crecimiento de >15 UFC como considerable de colonización de catéter.

3.3.1.3. Antibiograma y detección de BLEE

La identificación de BLEE se realizó posterior al antibiograma convencional por el método de disco difusión. El antibiograma de los aislamientos se realizó con el sistema Vitek[®] 2 Compact (se determinaron la Concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada antibiótico) y con el método de disco difusión de Kirby-Bauer (determinación de halos de inhibición en mm). La caracterización de BLEE se reportó en el sistema automatizado como alarma de cada aislamiento, como también con el Test confirmatorio para BLEE fenotípico según el *Clinical and Laboratory Standard Institute* – CLSI (método americano).^{84,85}

3.3.1.4. Caracterización molecular de genes BLEE

La confirmación fenotípica de BLEE está fundamentada en la detección de sensibilidad disminuida a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam y en la inhibición de la resistencia por ácido clavulánico. Con la confirmación de BLEE realizada, se procedió a la caracterización molecular posterior por Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional con el uso de los

siguientes cebadores estándares para la identificación de tres genes: CTX-M, SHV, y TEM. Los procesos de extracción, amplificación y obtención de los productos genómicos se realizaron bajo los protocolos antes descritos.^{7,21,86} Estos incluyen la extracción de ADN bacteriano con el método de shock térmico, la cuantificación en ng/dl de ácidos nucleicos (para el estudio se usó ADN bacteriano) con el fluorómetro Qubit™ (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), el uso de cebadores o primers consenso, y la ampliación (30 ciclos) según protocolo establecido. En la cuadro 1, se muestra la lista de los cebadores usados para la evaluación de genes BLEE de la enterobacterias aisladas. El protocolo de PCR convencional consistió en 1 ciclo de inicia a 94°C por 2 segundo, 20 ciclos a 56°C por 10 segundos, 40 ciclos a 72°C por 30 segundos, y 15 ciclos a 72°C por 2 minutos.

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la determinación de BLEE en cepas aisladas de pacientes pediátricos.

Cebador (primer)*	Gen BLEE
F - 5'-TTTGCGATGTGCAGTACCGTAA3' R - 5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATT3'	blaCTX
F - 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA3' R - 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC3'	blaTEM
F - 5'-TGGTTATGCGTTATATTCGCC3' R - 5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCCG3'	blaSHV

Fuente: Elaboración propia

Tanto la amplificación por PCR como la visualización (corrida por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 3%) de los productos se desarrolló con el sistema BioRad Gel Doc™ XR+ (Hercules, CA, USA). El procesamiento de imágenes de las corridas electroforéticas se realizó con el

Software BioRad Image Lab™ integrado al sistema de amplificación.

3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Desde el Cuaderno de Control de datos de los pacientes pediátricos se obtuvo la información requerida para el desarrollo de este estudio (datos incluidos en el estudio fueron: edad, sexo, confirmación bioquímica de aislamiento y perfil de resistencia antimicrobiana) en conformidad con los Procedimientos Operacionales Estandarizados de la institución. Estos datos se colectaron, codificaron y tabularon desde la ficha estandarizada (Anexo 1) hacia la hoja de cálculo de MS-Excel 2010 para Windows (Redmond, USA).

Los resultados de la caracterización molecular de cepas productoras de BLEE serán obtenidos directamente de la base de datos del sistema BioRad Gel Doc™ XR+, esto incluye las corridas electroforéticas de control, de identificación de cada uno de los tres genes, como del marcador *leader*.

3.4.1. Análisis estadístico de datos

Se empleó estadística descriptiva y la distribución de frecuencias absolutas, relativas, y acumuladas. Se determinaron las medidas de tendencia central con un intervalo de confianza de 95% como significativo. El análisis de datos se realizó en el analizador estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* v21.0 (IBM Armonk, USA) para Linux y la construcción de tablas y gráficos estadísticos se realizaron en MS- Excel 2010.

3.5. Aspectos éticos

Los autores se aseguraron de que los aspectos éticos del presente estudio estuvieran garantizados por la confiabilidad y el resguardo que se tuvo sobre la información sociodemográfica y clínica obtenida. El estudio cumple con lineamientos internacionales de resguardo de información de pacientes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

En el estudio se incluyeron 30 aislamientos bacterianos (pacientes pediátricos): 27 muestras de urocultivos (90%) y 3 muestras de catéter ventral coronario (10%) de pacientes pediátricos. El promedio de edad de los varones fue de 1.2 ± 2 años (IC95%: 0.9 a 1.3), con un rango de edad de 1 mes a 3.5 años. El promedio de edad de las mujeres fue de 1.9 ± 2 años (IC95%: 1.5 a 2.8), con un rango de edad de 3 meses a 5 años. El 66.7% de la población estudiada fueron del sexo femenino.

Tabla 1. Distribución porcentual de pacientes incluidos según sexo, Lima - 2018

	Sexo	
	n	%
Varones	10	33.3
Mujeres	20	66.7

Fuente: Primaria. Elaboración Propia.

La resistencia antibiótica evaluada *in vitro* permite establecer, basado en sus puntos de corte, las posibilidades de fracaso terapéutico relacionado a la concentración de un antibiótico.⁸⁸ Los resultados de la lectura del antibiograma indica que todas las cepas aisladas presentaron fenotípicamente una sinergia entre el ácido clavulánico y cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Esto se evidenció según los MIC del sistema automatizado y por el método americano de resistencia a BLEE mediado por los puntos de corte del CLSI.

El 77% de especies bacterianas aisladas correspondieron a *Escherichia coli*, el otro porcentaje de cepas correspondieron a *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* ambos con 10% de aislamientos en pacientes pediátricos durante el tiempo en estudio.

Tabla 2. Distribución de los aislamientos en valor porcentual provenientes de pacientes pediátricos, Lima-2018

Bacterias	Aislamientos	
	n	%
<i>E. coli</i>	23	76.7
<i>K. pneumoniae</i>	3	10
<i>P.mirabilis</i>	3	10
<i>E. fecalis</i>	1	3.3

Fuente: Primaria. Elaboración Propia.

Todas las cepas productoras de BLEE caracterizadas fenotípicamente fueron

evaluadas molecularmente conforme el protocolo establecido. El 87% de las cepas de *E. coli* presentaron el gen *bla*CTX, seguido del gen *bla*TEM (83%) y *bla*SHV (74%). Dos cepas de *K. pneumoniae* presentaron los genes *bla*CTX y *bla*TEM a la vez, y solo uno (33.3%) presentó el gen *bla*SHV.

Tabla 3. Frecuencia de genes en pacientes pediátricos (%), Lima-2018

Genes	Especies			
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>bla</i> CTX	20 (87)	2 (66.7)	2 (66.7)	1 (100)
<i>bla</i> SHV	17 (74)	1 (33.3)	1 (33.3)	--
<i>bla</i> TEM	19 (83)	2 (66.7)	2 (66.7)	--
TOTAL	23 (100)	3 (100)	3 (100)	1 (100)

Fuente: Primaria. Elaboración Propia.

Dos cepas de *P. mirabilis* presentaron los genes *bla*CTX y *bla*TEM a la vez, y solo uno (33.3%) presentó el gen *bla*SHV. Comprobamos que la única cepa de *E. faecalis* presentó el gen *bla*CTX. Todas las cepas de *E. coli* que presentaron el gen *bla*CTX tuvieron el gen *bla*TEM. Para el caso del gen *bla*SHV dos cepas de *E. coli* solo presentaron este gen, los 15 (65.2%) restantes estuvieron presentes en compañía de los otros genes caracterizados. Para *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* solo un aislamiento presentó los 3 genes.

Resultados complementarios sobre la caracterización de genes se muestran en Anexo 2. En estas se demuestran la presencia o ausencia de genes relacionados con resistencia a BLEE. Las características fenotípicas presuntivamente indican

que las cepas analizadas son productoras de betalactamasas de espectro extendido. Al confirmar la presencia de genes relacionados con esta resistencia se entiende que estas cepas contienen características de resistencia a betalactámicos. En la corrida electroforética de *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* se alternaron las cepas entre los pocillos de corrida. La cepa 1 y 2 corresponden con ambas cepas negativas mientras que los demás pocillos indican la presencia de este gen en estas cepas.

4.2. Discusión

El estudio tuvo como objetivo determinar las características fenotípicas y moleculares de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en pacientes pediátricos durante el 2018, demostrando una gran cantidad de cepas con presencia fenotípica de resistencia y un alto porcentaje con características genotípicas de BLEE.

Al igual que estudios previos, las bacterias más frecuentes con producción de BLEE aisladas de pacientes pediátricos fueron *E. coli* y *K. pneumoniae*.^{90,91} Estas bacterias pueden transmitir estos genes de resistencia a través de plásmidos, que se han diseminado masivamente principalmente entre bacterias del género enterobacteriae.⁹²

Sobre la edad de los pacientes afectados, el estudio de Shakya et al., (2017) ha demostrado que los grupos etarios más afectados fueron de 21-30 años para *E. coli* BLEE y los menores de 10 años para *K. pneumoniae* BLEE.⁹³ Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos para los aislamientos de *K.*

pneumoniae BLEE, pero discuerdan para nuestros resultados con *E. coli* BLEE. Esto podría explicarse debido a que este estudio incluyó solo muestras de orina de pacientes de todas las edades.

Nuestros hallazgos concuerdan con el estudio de Zhang et al (2018), en 41 cepas de *K. pneumoniae* que poseían genes de BLEE principalmente *bla*CTX con 43.9% y *bla*TEM con 68%.¹² Por otro lado, Varela et al. (2017) han indicado que todas sus cepas *E. coli* analizadas presentaron *bla*CTX, resultado que coincide ciertamente con nuestros hallazgos.¹³ En el estudio de Guillén et al. (2015), también se indica una frecuencia de genes BLEE de 83% donde mayoritariamente se han visto implicados los genes *bla*CTX, *bla*TEM y *bla*SHV.¹⁸ En el de Görgeç et al. (2015), también se reportó en cepas de *E. coli* al gen *bla*CTX como el más frecuente con 89%, seguido del gen *bla*TEM con 59.2% y *bla*SHV con 12%.²⁰ Otro estudio que concuerda con nuestros hallazgos es el presentado por Yu et al. (2016), donde analizaron cepas de *K. pneumoniae* y reportaron una frecuencia alta del gen *bla*CTX con 84.3% y *bla*TEM con 68.8%.¹⁵

La posibilidad de existencia de cepas productoras de BLEE en superficies es un hecho que ha sido evidenciado en los hospitales, tanto sobre superficies inertes como dispositivos médicos y sobre teléfonos móviles.^{16,94} La alarmante situación de la resistencia antibiótica y de las súper bacterias sumada a la vulnerabilidad de los pacientes pediátricos debe de ser uno de los tópicos principales para los sistemas sanitarios en nuestro país y del mundo. Esta población, y los sistemas de atención relacionados deben de ser cuidadosa y organizadamente elaborados ya que las infecciones nosocomiales pueden afectar aún más la salud de este

grupo poblacional. Para ello se deben de conocer la tasa de resistencia que afecta a población pediátrica, como la reportada previamente por Garcia et al., (2016) donde indican que 73% de cepas aisladas de hemocultivos eran productoras de BLEE fenotípico, y luego, al ser caracterizadas tuvieron la existencia mayoritaria de genes *bla*CTX.¹⁹ Si bien, en este estudio se incluyeron solo dos tipos de muestra, mayoritariamente las cepas productoras de BLEE fueron aisladas en muestras de orina, dándonos una visión general de la tasa de resistencia y de los componentes moleculares de resistencia.

Otro estudio en población pediátrica en Perú, fue el realizado por Colquechagua et al. (2015), que indico a *E. coli* y *K. pneumoniae* como las enterobacterias causantes de enfermedad más comunes y al gen *bla*CTX como el más frecuente con 89.1%.²¹ La caracterización de genes de resistencia fue alto en unidades de cuidado intensivos pediátricos también, como indica Gonzáles AC et al. (2013), que reporto en cepas fenotípicas con resistencia a BLEE el gen *bla*CTX con 82% y *bla*TEM con 41%.²³ En recién nacidos también se ha reportado la existencia de cepas con resistencia a BLEE, el estudio de Zhang et al. (2011) demostró la presencia del gen *bla*CTX y *bla*TEM.²⁴ Los genes caracterizados en este estudio deben de ser valorados tanto por sus variantes o subtipos genéticos como por su clonalidad. El primero, nos permitirá conocer los tipos más frecuentes en la comunidad pediátrica peruana al fin de establecer su magnitud en la regulación genética de la expresión de moléculas implicadas en la resistencia a BLEE. Lo segundo, es de vital importancia ya que el saber el número de clonas implicadas en la apariciones de brotes resistentes en los hospitales, y principalmente en la unidades pediátrica permitirá entender el contexto en el que se están

transmitiendo las cepas, si pertenecen a una clona o si están siendo incorporadas distintas clonas.

Todas a las herramientas de prevención deben de estar estimadas para la prevención de la transmisión de enterobacterias productoras de BLEE en pediatría, ya que en nuestro país muy pocos estudios de caracterización molecular han centrado sus objetivos en este grupo poblacional. Nuestros datos indican que los genes más frecuentes (*bla*CTX y *bla*TEM) representaron aproximadamente el 76%, mientras que el gen *bla*SHV solo represento el 47.2% de cepas en total. Esto remarca la importancia de los genes que están presentes en asilamientos bacterianos en nuestras poblaciones, que aún no han sido globalmente evaluadas. Por el contrario, la tasa de afectación de población pediátrica es considerable, es decir, hay un gran grupo de enteropatógenos involucrados tanto en infección de tracto urinario como en otras afecciones.^{22,33} Esta situación es un entorno que exige el esclarecimiento de las variables fenotípicas de cepas resistentes a betalactámicos y de sus componentes moleculares.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

5.1. Conclusiones

- Las características fenotípicas indicaron los patrones de producción de betalactamasas de espectro extendido de las cepas aisladas en pacientes pediátricos.
- La especie bacteriana productoras de betalactamasas de espectro extendido más frecuente fue *Escherichia coli*, seguida de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* con 77%, 10% y 10 % respectivamente.
- Se determinó una alta frecuencia (>75 %) del gen *bla*CTX y del gen *bla*TEM en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de pacientes pediátricos.
- Se determinó baja frecuencia (<47 %) del gen *bla*SHV en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de pacientes pediátricos.
- El sexo femenino fue el más frecuente (66.7% de muestras) entre los pacientes con infección por cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido.
- El grupo etario donde se aislaron más cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido fue de entre de 5 a 17 meses de edad.

5.2. Recomendaciones

- Se debe de ampliar el tamaño muestral de pacientes para conocer la

caracterización molecular real de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes pediátricos, se permitirá conocer epidemiológicamente la distribución de los genes en nuestra comunidad.

- Es necesario conocer los grupos filogenéticos (clonas) en las cepas analizadas productoras de betalactamasas de espectro extendido en pediatría, para saber la distribución de las clonas en los brotes hospitalarios de estas áreas de cuidados al niño y neonato.
- Se debe de ampliar los análisis moleculares para otros genes implicados en otros mecanismos de resistencia, como a carbapenémicos y colistina.
- Se deben de cuantificar los genes de las cepas BLEE que estén asociados a AmpC.

REFERENCIAS

1. Moya-Salazar J, Terán-Vásquez A, Salazar-Hernández R. High antimicrobial resistant to fluoroquinolones by *Campylobacter* in Peruvian pediatric patients. *Rev Per Med Exp Salud Pública* 2018; 35(1): 158-160.
2. Oberoi L, Singh N, Sharma P, Aggarwal A. ESBL, MBL and Ampc β Lactamases Producing Superbugs - Havoc in the Intensive Care Units of Punjab India. *J Clin Diagn Res.* 2013; 7(1):70-3.
3. Gupta V, Garg R, Garg S, Chander J, Attri AK. Coexistence of Extended Spectrum Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Metallo-Beta-Lactamases in *Acinetobacter baumannii* from burns patients: a report from a tertiary care centre of India. *Ann Burns Fire Disasters.* 2013; 26(4):189-92.
4. Méndez REA. Determinación de la frecuencia del gen CTX-M que codifica β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* uropatógenas aisladas en el Hospital Guillermo Almenara de marzo a mayo del año 2012. [Tesis] Lima: E.A.P. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
5. Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI. Clonal Diversity of ESBL- Producing *Escherichia coli* Isolated from Environmental, Human and Food Samples. *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14(7): 676.
6. Zhang X, Chen D, Xu G, Huang W, Wang X. Molecular epidemiology and drug resistant mechanism in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China. *PLoS ONE* 2018; 13(3): e0194000.
7. Palma N, Gomes C, Riveros M, García W, Martínez-Puchol S, Ruiz- Roldán L, et al. Virulence factors profiles and ESBL production in *Escherichia coli*

causing bacteremia in Peruvian children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 86(1):70-5.

8. Morales CIA. Prevalencia de cepas portadoras de marcadores de resistencia (BLEE) aisladas en muestras clínicas provenientes de pacientes ambulatorios. [Tesis] México D.F.: Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

9. Abanto DC, Gonzales CJ, Ávila VE, Teran RJ, Castillo DKM. Detección y caracterización genotípica de betalactamasas de *Escherichia coli* uropatógenas del Hospital Belén de Trujillo durante enero-abril de 2015. *Pueblo Cont.* Vol. 2017; 28(1):57-66.

10. Rojas-Jaimes J. Identificación fenotípica y caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* durante un brote hospitalario en Madre de Dios, Perú. *Científica* 2016; 13 (3): 187-192.

11. González AC, Nieves B, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Moreno M. Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de b- lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30 (4): 374-380

12. Zhang X, Chen D, Xu G, Huang W, Wang X. Molecular epidemiology and drug resistant mechanism in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China. *PLoS ONE* 2018; 13(3): e0194000.

13. Varela Y, Millán B, Araque M. Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud. *Biomédica* 2017; 37:209-17

14. Yu J, Tan K, Rong Z, Wang Y, Chen Z, Zhu X, et al. Nosocomial outbreak of KPC-2- and NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal ward: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1):563.
15. Loyola S, Gutierrez LR, Horna G, Petersen K, Agapito J, Osada J, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in cell phones of health care workers from Peruvian pediatric and neonatal intensive care units. *Am J Infect Control.* 2016; 44 (8): 910- 6.
16. Sethaphanich N, Santanirand P, Rattanasiri S, Techasaensiri C, Chaisavaneeyakorn S, Apiwattanakul N. Pediatric extended spectrum β -lactamase infection: Community-acquired infection and treatment options. *Pediatrics International* 2016; 58: 338–346.
17. Guillén R, Velázquez G, Lird G, Espínola C, Laconich M, Carpinelli L et al. Detección molecular de betalactamasas de espectro (BLEE) en enterobacterias aisladas en Asunción. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2015;13(2):8-16.
18. García C, Astocondor L, Rojo-Bezarez B, Jacobs J, Sáenz Y. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase- Producer *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Neonatal Sepsis in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94 (2): 285-8.
19. Görgeç S, Kuzucu Ç, Otlu B, Yetkin F, Ersoy Y. [Investigation of beta-lactamase genes and clonal relationship among the extended- spectrum beta-lactamase producing nosocomial *Escherichia coli* isolates]. *Mikrobiyol Bul.* 2015 ; 49(1):15-25.
20. Colquechagua AF, Sevilla AC, Edgar Gonzales EG. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev Per Med Exp Salud Publica*

2015;32(1): 26-32.

21. Uz Zaman T, Aldrees M, Al Johani SM, Alrodayyan M, Aldughashem FA, Balkhy HH. Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Infect Dis.* 2014; 28:186-92.

22. Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol.* 2014; 46:175-81.

23. González AC, Nieves B, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Moreno M. Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30 (4): 374-380

24. Zhang WL, Liu J, Zhang J, Su GL. [Analysis of antibiotic resistance and genotypes on extended spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase producing strains isolated from Uygur and Han newborns]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2011 Mar;45(3):217-24.

25. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, et al. Distribution of bla(TEM), bla(SHV), bla(CTX-M) genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microb Drug Resist.* 2010;16(1):49-53.

26. Elhani D. [The widening challenge of extended spectrum beta-lactamases]. *Ann Biol Clin* 2012;70 (2) : 117-40.

27. Chiriboga AC, Araujo LC. Nuevo Método alternativo para la detección de

Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. [Tesis]. Quito: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Médicas. Instituto Superior de Investigación y Postgrado; 2012.

28. Cué BM, Morejón GM. Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1998; 14(4).

29. Ghuyssen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and betalactamases. *Trends Microbiol* 1994;2(10):372-80.

30. Marín M, Gudiol F. Betalactam antibiotics. *Enf Inf Microbiol Clin* 2003; 21(1).

31. Brandl E, Giovannini M, Margreiter H. Studies on the acid stable, orally efficacious phenoxymethylpenicillin (penicillin V). *Wien Med Wochenschr* 1953;103(33-34):602-7.

32. Alvarado CP. Resistencia Bacteriana de bacilos Gram Negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes del Hospital del Día y Clínica Maternidad Julia Esther Gonzales durante el periodo agosto-noviembre 2013. [Tesis]. Loja: Universidad Tecnica Particular de Loja. Área Bioquímica; 2014.

33. Abraham EP, Newton GGF, Crawford K, Burton HS, Hale CW. Cephalosporin-N A new type of penicillin. *Nature*. 1953; 171(4347):343-9.

34. Muggleton PW, O'Callaghan CH, Stevens WK. Laboratory Evaluation of a New Antibiotic--Cephaloridine (Ceporin). *Br Med J*1964;2(5419):1234-7

35. Boniece WS, Wick WE, Holmes DH, Redman CE. In vitro and in vivo laboratory evaluation of cephalothin, A new broad spectrum antibiotic. *J Bacteriol* 1962;84:1292-6

36. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R. Cephalosporins.7th edition. New York: Elsevier and Churchill Livingstone; 2009.

37. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century-A clinical

super-challenge. *N Engl J Med.* 2009; 360:439-43.

38. Echevarria ZJ, Quilca DI. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered* 2003; 14 (4): 195-203.

39. Odenholt-Tornqvist I. Studies on the postantibiotic effect and the postantibiotic subMIC effect of meropenem. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31(6):881-92.

40. Abreu RR. Prevalencia de Enterobacterias productoras de β - lactamasas de espectro extendido (BLEE), en exudados rectales de pollos de engorde en granjas avícolas en la isla de Tenerife, España. [Tesis]. España: Universidad de la Laguna. Ciencias y Tecnologías; 2013.

41. Podschun R, Ullman U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998, 35(2):589–603

42. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 1940;146:837-48.

43. Kirby WMM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science.* 1944; 99(2579):452-3.

44. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 1965; 208(5007):239-41.

45. Brunton J, Clare D, Meier MA. Molecular epidemiology of antibiotic resistance plasmids of *Haemophilus* species and *Neisseria gonorrhoeae*. *Rev Infect Dis* 1986; 8(5):713-24.

46. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical

isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11(6):315-17.

47. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-Spectrum Beta- Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33(8):1131-36.

48. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(3):323-34.

49. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamasas and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39 (6):1211-33.

50. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(3):259-63.

51. Ambler RP, Coulson AF. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991;276(1): 269-70.

52. Abarca G, Herrera M. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* 2001;36:1-2.

53. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum -lactamase- producing? *Eur J Clin Microbiol Inf Dis*. 1996; 15:361.

54. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*1988;32(8):1243-6.

55. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990; 18(5):294-8.

56. Decousser JW, Poirel L, Nordmann P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(12):3595-8.
57. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(1):1-4.
58. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectrum* 2016; 4(2):VMBF-0016-2015
59. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4):657-86.
60. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β - lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1877-1882.
61. Cavalieri SJ, Rankin ID, Harbeck RJ, et al. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbiology, Laboratory Manuals, PAHO. Artículo en línea. [Internet] Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid= Fecha de Acceso: 15-05-2018
62. Fihn SD. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *N Engl J Med.* 2003;349(3):259-66.
63. Hernández AE. *Escherichia coli* productores de blee aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. [Tesis]. España: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología I; 2010.

65. Seral GC, Pardos GM, Castillo GF. Extended-spectrum beta- lactamases in enterobacteria other than Escherichia coli and Klebsiella. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(Supl 1):12-18
66. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4): 557-84.
67. Kahlmeter, G. Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Osterlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 52(2): p. 145-8.
68. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-951.
69. Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016; 15: 21.
70. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 48(suppl S1): 17-28.
71. Mulgrave L. Extended Spectrum -Lactamase Detection in the Clinical Laboratory: A Mini-Review. *Australian Society for Antimicrobials newsletter* 1999;200: 35.
72. Perez F, Endimiani A, et al. The continuing challenge of ESBLs." *Curr Opin Pharmacol* 2007;7(5): 459-69.
73. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4):493-6.

74. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(9):1877-82.
75. Sacsquispe CR, Ventura EG. Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. Serie de Normas Técnicas N° 28. Instituto Nacional de Salud. Lima: MINSA; 2005.
76. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de β -Lactamasas plasmídicas de espectro extendido. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2003.
77. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
78. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4):493-6.
79. Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 1978;7(1):102-3.
80. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(9):1877-82.
81. Menon T, Bindu D, Kumar CP, Nalini S, Thirunarayan MA. Comparison of double disc and three dimensional methods to screen for ESBL producers in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol.* 2006;24(2):117-20.
82. Herrera ME, Mobilia LN, Posse GR. Sensibilidad de *Acinetobacter* a la colistina evaluada mediante los métodos de predifusión y de concentración

inhibitoria mínima. Detección de aislamientos eterorresistentes. *Rev Argent Microbiol* 2011; 43: 115-9.

83. Cruzado RM. Eficacia del método pre difusión de disco en Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido y del test confirmatorio de disco combinado en urocultivo. [Tesis] Facultad de Medicina Humana y Ciencias De La Salud, Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica, Especialidad de Laboratorio Clínico Y Anatomía Patológica. Universidad Alas Peruanas. 2016

84. Soto PJ, Guillén AO, Rojas LR. Manual de Procedimientos para el cultivo de orina (Urocultivo). Lima: Sociedad Peruana de Microbiología; 2012.

85. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

86. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 36:493-496.

87. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490–495.

88. Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(6): 333-406.

89. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(1): 1–45.

90. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical

update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(4):657-86.

91. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis.* 2010; 2(3): 263–274.

92. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) *Clin Microbiol Infect.* 2000;6: 460–3.

93. Shakya P, Shrestha D, Maharjan E, Sharma VK, Paudyal R. ESBL Production Among *E. coli* and *Klebsiella* spp. Causing Urinary Tract Infection: A Hospital Based Study. *Open Microbiol J.* 2017; 11: 23–30.

94. Ikeda Y, Shigemura K, Nomi M, Tabata C, Kitagawa K, Arakawa S, et al. Infection Control Following an Outbreak of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Jpn J Infect Dis.* 2018; 71(2):158-161.

ANEXOS

ANEXO N° 1:

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO



Lima, 15 de febrero de 2019

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El presente documento da constancia que el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Científica del Sur, ha colaborado satisfactoriamente con el proyecto “Caracterización fenotípica y molecular de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes pediátricos durante el 2018” realizado por los Bachilleres en Tecnología Médica de la Universidad Privada Norbert Wiener, Srta. María Ancajima Ballena y Rocio Sotelo Alejos durante el 2018.

Conjuntamente con el Lic. TM. Jeel Moya Salazar, en calidad de co-asesor, hemos supervisado y realizado las actividades señaladas en su proyecto de tesis respetando los cronogramas establecidos. Asimismo, referimos que las cepas fueron provenientes de pacientes pediátricos en el marco de un proyecto multicéntrico de caracterización molecular en el Perú. Conforme los lineamientos de este proyecto se les han brindado los datos solicitados y el acceso a las cepas para su caracterización conforme el desarrollo de la tesis.

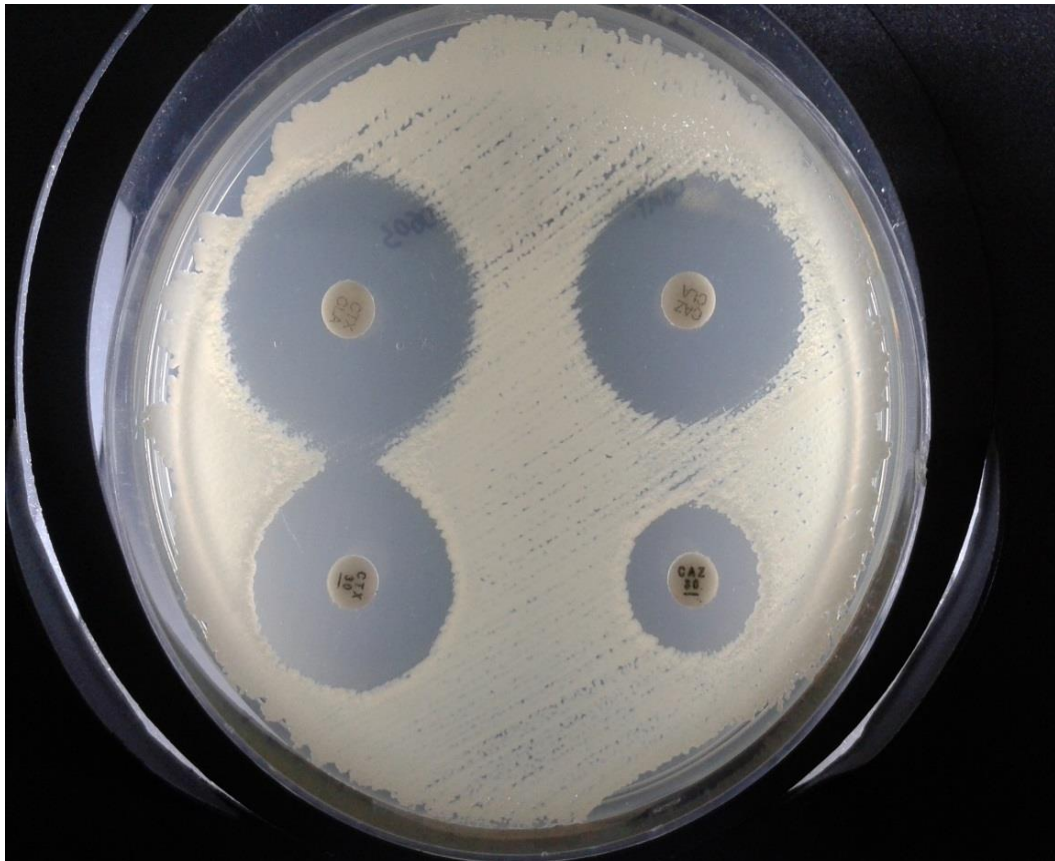
Se expide la siguiente constancia para los requerimientos solicitados,

Atentamente,

Marja J Pons
Investigadora

ANEXO N° 2

**ANTIBIOGRAMA DE E. COLI CON PRESENCIA DE BLEE AISLADO DE
PACIENTE PEDIÁTRICO (CEPA-022), LIMA-2018.**



ANEXO N°3

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nº	Cod. Cepa	Edad	Sexo	Muestra	Especie Bacteriana	Código Vitek	Análisis Genes
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							

ANEXO N°4

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Figura 1. Corrida electroforética de cepas de *E. coli* asiladas de pacientes pediátricos. Gel mostrando el fragmento de 749 pb del gen *bla*CTX-M (cepa 6 y 8 son negativos a BLEE tipo CTX-M).

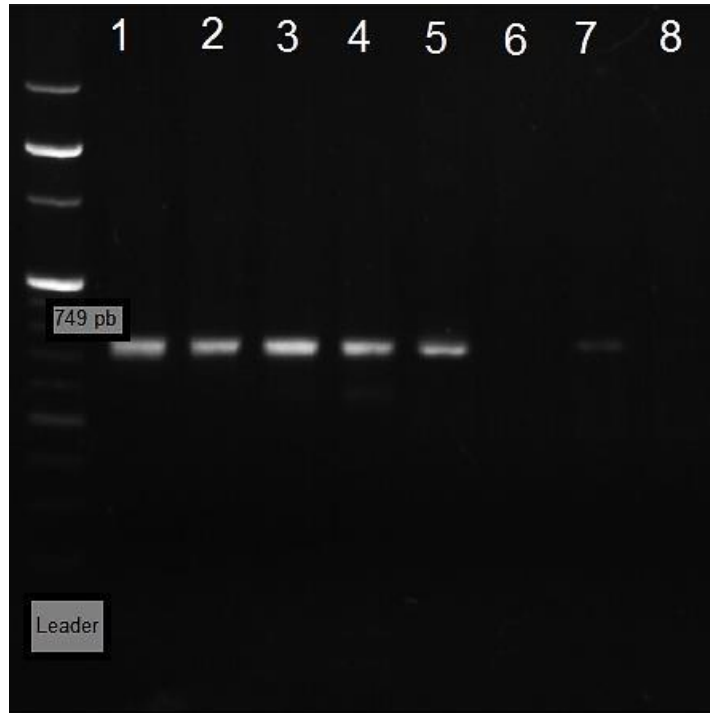
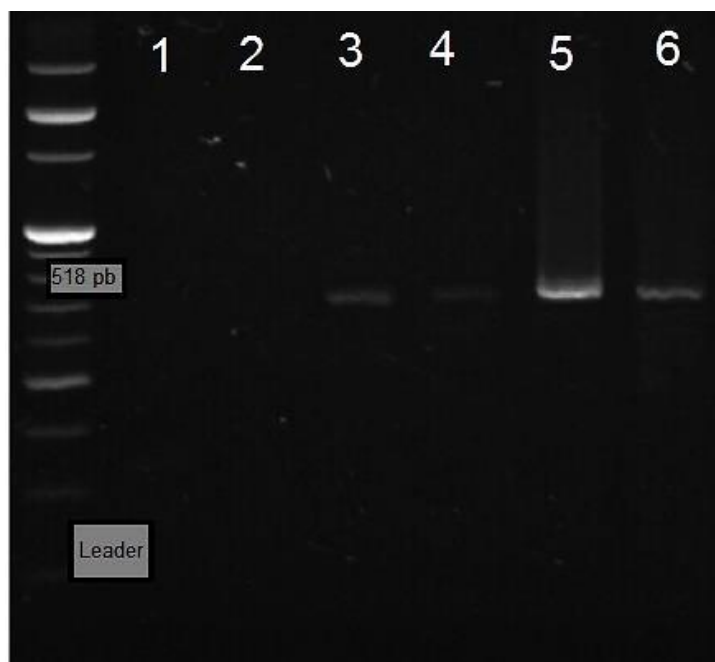


Figura 2. Corrida electroforética de *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* asiladas de pacientes pediátricos. Gel mostrando el fragmento de 518 pb del gen *bla*TEM (cepa 1 y 2 son negativos a BLEE tipo TEM)



ANEXO N° 5: MATRIZ DE CONSISTENCIA

“Caracterización fenotípica y molecular de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes pediátrico, 2018”

Formulación del problema	Objetivos	Antecedentes	Variables	Metodología
<p>Problema General ¿Cuáles son las características fenotípicas y moleculares de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en pacientes pediátricos 2018?</p> <p>Problemas Secundarios ¿Cuáles son las características fenotípicas de las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido de pacientes pediátricos según sexo y grupo etario? ¿Cuál es la frecuencia del gen blaTEM en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de pacientes pediátricos 2018? ¿Cuál es la frecuencia del gen blaSHV en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de pacientes pediátricos 2018? ¿Cuál es la frecuencia del gen blaCTX en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de pacientes pediátricos 2018? ¿Cuál es el género y especie bacteriana de aislamientos productores de betalactamasas de espectro extendido de pacientes pediátricos 2018?</p>	<p>Objetivo General</p> <ul style="list-style-type: none"> • Describir las características fenotípicas y moleculares de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en pacientes pediátricos 2018. <p>Objetivos Específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Conocer las características fenotípicas de las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido de pacientes pediátricos según sexo y grupo etario. 2. Determinar la frecuencia del gen blaTEM en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido. 3. Determinar la frecuencia del gen blaSHV en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido. 4. Determinar la frecuencia del gen blaCTX en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido. 5. Identificar el género y especie bacteriana de aislamientos productores de betalactamasas de espectro extendido. 	<p>Zhang et al (2018), dilucidaron los mecanismo resistente a los medicamentos de las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos en pacientes pediátricos en Shanghai, China, en 41 aislados clínicos de esputo, orina, sangre o drenaje. El análisis de MLTS reveló 16 ST diferentes identificados dentro de los 41 aislados, entre los cuales los más frecuentes representados fueron ST11 (19.5%), ST25 (14.6%), ST76 (14.6%), ST37 (9.8%). Todos los aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos mostraron fenotipos de Multidrogo resistencia y fueron resistentes a ceftazidima, imipenem, piperacilina/tazobactam, ceftriaxona, ampicilina/sulbactam, y aztreonam. Todas las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos contenían al menos una de β-lactamasa de espectro extendido (TEM, SHV, OXA-1, y CTX-M) y seis aislados tuvieron genes con BLEE y AmpC (DHA-1).</p> <p>Varela et al. (2017). determinaron la diversidad genética de cepas extraintestinales de <i>E. coli</i> productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención de salud. Utilizaron 12 cepas extraintestinales de <i>E. coli</i> con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro. Todas las cepas analizadas presentaron resistencia a las cefalosporinas, y resistencia conjunta a quinolonas y aminoglucósidos. En todas las cepas analizadas, se encontró blaCTX-M, con predominio de las blaCTX-M-8, y en dos de estas cepas se evidenció la presencia simultánea de blaCTX-M-9, variantes blaCTX-M-65 y blaCTX-M-147.</p>	<p>Variable dependiente Cepa productora de BLEE</p> <p>Dimensión No presenta</p> <p>Indicador Producción de halo de inhibición.</p> <p>Variable independiente: Identificación molecular de genes blaTEM blaSHV, blaCTX.</p> <p>Dimensión No presenta</p> <p>Indicador Presencia/ ausencia de genes blaTEM blaSHV, blaCTX.</p>	<p>Tipo y nivel de Investigación Observacional, descriptivo, de corte transversal. Diseño no experimental, prospectivo.</p> <p>Población: Aislamientos bacterianos de pacientes pediátricos <5 años, se recolectaron y cepearon durante el segundo semestre del año 2018.</p> <p>Muestra: Lo conformaron las cepas provenientes de pacientes pediátricos- enterobacterias productoras de BLEE (según sistema Vitek). Las muestras se seleccionaran respetando los siguientes criterios de Inclusión y exclusión definidos previamente: Pacientes sin tratamiento antimicrobiano previo, pacientes pediátricos hospitalizados y ambulatorios.</p> <p>Tipo de Muestra: No probabilística por conveniencia.</p> <p>Análisis estadístico de datos Se empleó estadística descriptiva y distribución de frecuencia absoluta, relativa y acumulada. Se determinaron las medidas de tendencia central con un intervalo de confianza de 95% como significativo. Se empleó SPSS v21.0, construcción de tablas y gráficos estadísticos en MS-Excel 2010.</p>