



# **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

---

---

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Microbiología**

**“Determinación de la resistencia a cefotaxima (CTX) y  
ceftazidima (CAZ) en cepas bacterianas provenientes de  
infecciones del tracto urinario”**

**Tesis**

**Que para obtener el título de:**

**Licenciado en Químico Farmacobiólogo**

**Presenta:**

**Daniel Balbuena Mendoza**

**Director de tesis: M.C. Alejandro C. Ruiz Tagle**

**Asesor de tesis: D.C. Alma López García**

**Puebla,Pue.**

**Noviembre, 2020**

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron involucradas en la realización de esta tesis, a aquellas que compartieron su conocimiento conmigo, su corrección y su ayuda; así como las personas que me motivaron y creyeron en mí para no rendirme en los momentos de estrés y sobre todo en los momentos de felicidad.

Gracias a Dios por darme las fuerzas y la fe para salir adelante y de creer en mí cuando sentía que no podía más, me dio la fortaleza y paz para no rendirme.

A mi papá, Javier Balbuena. Quien es el hombre más trabajador, valiente y soñador que conozco, gracias por brindarme siempre tu apoyo papá, lo das todo por nosotros para que seamos felices y no dejemos de soñar, nunca me cansare de agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A mi mamá, Erika M. Sosa. Quien es una mujer que sabe apoyar y dar amor para sentir calma y felicidad, que con sus abrazos sientes una verdadera paz, en donde siempre quiere lo mejor para nuestro camino, gracias por estar siempre ahí cuando lo necesito.

A mi hermano, Javi Balbuena. Quien es el motivo porque quiero seguir adelante y darlo todo por él. El hermano que admiro por su trabajo, valentía, amor, cariño y calidez que resalta, siempre estaré agradecido por acompañarme en mi camino.

A mis hermanas, Sheyla, Rubi y Kristel, quienes quiero mucho y son mi pilar para seguir echándole ganas, gracias por brindarme su apoyo, cariño y amor todos los días.

A mi familia, por quererme y cuidarme tanto, así como siempre darme el apoyo para seguir adelante y no rendirme. Gracias tíos y tías: Petra, Nere, Ángel, Mercedes, Gloria y Everardo.

Muchas gracias a mi director de tesis, el maestro Alejandro Ruiz Tagle. Gracias por permitirme esta oportunidad en realizar este proyecto, por la atención, paciencia y confianza que me tuvo, así como el apoyo que me brindó, siempre se lo agradeceré.

De igual forma, a mi asesora, muchas gracias a la doctora Alma López García, por brindarme su atención y apoyo en este proyecto, siempre tomaré en cuenta sus consejos y ánimos para seguir adelante, le estaré siempre agradecido.

A mis sinodales, la doctora Claudy L. Villagrán Padilla, la maestra Patricia G. Suárez Albores y a la maestra María de la Cruz Meneses Sánchez, por el tiempo, paciencia y dedicación que me brindaron para corregir y contribuir este trabajo, muchas gracias.

A la maestra María Susana Pérez Fernández, quien apoyo donando las muestras de laboratorio para la realización de este trabajo de investigación, gracias por su apoyo.

A mis amigos de la universidad. Con ustedes pase los momentos más geniales e inolvidables, por cada práctica en el laboratorio como las teorías, las pláticas en palapas y lobby. Mis amigos Zule, Jona, Ale, Joce, Nadir, Mafer, Dianita, Víctor, Jenny, Lili, Ari, Aissa,

A mi mejor amiga de la uni, Zule, quien estoy agradecido por su apoyo para realizar este trabajo, así como cada momento vivido en la universidad, práctica, clase, viaje, plática y aventura a su lado, gracias infinitas, por tanto. También al maestro José Ángel, quién me brindo su amistad sincera, sus apoyos y consejos, así como las charlas y risas que tuvimos con Zule, gracias profe nunca lo olvidaré.

A mis amigos de toda la vida, que gracias a Dios continúan conmigo. Gracias a Mari, Gris, Jorge, Víctor, Sandra, Edwin, Diana, Dania y Gio, que han estado conmigo para apoyarme y a pesar de la distancia tenemos momentos para saber uno de otro.

Por último, quiero agradecer a la BUAP y en especial a la facultad de Ciencias Químicas por darme la oportunidad de pertenecer en esta casa de estudios, que me brindó los conocimientos, habilidades, actitudes, aptitudes y valentía para confiar en mí y ser un profesional responsable capaz de enfrentar cosas y seguir adelante, sabiendo que cuento con el apoyo de mi casa de estudios, BUAP-FCQ, muchas gracias por todo.

Índice	
Resumen	i
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Infecciones del tracto urinario (ITU)	2
2.1.1 Clasificación de las ITU	2
2.1.2 Etiología	6
2.1.3 Patogenia	7
2.1.4 Epidemiología	7
2.1.5 Diagnóstico	8
2.2 Tratamiento de las ITU	8
2.2.1 $\beta$ -lactámicos	9
2.2.1.1 Cefalosporinas	11
2.3 Resistencia a los antimicrobianos	11
2.3.1 Clasificación de las $\beta$ -lactamasas	13
2.3.1.1 Origen y tipo de bacterias $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	14
2.3.2 Identificación de bacterias resistentes	16
3. Marco de referencia	17
4. Planteamiento del problema	20
5. Justificación	21
6. Objetivos	22
7. Diseño de estudio	23
8. Esquema general de trabajo	25
9. Material y métodos	26
9.1 Determinación del perfil de sensibilidad por el Método de Kirby-Bauer e identificación de BLEE por el método de disco combinado	27
9.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de dilución en placa	29
10. Resultados	31
11. Discusión	41
12. Conclusión	45
13. Perspectivas	46
14. Bibliografía	47
15. Anexo	52

## Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son uno de los padecimientos que afectan a la población mexicana, consideradas como una de las terceras infecciones bacterianas de mayor importancia. Estas infecciones son causadas por bacterias que pertenecen a la familia enterobacteriaceae, en especial a *Escherichia coli*, siendo el uropatógeno principal en estas infecciones, seguido de *Klebsiella pneumoniae*. En este estudio se trabajaron 43 cepas bacterianas provenientes de una colección de cepas de Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas aisladas de pacientes que presentaron ITU, se inocularon en agar MacConkey y se identificaron por métodos convencionales microbiológicos.

A todas las cepas bacterianas se les realizó la prueba de sensibilidad a antimicrobianos por el método de Kirby Bauer, los antimicrobianos utilizados fueron del grupo  $\beta$ -lactámicos que pertenecen a la familia de las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ). Todas las cepas bacterianas presentaron resistencia a estos antimicrobianos y se les realizó una prueba de confirmación de cepas productoras de enzimas BLEE por el método del disco combinado, el cual consiste en el uso de los mismos antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos en combinación con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico), el fundamento de este método consiste en la sinergia entre el  $\beta$ -lactámico y el inhibidor lo que conlleva al aumento en el diámetro en la zona de inhibición del antimicrobiano. Se obtuvo que las 43 cepas presentaron producción de enzimas BLEE.

Mediante la técnica de dilución en placa se determinó la CMI de cada cepa bacteriana frente a los antimicrobianos CXT y CAZ, la cual consistió en realizar diluciones de cada antimicrobiano en placas con agar Mueller Hinton e inocular cada cepa a trabajar, realizando este procedimiento por duplicado. Después de obtener el crecimiento de cepas en las placas a diferentes concentraciones se hicieron tablas comparativas en donde se registraron las CMI de cada cepa bacteriana trabajada.

## 1. Introducción

Uno de los problemas que se presentan hoy en día para la humanidad es el combatir infecciones, debido a la alta resistencia que presentan las bacterias. El efecto de resistencia bacteriana es considerado como una de las grandes amenazas para la comunidad en general, siendo una problemática alarmante para los profesionales de la salud y en especial para los pacientes, ya que se busca la forma de combatir las infecciones sin llegar a modificar o alterar la resistencia bacteriana.

La resistencia a los antibióticos se ha desarrollado como un proceso natural e inevitable por parte de los microorganismos, que a lo largo de su evolución han desarrollado estrategias que les permiten habitar nuevos nichos y sobrevivir. El descubrimiento de los antibióticos ha sido uno de los acontecimientos más relevantes para tratar las infecciones bacterianas; uno de los pioneros, Alexander Fleming, descubrió el primer antibiótico más usado en su época, la penicilina, pero con el paso del tiempo esto se ha ido devastando, tanto que Fleming advirtió que el uso excesivo de su descubrimiento ocasionaría la selección de bacterias resistentes, con lo cual en la actualidad se viene manifestando (Ponce de León R., et al., 2015).

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son consideradas como el grupo de infecciones bacterianas más frecuentes, y se estima que son responsables del 38% de las infecciones intrahospitalarias y del 80% de las relacionadas con la sonda intrauretral. Durante el año 2014, las infecciones del tracto urinario eran consideradas como las infecciones que ocupaban el tercer lugar en todo México. Además, algo alarmante no solo a nivel nacional sino a nivel mundial, es saber que el incremento de resistencia o multirresistencia por parte de las bacterias limita las opciones de tratamiento dificultando el control de las ITU (Chavolla-Canal, et al., 2016).

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Infecciones del tracto urinario (ITU)**

El tracto urinario es estéril, excepto la uretra, por lo que cuando una bacteria llega a establecerse da lugar a un proceso infeccioso el cual se podrá manifestar por múltiples cuadros clínicos. Las ITU son causadas principalmente por patógenos de origen intestinal que contaminan la uretra y ascienden hasta la vejiga y otras partes del tracto urinario. Estas infecciones pueden ser adquiridas en la comunidad y en los hospitales, además que están asociadas con elevadas tasas de morbilidad en todo el mundo.

En México, las ITU son un problema de salud pública, ya que cada año se registran aproximadamente cuatro millones de casos. Las poblaciones con mayores riesgos de contraer ITU son los recién nacidos, las niñas en edad preescolar, las mujeres con actividad sexual y ambos sexos en edad avanzada (Luna-Pineda, et al., 2018).

Se tiene registrado que las infecciones del tracto urinario prevalecen más en mujeres que en hombres, además hay una probabilidad más alta de padecer una ITU durante el transcurso de su vida, incluyendo si se encuentran en estado de embarazo, aquí la susceptibilidad a padecerla puede incrementar. Por otro lado, en hombres la incidencia es notablemente a partir de la tercera edad; por otro lado, la frecuencia de estas infecciones en personas que padecen diabetes es mayor a la población en general (Wei Tain & Piotr Chlebicki, 2016).

Las ITU constituyen una de las enfermedades más frecuentes en las consultas de la atención primaria, de ahí la importancia en buscar un mejoramiento en el tratamiento de éstas, así como el conocimiento o la búsqueda del perfil de resistencia en bacterias responsables de estas infecciones (Aguinaga, et al., 2018).

#### **2.1.1 Clasificación de las ITU**

Las ITU se pueden clasificar por: a) Su localización (vías urinarias altas o bajas), b) Epidemiología, pueden ser adquiridas en la comunidad o asociadas al cuidado de la salud, c) Factores asociados y según la gravedad en complicadas, no

complicadas o recurrentes, y d) La presencia clínica, en sintomática o asintomática (Orrego-Marin, et al., 2014).

#### **a) Por su localización**

**Infección de vías urinarias altas o pielonefritis:** Esta es una infección masiva que va a afectar principalmente el parénquima renal, presentando síntomas como: fiebre, dolor renal, náusea y vómito. Estas infecciones pueden provocar urosepsis y complicaciones mayores tanto que pueden llegar a dañar al hígado por diseminación, provocando abscesos y daño renal. Para el tratamiento se requiere hospitalización y que el antimicrobiano usado como tratamiento sea administrado por vía intravenosa para poder combatir la infección urinaria (Rané & Ranan, 2013). La pielonefritis afecta el parénquima renal, también los cálices y la pelvis renal. Dentro de los síntomas el paciente presenta ataque al estado general, disuria, hematuria, dolor en la región lumbar, fiebre mayor a 39 °C, y representa del 20% y 30% de todas las sepsis sistémicas de esta infección (Forbes, 2009).

**Infección de vías urinarias bajas:** En este tipo de infección se incluye la cistitis aguda afectando principalmente a la vejiga, la cual se manifiesta por disuria, polaquiuria, urgencia miccional, dolor en la región lumbar, presencia a veces de hematuria y orina turbia con olor fétido. También puede presentarse uretritis gonocócica, que es considerada una infección de transmisión sexual, la cual inflama la uretra. Como microorganismos responsables se encuentran *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* y *Ureaplasma urealyticum*. Los síntomas principales son la secreción uretral mucoso purulento, polaquiuria y disuria. Sin embargo, los signos y síntomas de acuerdo a la localización de la infección (alta o baja) no siempre son tan específicos que permitan establecer un buen diagnóstico (Lozano, 2001).

#### **b) Por epidemiología**

Las infecciones pueden ser adquiridas en la comunidad o nosocomiales. Para el caso de las nosocomiales aparecen 48 horas después de haber ingresado a un hospital, por lo general en pacientes que no presentaban sintomatología o signos de infección al momento de su ingreso (Pemberthy-López, et al., 2011). También

se manifiestan signos cuando se presentan en pacientes que llegan a utilizar un catéter uretral, y otras situaciones que desarrollen la infección, por ejemplo: errores en la técnica de colocación, deficiencia durante los procesos de asepsia y antisepsia del personal de salud o cuando el paciente ha cursado con un procedimiento quirúrgico. Algo también importante a considerar es el estado de salud del paciente, por ejemplo, si presenta diabetes mellitus o insuficiencia renal crónica (Molano, et al., 2012).

**c) Por factores asociados y según gravedad, se conocen como:**

**ITU no complicada:** Tiene síntomas característicos, los cuales son disuria, ardor con la micción, aumento en la frecuencia de la micción, tenesmo vesical, dolor suprapúbico, y raramente hematuria. Tales síntomas afectan al tracto urinario bajo. Por lo general este tipo de ITU se presenta en pacientes con una estructura anatómica y fisiológica normal, sin presentar fiebre, vómito o deshidratación; además de no tener antecedentes de alguna infección urinaria.

**ITU complicada:** Se da cuando aparecen infecciones recurrentes, además que involucra presencia de fiebre, náuseas, vómito, dolor lumbar y ataque al estado general. También se presenta cuando un paciente tiene alguna alteración anatómica del sistema urinario (Calderón J., et al., 2013).

**ITU recurrente:** Se presenta generalmente en mujeres. Las infecciones recurrentes se manifiestan por las recaídas, en donde los síntomas se vuelven a manifestar de nuevo al término del tratamiento y el mismo microorganismo es el responsable o también puede llegar a ocurrir una reinfección, pero en este caso el microorganismo puede ser otro. En estos casos, los pacientes son expuestos a tratamientos más largos con antimicrobianos, lo que puede dar lugar al aumento de la resistencia antimicrobiana (Rané & Ranan, 2013).

**d) Por la presentación clínica**

De acuerdo a la presentación clínica de la infección en pacientes puede ser sintomática o asintomática. Las ITU sintomáticas están acompañadas de signos y síntomas urinarios. En cambio, en las asintomáticas son tomadas en cuenta cuando se detectan más de 100,000 UFC/mL en dos muestras de orina cultivadas, provenientes de pacientes que no presentan signos ni síntomas. En

las mujeres embarazadas toman mayor importancia, ya que al ser asintomática la infección puede llegar a afectar la salud tanto de la madre como la del bebé (Calderón J., et al., 2013).

Otro tipo de ITU es el síndrome miccional, el cual se acompaña de fiebre alta, escalofríos, disuria, polaquiuria y urgencia miccional. En la exploración física destaca la existencia de dolor en las fosas renales, dolor en la parte abdominal. Su incidencia es mayor en mujeres y principalmente es el resultado de la ascensión de microorganismos del tracto urinario inferior y en el diagnóstico señala que no cumple con el criterio clásico de 100,000 UFC/mL en la orina, y además *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* se encuentran en un menor número (Lozano, 2001).

Las infecciones del tracto urinario no siempre se presentan con manifestaciones clínicas ya que pueden ser asintomáticas, pero en ocasiones se pueden presentar fiebre y dolor en una o ambas fosas lumbares considerándose pielonefritis, o disuria y polaquiuria, las cuales serían propias de la cistitis. Las ITU presentan una gran cantidad de manifestaciones clínicas que dependerán del grado de patogenia del agente causal, la zona geográfica, el estado del paciente y tratamiento (Calderón J., et al., 2013).

Para la aparición de ITU hay ciertos factores predisponentes que conllevan a su desarrollo, se sabe que en las mujeres adultas que no presentan embarazo y un tracto urinario normal, la bacteriuria evoluciona con poca frecuencia a cistitis sintomática o pielonefritis. Además, la uretra generalmente esta colonizada por bacterias y al tener relaciones sexuales permite la entrada de bacterias en la vejiga urinaria femenina; además se sabe que los espermicidas aumentan la colonización por bacterias en la vagina (Sobel & Kaye, 2014).

Los aspectos necesarios a considerar son si el paciente presenta anomalías estructurales en el tracto urinario, si ha llegado a padecer enfermedades previas, conocer su historial hereditario, ingesta de medicamentos, además de tomar en cuenta el tipo de oficio. Unos factores más a considerar son:

- No circuncisión

- Hipercalciuria: se recomienda su determinación en infecciones urinarias recurrentes
- Fenotipo sanguíneo P1: mayor tendencia a ser portador de *E. coli* P fimbrias (+), favoreciendo la adhesión al endotelio urinario.
- Menores de dos años
- Uropatía obstructiva y vejiga neurogénica
- Colonización fecal y perineal
- Actividad sexual o abuso sexual
- Presencia de sondas o catéteres  
(Ardila, et al., 2015)

### 2.1.2 Etiología

La mayor parte de los agentes causantes de las ITU son bacterias de origen entérico, en donde el 93% son bacilos gramnegativos, 6% cocos grampositivos y el 1% levaduras, virus, protozoarios o parásitos. Uno de los principales patógenos es *Escherichia coli*, y en un porcentaje menor se encuentra *Staphylococcus saprophyticus*. Entre otros miembros de la familia Enterobacteriaceae se encuentran *Klebsiella* sp, *Proteus* sp y *Enterobacter* sp; también se ha encontrado a *Pseudomonas* sp, en particular cuando el paciente cursa con enfermedades recurrentes, nosocomiales o complicadas a los tratamientos o si el paciente ha sido sometido a algún tipo de instrumentación quirúrgica (Ardila, et al., 2015). También se puede llegar a encontrar a *Enterococcus faecalis* y estreptococos del grupo B. Se sabe que *E. coli* puede causar ITU complicadas y no complicadas, como también *P. mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus* spp. Otro agente es *S. saprophyticus* que puede causar infecciones en mujeres jóvenes, quienes si presentan una vida sexual activa pueden llegar a padecer cistitis. Otro agente es *Staphylococcus* coagulasa positiva que puede llegar a invadir el riñón por diseminación hematógena y provocar abscesos renales. Por último, un patógeno encontrado es *Corynebacterium urealyticum*, siendo nosocomial y aislado frecuentemente en pacientes en tratamiento con catéteres, además de *Candida* spp (Lee S. & Le, 2018).

### **2.1.3 Patogenia**

Se dice que las infecciones comienzan con la contaminación periuretral por un uropatógeno que reside en el intestino, después empieza la colonización bacteriana por la uretra y con ayuda de sus flagelos o pilis, la bacteria puede llegar a colonizar la vejiga o el riñón. La adherencia es considerada como la principal patogenia (Lee S. & Le, 2018).

Cuando ocurre la fijación bacteriana y la invasión en las células epiteliales, los polisacáridos bacterianos activan los receptores del uroepitelio, los cuales reconocen estos antígenos y activan el sistema inmune local, iniciando la respuesta que conlleva el factor nuclear kB, producción de citoquinas y quimiocinas; además la IL-6 y el FNT se empiezan a correlacionar con el grado de inflamación. El tracto urinario tiene su mecanismo de defensa, el cual es el pH ácido de la orina, el flujo descendente de orina del riñón a la vejiga y el vaciamiento por la uretra. También participa la proteína Tamm-Horsfall que se adhiere a las fimbrias tipo I de *E. coli*, evitando así la adherencia de la bacteria en el huésped (Ardila, et al., 2015).

### **2.1.4 Epidemiología**

Las infecciones del tracto urinario son cada vez más frecuentes en las personas, se ha registrado que el 60% de las mujeres tienen una infección urinaria durante su vida, además afecta con mayor frecuencia a las mujeres de edad joven y a las que inician a temprana edad su vida sexual activa, entre los 18 a 25 años de edad, apareciendo de manera espontánea la infección. Por otro lado, se ha registrado que la prevalencia de estas infecciones en hombres es menor que en las mujeres, sin tomar en cuenta si los hombres presentan alguna anomalía en la estructura urológica o si se encuentran dentro de la tercera edad (Lee S. & Le, 2018).

Es necesario conocer los datos epidemiológicos del paciente, para así determinar si puede estar asociada o no a mala atención médica o asociada a la comunidad; además, también influyen los agentes causales y hasta la ubicación geográfica, por eso la epidemiología es muy importante, ya que puede ayudar

para una buena selección de tratamiento adecuado para el paciente (Tandogdu & Wagenlehner , 2016).

### 2.1.5 Diagnóstico de las ITU

El diagnóstico presuntivo de las ITU se puede realizar mediante el uroanálisis, pero para tener una confirmación diagnóstica se requiere el aislamiento del uropatógeno. Dentro de las pruebas que se pueden realizar para el uroanálisis se encuentran las siguientes:

- **Tiras reactivas:** las cuales son recomendadas para tener una aproximación diagnóstica; con la determinación de la presencia de esterasa leucocitaria y nitritos.
- **Microscopio óptico:** permite detectar bacteriuria (bacterias en orina), la cual se puede observar con ayuda de un examen en fresco o mediante una tinción de Gram, una prueba presuntiva será la presencia de una o más bacterias en la muestra de orina no centrifugada, así como la presencia de cinco o más leucocitos por campo.
- **Cultivo:** permite realizar una cuantificación, detectando el número de bacterias aproximado por mL de orina y así dar una interpretación con base al criterio de Kass, ( $\geq 10^5$  UFC/mL de orina se considera ITU positiva). Además, con el cultivo también se puede identificar al patógeno responsable de la infección, por otro lado, se puede realizar un antibiograma para conocer el perfil de sensibilidad antimicrobiano.
- **Pruebas de localización de la infección:** se realizan estudios de adherencia, receptores inmunológicos y excreción enzimática.
  - **Técnicas de imagen:** radiografía simple de abdomen, cistouretrografía miccional, urografía intravenosa y ecografía renal (Lozano, 2001).

### 2.2 Tratamiento de las ITU

El principal tratamiento para las ITU es mediante la administración de  $\beta$ -lactámicos, que son sustancias químicas que tienen la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos infecciosos. En un principio los antibióticos, se generaban a partir de compuestos orgánicos con origen biológico, los cuales afectan el crecimiento de otros microorganismos; pero hoy

en día los antibióticos son generados a partir de sustancias químicas o semisintéticas sobre las cuales se han hecho modificaciones químicas para así mejorar sus propiedades farmacocinéticas o ampliar su espectro de acción, incluso, para disminuir la toxicidad y así mejorar la función del antibiótico. Los antibióticos se han clasificado según su:

- Estructura química
- Espectro de acción: De amplio espectro, intermedio y reducido.
- Efecto antimicrobiano: Bacteriostáticos y bactericidas.
- Mecanismo de acción: Inhibidores de la síntesis de pared celular, de la permeabilidad de la membrana plasmática, de la síntesis proteica, de la síntesis de ácidos nucleicos y de las rutas metabólicas (Lorenzo, et al., 2008).

### **2.2.1 $\beta$ -Lactámicos**

Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que tienen como característica poseer en su estructura química, el anillo  $\beta$ -lactámico. Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana y promueven la activación de enzimas autolíticas que llevan a la lisis bacteriana (Lorenzo, et al., 2008).

Se consideran compuestos que presentan una acción bactericida lenta, muy independiente de la concentración plasmática, además de poca toxicidad para el organismo humano y con un amplio margen terapéutico. Sin embargo, con el fin de favorecer aún más el espectro de acción, se han ido incorporando nuevas moléculas con mayor actividad sobre bacterias gramnegativas (BGN), pero con el avance del tiempo, las bacterias han adquirido resistencia y se ha estado limitando el uso de estos antibióticos (Seija & Vignoli, 2008).

El mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos es por 2 tipos, por inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La pared bacteriana es una estructura que envuelve a las bacterias de todos los géneros, y está compuesta por una capa llamada peptidoglucano (figura 1). El anillo  $\beta$ -lactámico presenta una estructura similar en la región de síntesis de peptidoglucano, por lo que es capaz de unirse a éste de forma covalente e

impedir así la formación de la pared bacteriana, quedando la bacteria expuesta al medio y morir por cambios en la presión osmótica (figura 2) (Suárez & Gudiol, 2009).

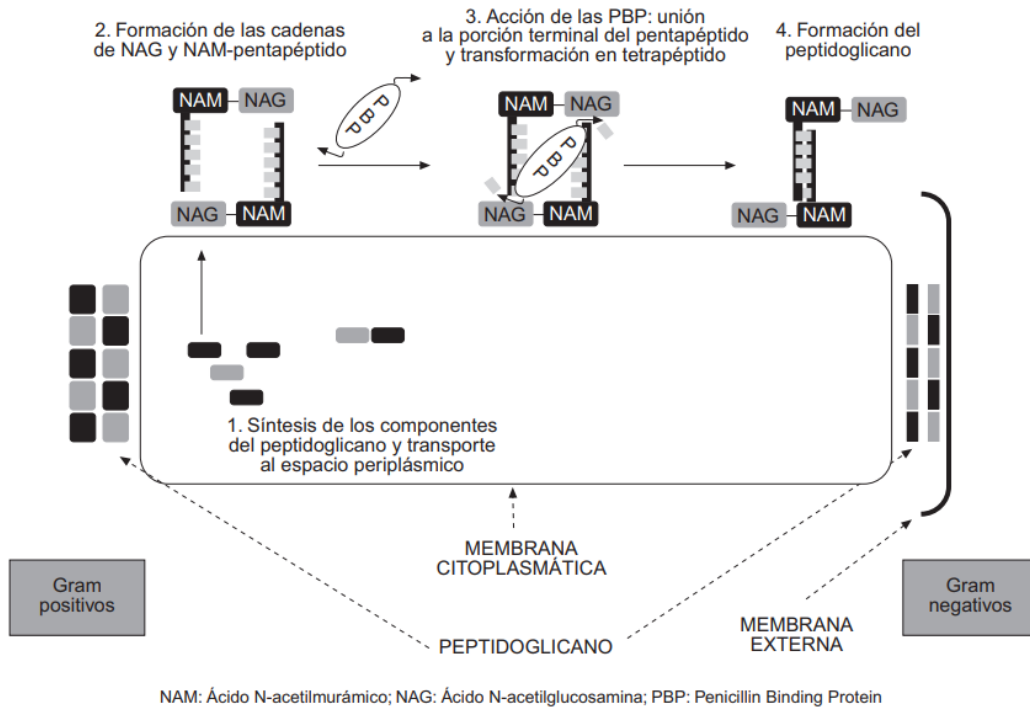


Figura 1. Etapas de formación de la pared celular. Tomado de Suárez & Gudiol, 2009.

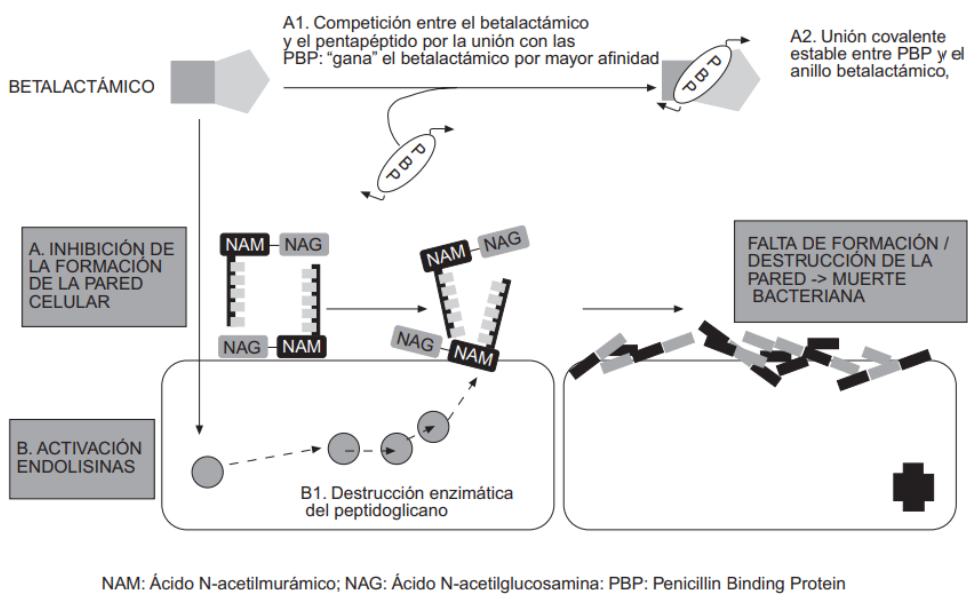


Figura 2. Mecanismo de acción de los betalactámicos. Tomado de Suárez & Gudiol, 2009.

### **2.2.1.1 Cefalosporinas**

Dentro de los  $\beta$ -lactámicos, las cefalosporinas se han utilizado como tratamiento para las ITU. Este tipo de antimicrobianos fueron introducidos por Guisepe Brotzu, son de origen natural, obtenidos de la fermentación de *Cephalosporium acremonium*. Las cefalosporinas tienen una estructura como de las penicilinas y son de los más comúnmente prescritos y administrados para tratar infecciones bacterianas por patógenos, como: *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Enterobacter aerogenes* y *Neisseria* sp. (Etebu & Arikekpar, 2016).

Las cefalosporinas presentan el mismo mecanismo de acción que un  $\beta$ -lactámico, es decir, tienen acción sobre la pared bacteriana (Madigan T. , 2009). Las cefalosporinas han ido sufriendo cambios a lo largo del tiempo, es por ello que se dividen por generaciones de acuerdo a su acción principal, por su acción de espectro, farmacología clínica y de la actividad intrínseca. (Mehta & Kumar S. , 2016). Entre las de tercera generación se encuentra cefotaxima con una elevada actividad sobre las enterobacterias, empleándose en sepsis de origen urinario. Otro antibiótico es ceftazidima, se considera de elección para el tratamiento de las infecciones urinarias (Etebu & Arikekpar, 2016).

### **2.3 Resistencia a los antimicrobianos**

Actualmente existe una gran cantidad de microorganismos capaces de adquirir resistencia a múltiples antibióticos, con lo cual propicia que la efectividad de los tratamientos para inhibir las bacterias patógenas responsables de enfermedades se vea disminuida. Con ello, definiendo a la resistencia antimicrobiana como la capacidad de las bacterias u otros microorganismos para contrarrestar el efecto de algún antibiótico. La proliferación de cepas resistentes como consecuencia del uso de antibióticos se da por un proceso natural que se ha acelerado por la aplicación inadecuada de ciertos fármacos (De la Fuente-Salcido , et al., 2015).

La resistencia antimicrobiana representa un grave problema de salud pública para la sociedad humana. Anteriormente la resistencia se limitaba a bacterias causantes de infecciones de tipo intrahospitalario, pero han empezado a emerger bacterias resistentes en la comunidad relacionadas con las ITU, lo que

genera preocupación debido a las complicaciones que se pueden manifestar (Brooks, et al., 2011).

Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediante mecanismos generales, como: a) bombas de expulsión, b) disminución de la permeabilidad, c) alteración del sitio blanco y d) modificación enzimática del antibiótico (Calderón Rojas & Aguilar Ulate, 2016).

#### **a) Bombas de expulsión**

Las bacterias pueden llegar a expresar bombas de expulsión, favoreciendo la expulsión del antibiótico y con esto disminuyendo la concentración intracelular, logrando así una disminución de la eficacia del antimicrobiano (Lorenzo, et al., 2008).

#### **b) Disminución de la permeabilidad**

Las bacterias generan cambios en la membrana externa, para no permitir el paso de antibióticos al espacio periplásmico. Esto es mediado por porinas, que al disminuir su expresión se dificulta la entrada del antimicrobiano (Tafur, et al., 2008).

#### **c) Alteración del sitio blanco**

Un mecanismo más de resistencia por parte de la bacteria es el de la alteración del sitio blanco el cual consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la bacteria como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, disminuyendo la afinidad del sitio blanco con el antimicrobiano (Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013).

#### **d) Modificación enzimática del antibiótico**

Las bacterias producen ciertas enzimas, como  $\beta$ -lactamasas, que tienen la capacidad de hidrolizar la estructura e inactivar la función del antibiótico, lo cual les proveen resistencia al mismo. Estas enzimas pueden ser codificadas por genes cromosómicos, por plásmidos y/o transposones capaces de inactivar una gran variedad de antibióticos. Las enzimas capaces de inactivar los mecanismos de los  $\beta$ -lactámicos se llaman  $\beta$ -lactamasas; entre otras enzimas son las

modificadoras de aminoglucósidos como las acetiltransferasas, adenilasas y fosfotransferasas (Lorenzo, et al., 2008).

Los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas pueden ser constitutivos o naturales e inducibles. Para ello la enzima inducible se expresará en presencia del antibiótico  $\beta$ -lactámico, así la bacteria presenta la resistencia y que además puede mantener el mecanismo de control y producción de la enzima. Para el caso de la enzima natural, la bacteria tiene la capacidad de expresarla de manera continua, independientemente si hay o no estímulo por parte del antibiótico (Brooks, et al., 2011).

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

Las  $\beta$ -lactamasas se han clasificado de acuerdo a sus características, una es con base molecular y otra con base funcional, siendo las siguientes:

- a) **Clasificación de Amber:** (1980): se basa en la secuencia de aminoácidos de la enzima, clasificándolas en cuatro clases: A, B, C y D. Las clases A, C y D tienen una serina en su sitio activo (serin- $\beta$ -lactamasas), mientras que la clase B necesitan la presencia de un metal (metalo- $\beta$ -lactamasas) en este caso zinc, para llevar a cabo su actividad (Ambler , 1980).
  
- b) **Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros:** Está basada en las características del sustrato de hidrólisis y el patrón de inhibición, se clasifican en 3 grupos (tabla 1) (Bush & Jacoby , 2009).

**Tabla 1. Clasificación de  $\beta$ -lactamasas y sus inhibidores**

Grupo (B-J-M)	Características	Clase molecular (Amber)	Inhibidor ácido clavulánico	Inhibidor EDTA	Enzimas representativas
1	Cefalosporinasas	C	-	-	<i>E.coli</i> AmpC; MIR-1
2 <sup>a</sup>	Penicilasas	A	+	-	PCI
2b	Enzimas de amplio espectro	A	+	-	TEM1,2; SHV1
2be	Enzimas de espectro extendido (BLEE)	A	+	-	TEM3-28; SHV2-6

2br	Enzimas de amplio espectro	A	+/-	-	TEM30-36; TRC-1
2c	Carbenicilasas	A	+	-	PSE-1; CARB3, RTG-4
2d	Cloxacilinasas	D	+/-	-	OXA1-48; PSE2
2e	Cefalosporinasas	A	+	-	CepA
2f	Carbapenemasas	A	+/-	-	KPC-2, VIM-1, SME-1
3	Metallo- $\beta$ -lactamasas	B	-	+	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1

Fuente: (Bush & Jacoby , 2009)

Por otro lado, existen sustancias que actúan como inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas, que son un grupo de medicamentos que ejercen acción en combinación con  $\beta$ -lactámicos que permiten la inactivación de determinadas  $\beta$ -lactamasas producidas por bacterias. El uso de inhibidores constituye uno de los desarrollos importantes como alternativa terapéutica. El primer inhibidor comercializado fue el ácido clavulánico, conocido como un inhibidor suicida, el cual es producido por *Streptomyces clavuligerus*. La estructura química que presenta esta sustancia le permite interactuar con la enzima  $\beta$ -lactamasa secretada por ciertas bacterias e inhibir a la enzima (Gómez, et al., 2015).

Con la introducción del ácido clavulánico se impulsó el desarrollo de nuevas moléculas, como el sulbactam y el tazobactam, que presentan el anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura con lo cual tienen la capacidad de unirse de forma irreversible a las  $\beta$ -lactamasas e inactivarlas (Lorenzo, et al., 2008).

### 2.3.1.1 Origen y tipos de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las primeras  $\beta$ -lactamasas mediadas por plásmidos en bacterias gramnegativas (TEM-1, SHV-1) se describieron en los años 60. Estas enzimas se encuentran con frecuencia en enterobacterias, principalmente en *Klebsiella* sp y *Escherichia coli*. La presencia de BLEE se asocia también con alta resistencia a otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, como son las fluoroquinolonas, aminoglucósidos o cotrimoxazol (García Tello, 2014).

Por el año 1983 en Alemania se descubrió la primera enzima a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae*, capaz de hidrolizar a las cefalosporinas de amplio

espectro, recibiendo el nombre de SHV-2. Posteriormente, en 1984 en Francia se describió otra enzima, una TEM-3, con un fenotipo semejante a la anterior. Con el paso del tiempo, en 1989, se encontró en un aislado de *E. coli* una enzima diferente a las anteriores, denominada CTX-M, con actividad hidrolítica con especificidad por cefotaxima. Esta última enzima ha adquirido una gran relevancia debido a su dispersión extra e intrahospitalaria, pudiéndose extender por varios países. Para el año 1991, en Turquía y Francia se detectaron por primera vez las oxecilinasas, fueron aisladas en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* las cuales son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico, pero presentan un fenotipo similar al de las BLEE (Seral García , et al., 2010).

Continuamente se están descubriendo nuevas BLEE, con lo que en la actualidad se suman más de 200 tipos. Otras familias de BLEE menos prevalentes son las PER, VEB-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, CME-1, GES/IBS (Morejón García , 2013).

Otro tipo de enzimas que se han descrito en enterobacterias como *E.coli*, son del tipo AmpC, que es una proteína codificada por el cromosoma de la bacteria y su expresión es inducible en presencia de ciertos  $\beta$ -lactámicos y ácido clavulánico. Según un estudio, la recurrencia natural de AmpC suele ser común en *Pseudomonas*, pero también se han encontrado en enterobacterias, las cuales se pueden expresar en niveles basales y permitir la resistencia a penicilina G, aminopenicilinas, ureidopenicilinas, monobactamas y carbapenem. Otro problema con estas enzimas es que los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas no tienen efecto alguno sobre ella (Delgado , et al., 2013).

Hoy en día se desconoce la prevalencia que tienen las BLEE, según un estudio realizado por el programa de vigilancia antimicrobiana SETRY, un programa que monitorea patógenos en todo el mundo y los cambios en los patrones de resistencia a través del tiempo, refleja un incremento de resistencia bacteriana con lo cual ha causado una situación alarmante. Por otra parte, el incremento en el número de aislamientos va ocurriendo de forma paulatina y las cifras que se manejan en la actualidad no se consideran nada discretas, ya que van ascendiendo la cantidad de enzimas encontradas, 233 BLEE tipo TEM, 228 tipo SHV (principalmente en *E. coli* y *Klebsiella* sp), tipo OXA asciende a más de 500 dentro de la clase D y 43 tipo GES (García Hernández, et al., 2011).

### 2.3.2 Identificación de bacterias resistentes

La detección de bacterias resistentes en el Laboratorio de Microbiología Clínica se realiza por métodos fenotípicos para detectar enzimas como las  $\beta$ -lactamasas, y por métodos genotípicos, los cuales utilizan técnicas moleculares para la detección de genes presentes en las bacterias con capacidad de codificar enzimas de resistencia (García Tello, 2014).

El *United States Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ha publicado guías para la detección de producción de BLEE en enterobacterias, en especial en *E.coli*, *Klebsiella* sp y *Proteus* sp.

La prueba de sensibilidad a antimicrobianos, también llamado antibiograma o prueba de Kirby Bauer, es un método fenotípico que tiene como objetivo evaluar la respuesta de un microorganismo frente a uno o varios antimicrobianos y ver el grado de sensibilidad o resistencia ante ellos e identificarlos mediante las recomendaciones (tabla 2) del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015) Además, existe un método llamado disco combinado para identificar bacterias productoras de BLEE, en donde se trabaja con cefotaxima y ceftazidima con/sin ácido clavulánico mediante difusión en agar, en este caso Müller Hinton (Seral García , et al., 2010).

<b>Tabla 2. Antimicrobianos usados en los antibiogramas para Enterobacterias, según los criterios del CLSI.</b>				
Agente antimicrobiano	Concentración ( $\mu$ g)	Halos de inhibición (mm)		
		S	I	R
Cefotaxima (CTX)	30	$\geq 26$	23-25	$\leq 22$
Ceftazidima (CAZ)	30	$\geq 21$	18-20	$\leq 17$

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

### 3. Marco de referencia

Las infecciones por bacterias son muy comunes en varias partes del mundo, para ello se han venido tratando con antibióticos, en este caso  $\beta$ -lactámicos, es por ello su importancia e investigación sobre el manejo y control de esos antibióticos para que pueda proporcionar información con respecto al uso de los antibióticos, pudiendo ser como guía para un mejor tratamiento.

En un estudio realizado en hospitales de la ciudad de Makkah, Arabia Saudita por Alyamani y colaboradores entre el 2014 y 2015, analizaron un total de 58 aislamientos bacterianos de pacientes con infecciones del tracto urinario. Como resultado se obtuvo que el mayor número de aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a ampicilina en un 96.61%, cefotaxima 76.27%, cefepima 74.58%, ceftazidima 81.36%, aztreonam 89.83% y cefoxitina 15.25% (Alyamani, et al., 2017).

Castro y colaboradores realizaron un estudio en el Laboratorio Clínico de la Universidad de San Buenaventura en Cartagena (Colombia), del 2005 al 2008 con el objetivo de determinar el patrón de resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas asociadas a infecciones urinarias en pacientes ambulatorios y hospitalizados, se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana en cefalosporinas y como resultado obtuvieron porcentajes de resistencia que fueron del 50 a 80 % de los aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* quienes presentaron resistencia a  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Por otro lado, *E. coli* y *K. pneumoniae* mostraron un alto porcentaje de resistencia a cefalosporinas de segunda generación y baja resistencia (23 y 36 %) a las de tercera generación (CTX y CAZ), pero en el caso de *Proteus mirabilis* presentó susceptibilidad a las cefalosporinas probadas. Además, demostraron que la resistencia bacteriana en pacientes hospitalizados fue mayor que en pacientes ambulatorios (Castro Orozco, et al., 2010).

En Latinoamérica también se han realizado estudios sobre resistencia bacteriana, un estudio por Pereira y colaboradores entre septiembre y noviembre de 2012 en el Laboratorio San Roque en Asunción, Paraguay, se buscaron cepas productoras de enzimas  $\beta$ -lactamasas tipo BLEE en diferentes tipos de pacientes ambulatorios y hospitalizados que padecían infección urinaria. Estudiaron 481

cepas de enterobacterias provenientes de pacientes ambulatorios e internados en diferentes servicios clínicos y aislaron de fuentes, como orina y secreción purulenta. Como resultados obtuvieron que la cepa más frecuente fue *E. coli* en un 13.5% y *K. pneumoniae* con un 3.5%, además, observaron que *E.coli* se encontraba en mayor porcentaje en pacientes ambulatorios (92.3%) que en pacientes internados (7.7%). La cepa que presentó mayor producción de BLEE fue *K. pneumoniae* (30.8%) y en menor porcentaje *E.coli* (6.6%). Los autores señalaron que el tipo de BLEE según el fenotipo tuvo actividad cefotaximasa (49%) y ceftazidimasa (51%). Por último, con la información de cada muestra proveniente de pacientes, las cepas de mayor productividad BLEE provienen de pacientes internados (31.6%) que de pacientes ambulatorios (6.8%) (Pereira , et al., 2016).

Un estudio realizado por Escalante y colaboradores en el Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo de Chiclayo, Perú; mostraron resultados de bacterias portadoras de  $\beta$ -lactamasas tipo BLEE en una población de 59 pacientes con edades de alrededor de 60 años y observaron que ocho pacientes presentaron bacterias productoras de BLEE en hemocultivos 13.5% y cincuenta y uno en urocultivos 86.4%, en donde el 61% se confirmó como *E.coli* y 39% *K. pneumoniae*. Los antibióticos usados fueron cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona y ceftazidima), fluoroquinilonas y aminoglucósidos (Escalante M., et al., 2013).

En México hay pocos estudios acerca de la resistencia bacteriana, uno de ellos fue realizado en el hospital de servicio de Medicina Interna del Nuevo Sanatorio Durango de la Ciudad de México donde Páramo y colaboradores buscaron identificar la frecuencia de patógenos y los patrones de resistencia a antimicrobianos por microorganismos aislados de pacientes con infección en vías urinarias adquirida y de pacientes hospitalizados. Los resultados mostraron que *E. coli* se aisló con mayor frecuencia (91.5%), donde el 53.2% no fueron productoras de BLEE y el 38.2% productoras de BLEE. Las cepas de *E. coli* no productoras de BLEE fueron sensibles a cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona y cefotaxima) mientras que las cepas de *E. coli* productoras de BLEE fueron resistentes a varios antibióticos, entre ellos ceftriaxona con un 88.9% y cefotaxima con un 88.9% (Páramo Rivas , et al., 2015).

Un estudio más por Chavolla y colaboradores realizado en el Hospital General Regional Número 46 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del estado de Jalisco durante el periodo 2007-2015, en donde se realizó un análisis descriptivo de las muestras positivas a bacteriuria significativa. Analizaron 8164 cultivos de orina durante ese periodo, en donde *E. coli* fue aislada en un 67.89%, seguido de *Klebsiella pneumoniae* en un 5.34%, *Enterococcus faecalis* 3.91%, *Proteus mirabilis* 3.82%, *P. aeruginosa* 2.87%, *Acinetobacter baumannii* 0.51%. *E. coli* fue la bacteria más aislada a partir de infecciones del tracto urinario y la que presentó mayor resistencia a los antibióticos fue *P. aeruginosa* seguido de *A. baumannii* (Chavolla-Canal, et al., 2016).

Garza-Montúfar y colaboradores realizaron un estudio en urocultivos positivos de pacientes de consulta externa del Laboratorio Central del Hospital General de Zona del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Monterrey, Nuevo León, México en el período de diciembre de 2015 a mayo de 2016 con el objetivo de identificar patrones de resistencia bacteriana. Trabajaron con 190 urocultivos, en donde 90 provenían de mujeres y 100 de hombres. El microorganismo más aislado fue *E. coli* (61.1%), seguido de *K. pneumoniae* (6.8%), *P. mirabilis* (6.3%), *P. aeruginosa* (6.3%) entre otros microorganismos. *E. coli* presentó una sensibilidad del 100% a imipenem, y una resistencia del 80% a quinolonas, 30% a ceftazidima y 40% a cefotaxima. Para *K. pneumoniae* mostró una sensibilidad a imipenem en 92%, y resistencia del 100% a ampicilina y para cefalosporinas en un 72%, en donde un 60% para ceftazidima y 12% para cefotaxima. Con sus resultados concluyen que se debe dar otro tipo de antibiótico, ya que mostraron altos niveles de resistencia (Garza-Montúfar , et al., 2018).

#### 4. Planteamiento del problema

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son consideradas como una de las más frecuentes, en la actualidad estas infecciones se han venido tratando con diversos antibióticos incluidos los  $\beta$ -lactámicos, sin embargo, estas infecciones se han prolongado y los tratamientos con frecuencia son poco efectivos, lo que representa una seria preocupación para el tratamiento farmacológico. Este problema se ha incrementado notablemente, principalmente por la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas, ya que afectan la acción de los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos y otras familias de antimicrobianos.

Existe un método fenotípico que permite identificar la resistencia por cepas productoras de BLEE. Estos métodos se han ido ocupando alrededor del mundo para estudio de resistencia bacteriana, en este caso de las ITU. En México también se han venido realizando estudios para conocer más de este tema, además en Puebla también hay investigaciones de esto, pero estos métodos utilizados muestran información cualitativa y no dan información del grado de resistencia (cuantitativa) que presentan las cepas bacterianas ante los agentes utilizados; por lo que con este proyecto se pretende dar respuesta a la siguiente pregunta:

¿Cuál es la concentración de los agentes antimicrobianos, cefotaxima y ceftazidima, necesaria para conseguir el efecto antimicrobiano en cepas productoras de BLEE?

## 5. Justificación

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran entre las primeras causas de atención primaria o de muerte humana y qué, además, en países en desarrollo su mortalidad es aún mayor. Las infecciones por microorganismos resistentes a los antimicrobianos son una amenaza significativa para la salud pública, ya que la gravedad de la infección ocasionada por una cepa resistente tiende a ser mayor, por no contar con suficientes opciones terapéuticas. La resistencia a los antimicrobianos es multifactorial y con alta variabilidad que depende, entre algunos factores como el uso excesivo de los antimicrobianos o la variabilidad epigenética de las bacterias hoy en día. Para ello, hay datos que proporcionan información para configurar un mejor panorama epidemiológico que coadyuve a la realización de programas de control y del tratamiento exitoso de las enfermedades infecciosas.

La técnica de dilución en placa empleada en este proyecto ayudará a entender y conocer el nivel o grado de resistencia que tienen bacterias comunes responsables de las infecciones del tracto urinario y que además proporcione información de forma cuantitativa de cada antibiótico probado, así con estos datos obtenidos dará información para mejorar las guías clínicas para el tratamiento empírico de los pacientes con síntomas de infección del tracto urinario y que pueda mejorar las políticas de prescripción médica vigentes.

La resistencia bacteriana en cepas que dan lugar a ITU es muy alta; se ha reportado en Europa, Latinoamérica e inclusive en México, pero hay pocos reportes en Puebla y la información es escasa por lo que este estudio es importante para indicar el grado de resistencia bacteriana ante antibióticos que se viene dando en el estado de Puebla.

## 6. Objetivos

### Objetivo General

- Determinar el nivel de resistencia a cefotaxima y ceftazidima en cepas bacterianas provenientes de infecciones del tracto urinario.

### Objetivos Particulares

- Determinar la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas provenientes de infecciones del tracto urinario por el método del disco combinado.
- Determinar por la técnica de dilución en placa la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cefotaxima y ceftazidima de las cepas productoras de BLEE.

## **7. Diseño de estudio**

### **a) Tipo de estudio**

Transversal, observacional, descriptivo y prospectivo.

### **b) Universo del estudio**

Cepas bacterianas de una colección del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, aisladas de pacientes de todas las edades y sin distinción de género que presentaron infección del tracto urinario.

### **c) Tamaño de muestra**

43 cepas bacterianas aisladas durante el periodo de Agosto-Diciembre 2018

### **d) Sede y lugar del estudio**

El estudio se realizó en la Ciudad de Puebla, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### **e) Criterios de selección**

Criterios de inclusión:

- Cepas bacterianas que provinieron de muestras de pacientes que presentaron infección del tracto urinario.
- Cepas que pertenecieron a la familia enterobacteriaceae
- Cepas que presentaron resistencia a cefotaxima y ceftazidima.

Criterios de exclusión:

- Cepas que pertenecieron a una familia distinta a la familia enterobacteriaceae.
- Cepas bacterianas que presentaron sensibilidad a cefotaxima y ceftazidima.

**f) Recursos humanos**

Director: M.C. Alejandro C. Ruiz Tagle

Asesor: D.C. Alma López García

Tesista: pQFB. Daniel Balbuena Mendoza

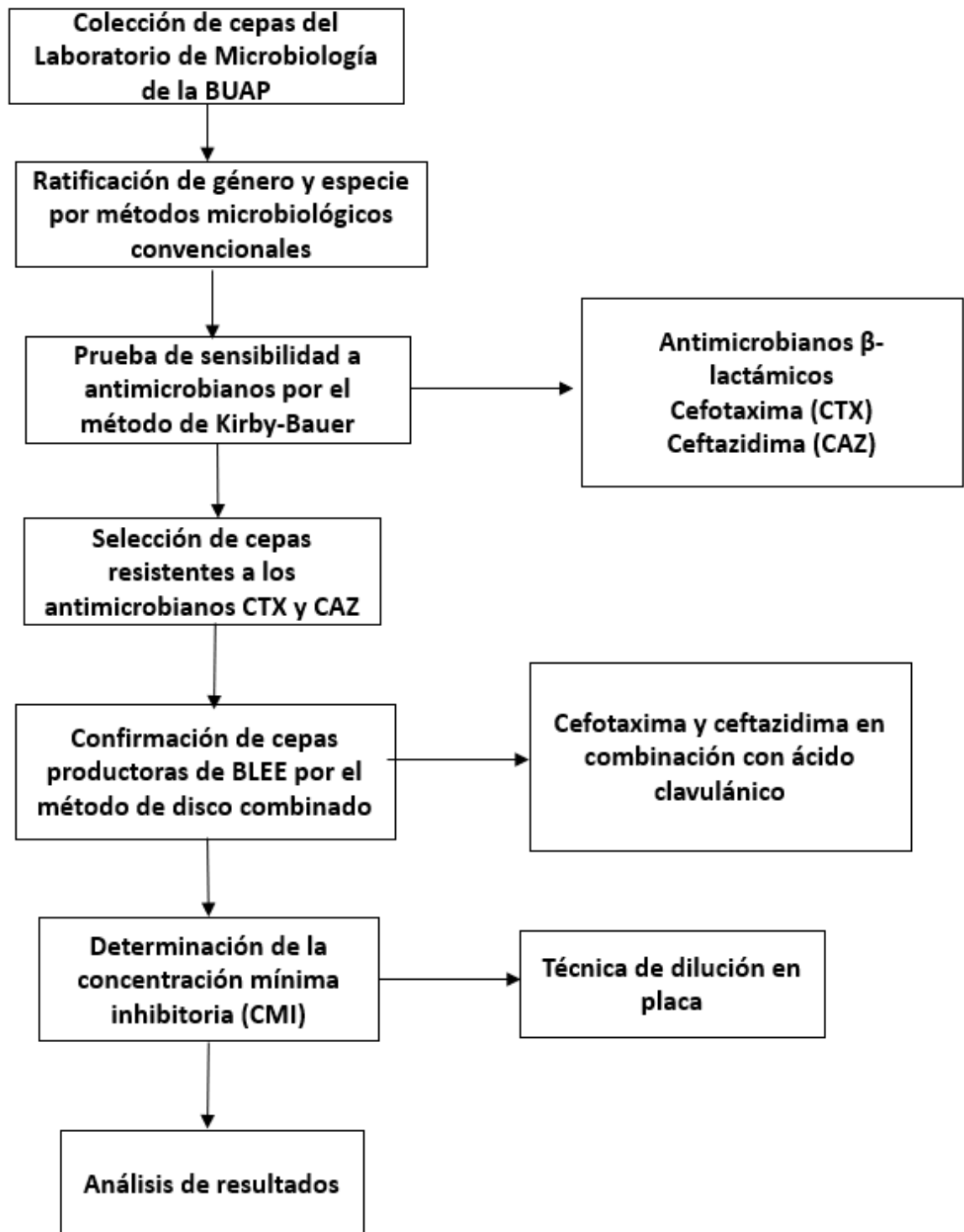
**g) Recursos financieros**

Proyecto de Cuerpo Académico Microbiología 038

**h) Diseño estadístico**

Los resultados que se obtuvieron se analizaron mediante estadística descriptiva (gráficas y tablas).

## 8. Esquema general de trabajo



## 9. Materiales y métodos

Se utilizaron los equipos necesarios, como vórtex, autoclave e incubadora, para la realización de este trabajo que pertenecen al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

En este estudio se trabajó con cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, sus características se mencionan en la tabla 3.

Para la realización de esta investigación se trabajó con 43 cepas bacterianas provenientes de una colección de cepas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP que fueron aisladas de pacientes que presentaron infección del tracto urinario (ITU), registrando su edad y sexo. El género y la especie de las cepas se ratificó por métodos microbiológicos convencionales.

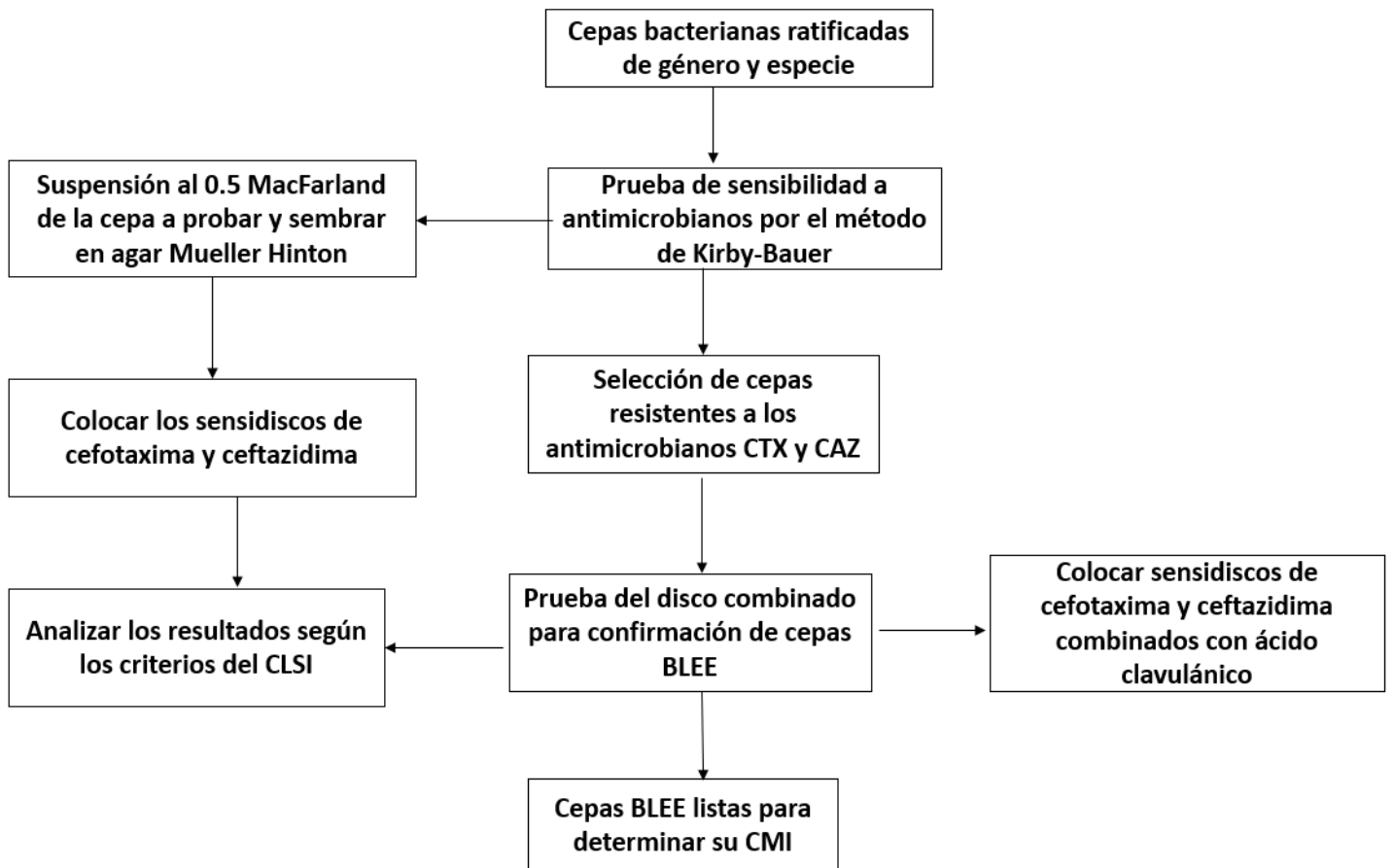
**Tabla 3. Características de cepas ATCC**

Cepa ATCC	Descripción	Condiciones de crecimiento	Notas	Nivel de bioseguridad
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Designación: FDA cepa Seattle 1946</li> <li>- Nombre depositado: <i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani y Chalmers</li> <li>- Propiedades antigénicas: serotipo 06, biotipo 1</li> <li>- Cepa control de CLSI para antimicrobianos</li> <li>- Pruebas de susceptibilidad:               <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Control negativo para producción de toxina LT.</li> <li>2) Pruebas de susceptibilidad de neomicina, colistina, cefalexina, gentamicinas, tetraciclinas, cloranfenicol, entre otros.</li> </ol> </li> </ul>	Medio: Agar o caldo soya tripticasa  Temperatura: 37°C  Atmósfera: aerobia	ATCC 25922 es una cepa de referencia para las pruebas de susceptibilidad a antibióticos.  Los pases en caldos pueden dar lugar a cambios en los niveles de CMI, por lo que se recomienda mantener en agar.	1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Designación: K6</li> <li>- Nombre depositado: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Schroeter) Trevisan</li> <li>- Control positivo para producción de <math>\beta</math>-lactamasa de espectro extendido.</li> <li>- Produce <math>\beta</math>-lactamasa SHV18</li> <li>- Cepa control de calidad CLSI para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.</li> </ul>	Medio: Agar o caldo nutritivo.  Temperatura: 37°C  Atmósfera: aerobia	ATCC 700603 es una cepa de referencia para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.	2

### **9.1 Determinación del perfil de sensibilidad por el Método de Kirby-Bauer e identificación de BLEE por el método de disco combinado.**

- a. Se sembraron las cepas bacterianas en agar soya tripticasa
- b. Se realizó una suspensión de las colonias a 0.5 de la escala de MacFarland en solución salina isotónica (SSI).
- c. Se sembró en una placa de agar Mueller Hinton con un hisopo en 3 direcciones diferentes.
- d. Se colocaron sensidiscos de antimicrobianos: cefalosporinas con/sin ácido clavulánico (CAZ, CAZ-CLA, CTX, CTX-CLA) con ayuda de un dispensador de antibióticos
- e. Se incubó a 37°C por 24 horas.
- f. Se interpretaron los resultados con base a los criterios establecidos por el CLSI.
- g. Para confirmación de cepas resistentes, se tomaron los criterios para cefotaxima un diámetro de resistencia  $\leq 22\text{mm}$ , y para ceftazidima un diámetro de resistencia  $\leq 17\text{mm}$ .
- h. Para la confirmación de cepas productoras de BLEE se consideraron las cefalosporinas combinadas con ácido clavulánico con un diámetro mayor o igual a 5 mm tomando como comparación a las cefalosporinas sin ácido clavulánico. (diagrama de trabajo 1)

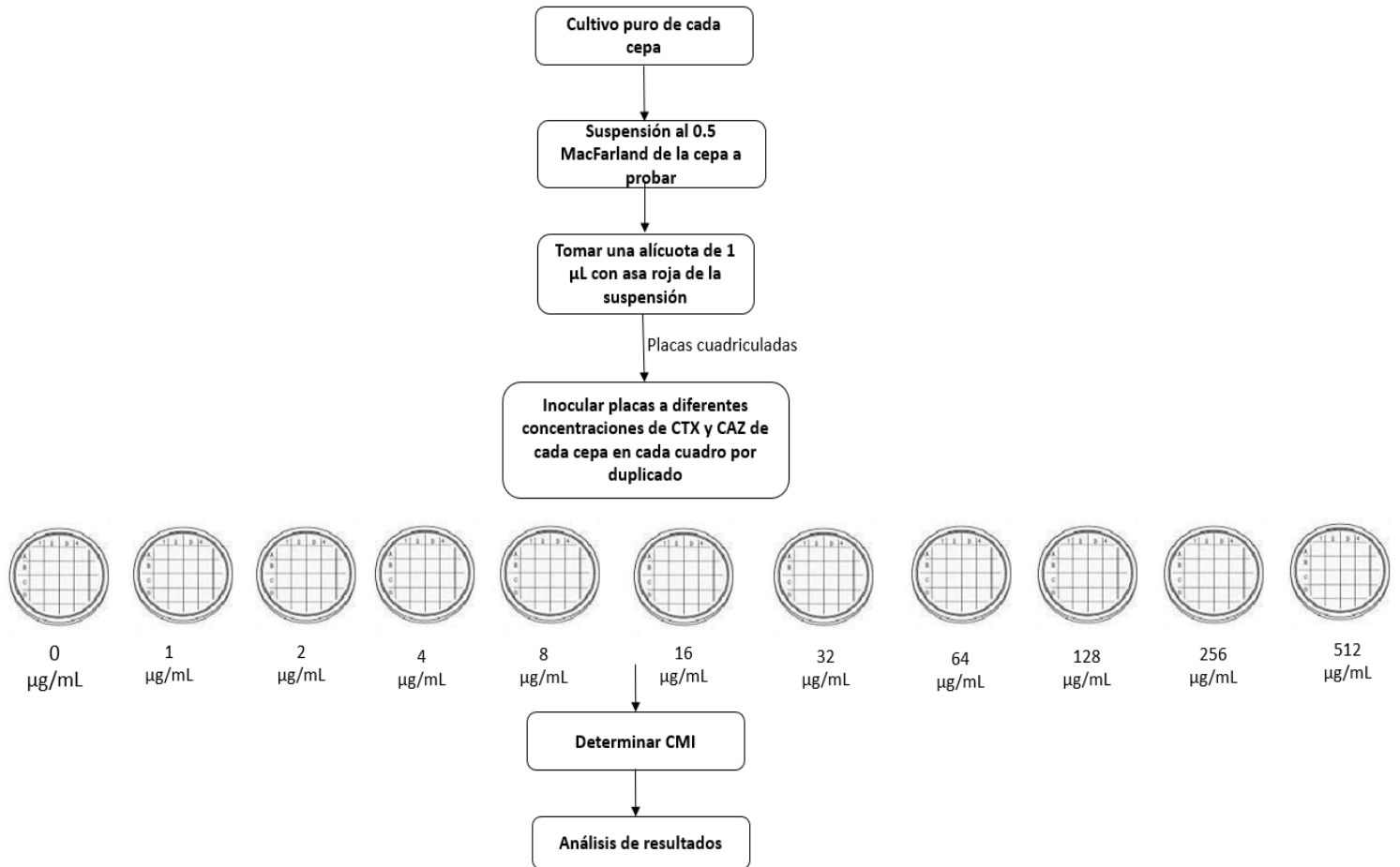
**Diagrama de trabajo 1:** Determinación del perfil de sensibilidad por el Método de Kirby-Bauer e identificación de BLEE por el método de disco combinado.



## 9.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de dilución en placa.

- a. Se prepararon placas a diferentes concentraciones de cefotaxima y ceftazidima (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512  $\mu\text{g/mL}$ ) en cada placa por separado, se incluyeron placas como controles carentes de antibiótico. Este proceso se realizó por duplicado.
- b. Se preparó suspensión al 0.5 MacFarland de la cepa a probar e incluir las cepas control ATCC como *E. coli* y *K. pneumoniae*.
- c. Con un asa de mango rojo calibrada de 1  $\mu\text{L}$ , se tomó una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  de la suspensión y se sembró cada cuadro de placa, incluyendo las placas control, por último, se pusieron en incubación por 24 horas a 37°C.
- d. Pasado el tiempo de incubación, se interpretó los resultados de las placas según los criterios del CLSI. (diagrama de trabajo 2).

**Diagrama de trabajo 2:** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de dilución en placa.



## 10. Resultados

### 10.1 Ratificación de género y especie de las cepas

Se analizaron 43 cepas bacterianas que pertenecían a una colección del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP provenientes de muestras de pacientes que presentaron sintomatología de infección en tracto urinario, recolectadas en el periodo de agosto-diciembre 2018. Los cultivos bacterianos se realizaron en medios de cultivo, como soya tripticasa y Mac Conkey. En la tabla 4 se muestran las pruebas que se llevaron a cabo para la ratificación de género y especie mediante métodos microbiológicos convencionales y con ayuda de pruebas bioquímicas como TSI, LIA, MIO, Citrato y Urea (figura 3).



A) *E. coli*



B) *K. pneumoniae*



C) Medio MacConkey

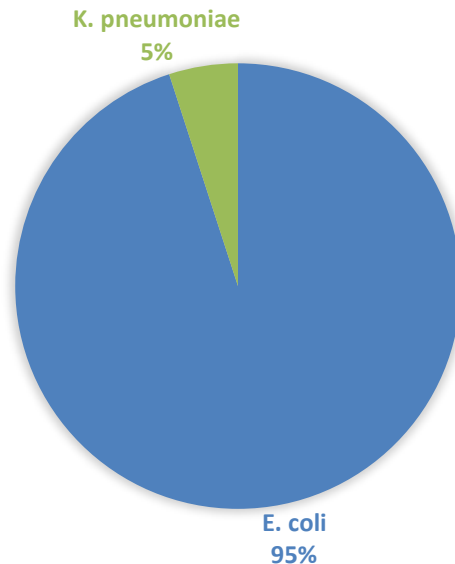
Figura 3. Pruebas bioquímicas para identificación de A) *E. coli* y B) *K. pneumoniae*; y C) Medio MacConkey con viraje color rosa característico de una cepa lactosa positiva.

Fuente: Resultados de laboratorio.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas para identificación de Enterobacterias					
Bacteria	TSI	LIA	MIO	Citrato	Urea
<i>Escherichia coli</i>	glucosa: + lactosa: + gas: + H <sub>2</sub> S: -	Descarboxilación de la lisina: +	movilidad: + indol: + ornitina: +	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	glucosa: + lactosa: + gas: + H <sub>2</sub> S: -	Descarboxilación de la lisina: +	movilidad: - indol: - ornitina: -	+	+

Fuente: Resultados de laboratorio.

De las 43 cepas analizadas, el 95% (41/43) fueron *Escherichia coli* y el 5% (2/43) *Klebsiella pneumoniae* (gráfica 1). Las especies identificadas coincidieron con las cepas control usadas en este trabajo, es decir, mostraron las mismas características para su ratificación de género y especie.



Gráfica 1. Porcentaje de género y especie de las 43 cepas trabajadas.  
Fuente: Resultados de laboratorio.

## 10.2 Prueba de sensibilidad a antimicrobianos

Una vez ratificado el género y especie de las 43 cepas de este estudio, se les realizó el perfil de sensibilidad mediante la técnica de Kirby-Bauer (figura 4).

Se determinó que las 43 cepas presentaron resistencia a CTX y CAZ, lo cual concordó con la cepa control ATCC *K. pneumoniae*, que es una cepa resistente a los antimicrobianos probados, los resultados fueron basados en los criterios de sensibilidad establecidos por el CLSI (tabla 5).

<b>Tabla 5. Antimicrobianos probados en los antibiogramas para Enterobacterias según los criterios del CLSI.</b>				
Agente antimicrobiano	Concentración (µg)	Halos de inhibición (mm)		
		S	I	R
Cefotaxima (CTX)	30	≥ 26	23-25	≤ 22
Ceftazidima (CAZ)	30	≥ 21	18-20	≤ 17

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.



Figura 4. Placa Mueller Hinton que muestra el patrón de resistencia a CTX y CAZ de una cepa responsable de ITU. Método de Kirby-Bauer (antibiograma). Fuente: Resultados de laboratorio.

### 10.3 Confirmación de cepas productoras de BLEE

A las 43 cepas que presentaron resistencia para CTX y CAZ, se les realizó la determinación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante el método del disco combinado.

En el estudio las 43 cepas presentaron producción de BLEE y correspondieron con los resultados basados en los controles usados. Según los criterios del CLSI, las cepas probadas presentaron un halo de inhibición  $\geq$  a 5mm CTX-CLA y CAZ-CLA respecto a CTX y CAZ (figura 5). Los diámetros de las cepas probadas con los antimicrobianos combinados se aprecian en la tabla 1 de anexos.

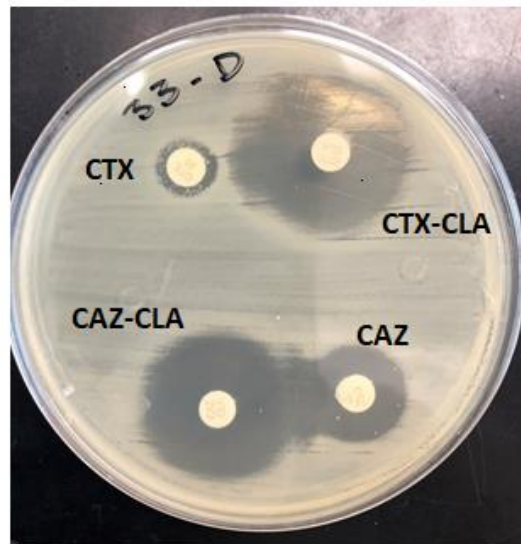


Figura 5. Medio Mueller Hinton con una cepa productora de BLEE; se aprecia diferencia de diámetro de halos de inhibición entre los antimicrobianos CTX con respecto a CTX-CLA y CAZ con respecto a CAZ-CLA.  
Fuente: Resultados de laboratorio.

#### 10.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de dilución en placa de cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ).

A las 43 cepas que presentaron producción de BLEE se les determinó por duplicado la CMI por la técnica de dilución en placa a diferentes concentraciones de CTX y CAZ, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 6.

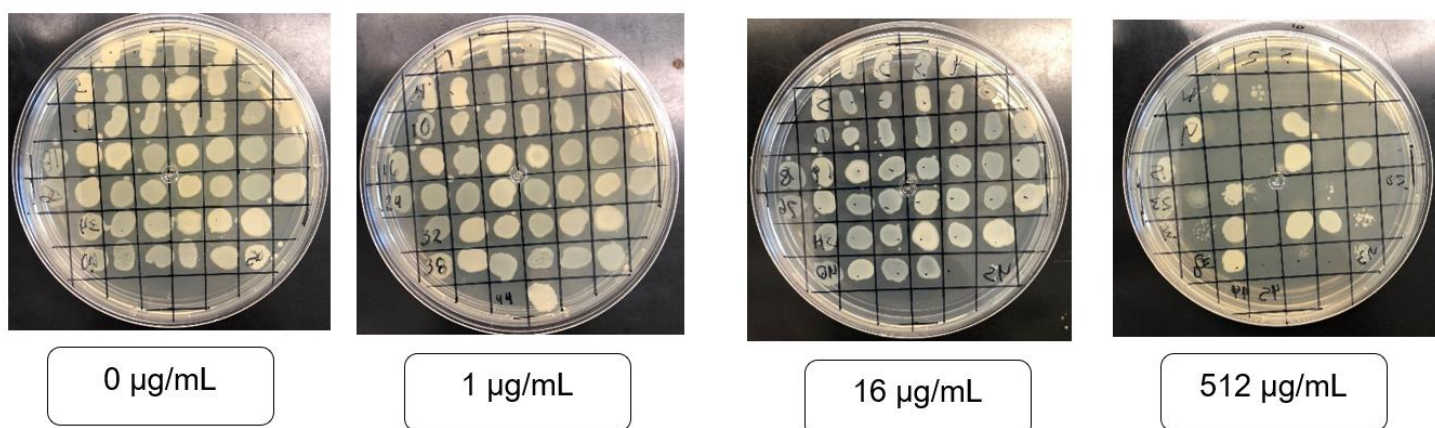


Figura 6. Crecimiento de cepas de estudio en placas de Mueller Hinton con diferentes concentraciones de CTX.

Fuente: Resultados de laboratorio.

De acuerdo con los datos mostrados en la tabla 6, las 43 cepas bacterianas probadas con el antimicrobiano CTX a diferentes concentraciones, el 100% de las cepas mostraron resistencia, con una CMI  $> 30 \mu\text{g/mL}$  para el antimicrobiano CTX, en donde 41 de éstas fueron cepas de *E. coli* y 2 fueron de *K. pneumoniae*. Además, cabe mencionar que se obtuvieron 26 cepas (marcadas en rojo) que presentaron una resistencia elevada, llegando a un valor de CMI de  $1024 \mu\text{g/mL}$ . En estos resultados fueron utilizados las cepas control.

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de CTX en cepas responsables de ITU y bacteria identificada.			
Cepa	CMI (µg/mL)	R / S	Bacteria Identificada
21	512	R	<i>E. coli</i>
26	256	R	<i>E. coli</i>
33-s	1024	R	<i>E. coli</i>
34	256	R	<i>E. coli</i>
18	1024	R	<i>K. pneumoniae</i>
13	512	R	<i>E. coli</i>
53	1024	R	<i>E. coli</i>
46	1024	R	<i>E. coli</i>
51	1024	R	<i>E. coli</i>
45	512	R	<i>E. coli</i>
40	512	R	<i>E. coli</i>
39	1024	R	<i>E. coli</i>
75	1024	R	<i>E. coli</i>
12	512	R	<i>E. coli</i>
70	1024	R	<i>E. coli</i>
69	1024	R	<i>E. coli</i>
65	256	R	<i>E. coli</i>
57	1024	R	<i>E. coli</i>
92	1024	R	<i>E. coli</i>
33-D	512	R	<i>E. coli</i>
95	1024	R	<i>E. coli</i>
91	1024	R	<i>E. coli</i>
94	1024	R	<i>E. coli</i>
102	1024	R	<i>E. coli</i>
99	1024	R	<i>E. coli</i>
109	1024	R	<i>E. coli</i>
110	512	R	<i>E. coli</i>
100	1024	R	<i>E. coli</i>
97	1024	R	<i>E. coli</i>
93	256	R	<i>K. pneumoniae</i>
101	1024	R	<i>E. coli</i>
104	512	R	<i>E. coli</i>
107	1024	R	<i>E. coli</i>
105	512	R	<i>E. coli</i>
79	1024	R	<i>E. coli</i>
09	512	R	<i>E. coli</i>
56	1024	R	<i>E. coli</i>
38	512	R	<i>E. coli</i>
108	1024	R	<i>E. coli</i>
96	256	R	<i>E. coli</i>
246	1024	R	<i>E. coli</i>
204	1024	R	<i>E. coli</i>
84	512	R	<i>E. coli</i>

R: Resistente. S: Sensible. CTX: Cefotaxima

Para el antimicrobiano de ceftazidima (CAZ) se realizó el mismo procedimiento, es decir, se inocularon las 43 cepas en agar Mueller Hinton a diferentes concentraciones del antimicrobiano para determinar la CMI, obteniendo resultados como se muestran en la figura 7.

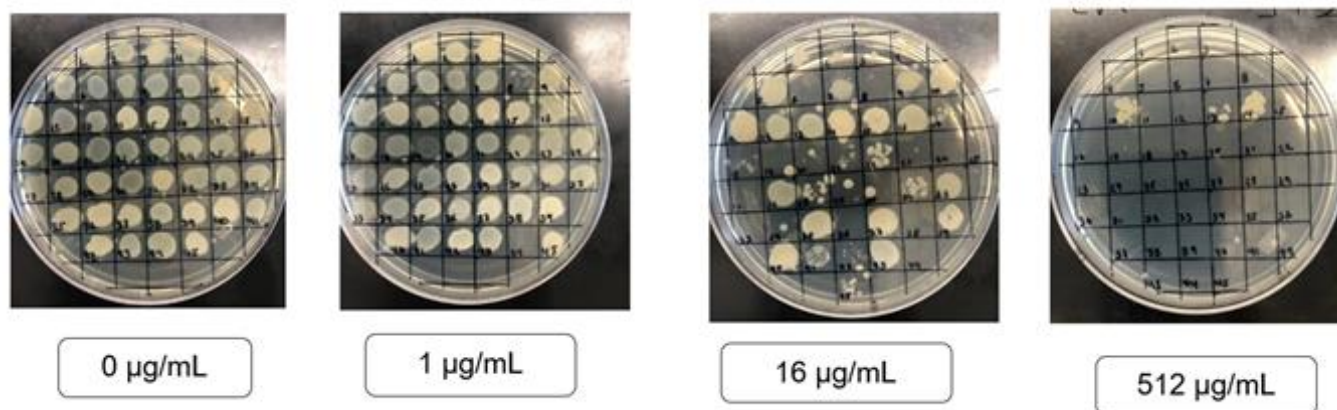
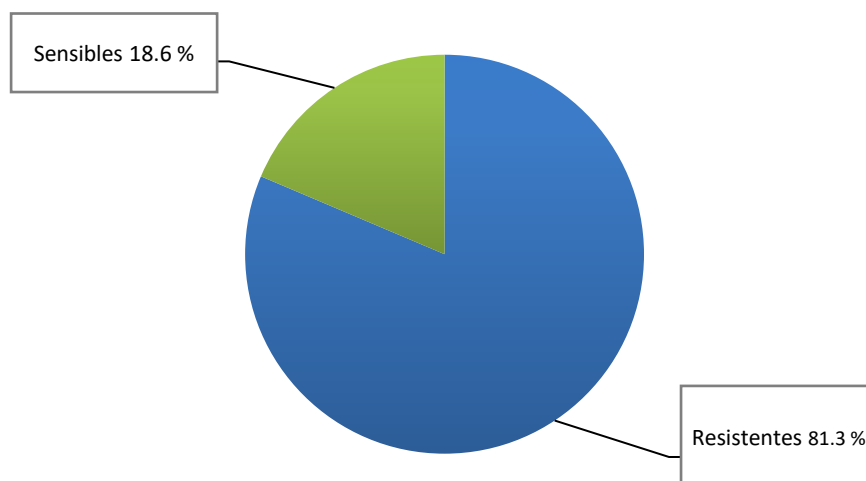


Figura 7. Muestra el crecimiento de las 43 cepas en placas de Mueller Hinton a diferentes concentraciones de CAZ.  
Fuente: Resultados de laboratorio.

En la tabla 7, se muestra que las 43 cepas bacterianas probadas con el antimicrobiano a diferentes concentraciones de CAZ, el 81.3% (35/43 cepas) presentaron resistencia, es decir,  $CMI \geq 30 \mu\text{g/mL}$ , dentro de estas cepas resistentes 34 fueron *E. coli* y 1 fue *K. pneumoniae*. Además, hubo 4 cepas (marcadas en rojo) que mostraron resistencia elevada, es decir, llegando a un valor de CMI de  $1024 \mu\text{g/mL}$ . En cambio, el 18.6% (8 cepas) mostraron sensibilidad,  $CMI \leq 30 \mu\text{g/mL}$ , de las cuales están indicadas en color azul. En la gráfica 3 se muestran los diferentes porcentajes que presentaron las 43 cepas frente a los  $\beta$ -lactámicos. En la tabla 8 indica la comparativa de ambos  $\beta$ -lactámicos (CTX y CAZ) con sus diferentes CMI frente a las 43 cepas. Como en el estudio anterior, se incluyeron las cepas control.

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria promedio (CMI) de CAZ en cepas responsables de ITU y bacteria identificada.			
Cepa	CMI (µg/mL)	R / S	Bacteria Identificada
21	64	R	<i>E. coli</i>
26	8	S	<i>E. coli</i>
33-s	64	R	<i>E. coli</i>
34	64	R	<i>E. coli</i>
18	16	S	<i>K. pneumoniae</i>
13	256	R	<i>E. coli</i>
53	32	R	<i>E. coli</i>
46	1024	R	<i>E. coli</i>
51	256	R	<i>E. coli</i>
45	16	S	<i>E. coli</i>
40	32	R	<i>E. coli</i>
39	1024	R	<i>E. coli</i>
75	64	R	<i>E. coli</i>
12	16	S	<i>E. coli</i>
70	64	R	<i>E. coli</i>
69	128	R	<i>E. coli</i>
65	512	R	<i>E. coli</i>
57	128	R	<i>E. coli</i>
92	1024	R	<i>E. coli</i>
33-D	32	R	<i>E. coli</i>
95	32	R	<i>E. coli</i>
91	64	R	<i>E. coli</i>
94	32	R	<i>E. coli</i>
102	8	S	<i>E. coli</i>
99	64	R	<i>E. coli</i>
109	16	S	<i>E. coli</i>
110	64	R	<i>E. coli</i>
100	128	R	<i>E. coli</i>
97	128	R	<i>E. coli</i>
93	64	R	<i>K. pneumoniae</i>
101	64	R	<i>E. coli</i>
104	128	R	<i>E. coli</i>
107	64	R	<i>E. coli</i>
105	32	R	<i>E. coli</i>
79	1024	R	<i>E. coli</i>
09	128	R	<i>E. coli</i>
56	256	R	<i>E. coli</i>
38	16	S	<i>E. coli</i>
108	256	R	<i>E. coli</i>
96	16	S	<i>E. coli</i>
246	128	R	<i>E. coli</i>
204	64	R	<i>E. coli</i>
84	64	R	<i>E. coli</i>

R: Resistente. S: Sensible. CAZ: Ceftazidima

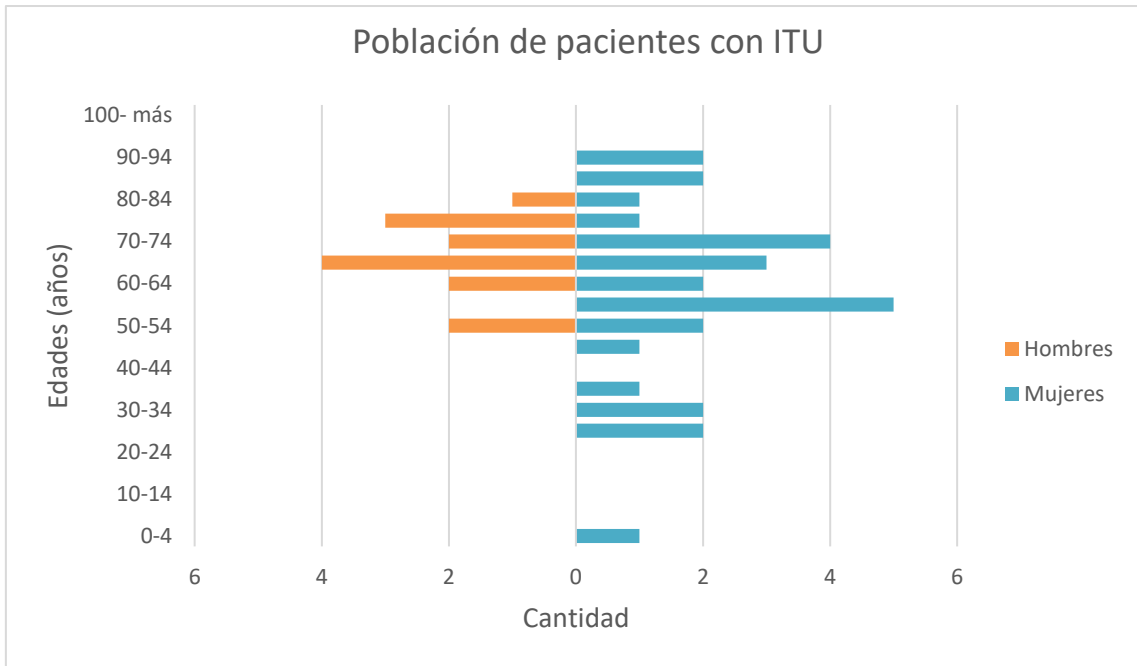


Gráfica 3. Muestra el porcentaje de cepas que presentaron resistencia para CAZ, CMI  $\geq 30$   $\mu\text{g/mL}$  (81.3%) y sensibles, CMI  $\leq 30$   $\mu\text{g/mL}$  (18.6%).  
Fuente: Resultados de laboratorio.

Con los datos recabados de las 43 cepas trabajadas con procedencia de pacientes con ITU como edad y sexo, en la gráfica 4 se aprecia que la población de mujeres presentó un porcentaje mayor de ITU, variando la edad, pero recayendo entre los 50 y 54 años. En cambio, para los hombres la edad en que se manifestaron con ITU fue entre los 60 y 64 años.

Tabla 8. Número de cepas (n=43) a diferentes CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )

Número de cepas	CMI CTX	Número de cepas	CMI CAZ
0	1	0	1
0	2	0	2
0	4	0	4
0	8	2	8
0	16	6	16
0	32	6	32
0	64	13	64
0	128	7	128
5	256	4	256
13	512	1	512
25	1024	4	1024



Gráfica 4. Muestra el número de población de hombres y mujeres a diferentes edades que presentaron ITU.

Fuente: Resultados de laboratorio

## 11. Discusión

### 11.1 Ratificación de género y especie de las cepas

En este estudio se determinó que el patógeno más aislado fue *Escherichia coli*, microorganismo que pertenece a la microbiota intestinal del organismo humano. Este patógeno tiene la capacidad de contaminar del recto a la uretra, llegando a diseminarse a vejiga e iniciar una infección al momento de excreción, afectando más este patógeno a las mujeres. El segundo patógeno que se identificó en un porcentaje menor fue *Klebsiella pneumoniae*; cabe mencionar que estos patógenos pertenecen a la familia enterobacteriaceae. Estos resultados coinciden con los presentados por Páramo-Rivas y col., quienes en el año 2015 realizaron en México un estudio con urocultivos de pacientes hospitalizados donde obtuvieron que el principal patógeno aislado fue *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella pneumoniae*. Varios estudios en el mundo, por mencionar uno como el de Orrego-Marin y col., en Colombia en el año 2014, han demostrado que *E. coli* es el microorganismo aislado con mayor frecuencia en una ITU.

### 11.2 Perfil de sensibilidad

Analizando los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad antimicrobiana realizado a las cepas de estudio mediante la técnica de Kirby-Bauer (antibiograma), las 43 cepas bacterianas presentaron 100 % de resistencia al  $\beta$ -lactámico CTX, éste es un antibiótico que presenta en su estructura al grupo amino-tiazolil, que se ha demostrado que aumenta su actividad microbiana sobre las PBPs (penicilin binding proteins) y el radical metoxi-imino situado en el carbono  $\alpha$  de la estructura de las cefalosporinas y dan mayor estabilidad frente a la hidrólisis de  $\beta$ -lactamasas. (Mella M., et al., 2001). Las cepas bacterianas han logrado evadir la actividad antimicrobiana de estas estructuras presentes en las cefalosporinas, dando un ejemplo de la resistencia presentada en las cepas de este estudio. Los estudios de sensibilidad antimicrobiana y BLEE son escasos en México, pero Páramo-Rivas y col., realizaron un estudio en la ciudad de México en 2015, obteniendo que el 88.9 % de las cepas de *E. coli* eran resistentes a cefotaxima lo cual se pudo demostrar también en este trabajo con el alto porcentaje de resistencia a CTX presentado por las cepas de estudio.

Por otro lado, el 81.3% de cepas presentaron resistencia a CAZ, cefalosporina de tercera generación que se ha reportado que ésta cefalosporina tiene una mejor actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Mella M., et al., 2001), considerara ésta bacteria con alta resistencia frente a los antibióticos, CAZ tiene la capacidad de mejor actividad frente a esta bacteria (antipseudomonas) y ha demostrado mejor respuesta clínica en ITU (Durán , 2018) lo que coincide con los resultados de este trabajo en donde también se observó ligeramente una resistencia menor para CAZ que para CTX. Alcantar-Curiel y col., realizaron un trabajo en el Hospital General Naval de Alta Especialidad, hospital de tercer nivel en México en 2015, en donde obtuvieron una resistencia del 72.8% en *E. coli* frente a CAZ similar a los resultados obtenidos en este estudio. Cabe mencionar que en este estudio también se obtuvo una resistencia a CTX del 100% en *E. coli*, lo que coincide con este trabajo.

### **11.3 Confirmación de cepas productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Las BLEE constituyen un factor muy importante en la resistencia bacteriana a nivel mundial en miembros de la familia Enterobacteriaceae. En el presente trabajo las 43 cepas probadas presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, CTX y CAZ, que fueron trabajadas tomando en cuenta los puntos de corte que señala el CLSI para la detección fenotípica de las enzimas. Se pudo confirmar que las 43 cepas resultaron fenotípicamente positivas a la producción de BLEEs, es decir, se apreció la diferencia en el halo de inhibición (>5mm) en los antimicrobianos combinados con el ácido clavulánico, actuando este sobre las enzimas BLEE, inactivando su actividad debido a la unión del sitio activo en la enzima y así pueden actuar los antimicrobianos, indicando la presencia de enzimas BLEE.

Retomando los estudios realizados en México por Páramo-Rivas y col., en 2015 reportaron el 38.3 % y Alcantar-Curiel y col., en el mismo año, el 31 % de cepas productoras de BLEE, siendo *E. coli* el principal microorganismo productor de  $\beta$ -lactamasas que coincide con los resultados aquí descritos.

Como se pudo observar en los resultados, el perfil de sensibilidad antimicrobiana muestra una resistencia mayor a CTX que a CAZ, sugiriendo con ello la posible

producción de BLEE con actividad mayoritaria de acción cefotaximasa y menor acción ceftazimasa.

#### **11.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La preocupación de la resistencia bacteriana ha aumentado en los últimos años, tal es el caso de este trabajo en donde se muestra que las 43 cepas probadas presentaron una resistencia del 100% para CTX y 81.3% para CAZ.

De acuerdo con los resultados de las CMI se puede ver que las 43 cepas presentaron una resistencia del 100% frente a la cefalosporina de tercera generación CTX, es decir, superando los 30 µg/mL según los criterios del CLSI, demostrando también que hubo cepas (25/43) capaces de hidrolizar a CTX por encima del valor de CMI de 512 µg/mL. En cambio, para la cefalosporina CAZ, sólo 35 cepas presentaron resistencia, por encima del valor de CMI de 30 µg/mL, donde también hubo cepas con elevada capacidad hidrolítica (4/43) que presentaron crecimiento hasta un valor de CMI de 512 µg/mL. Sugiriendo que la BLEE tipo CTX-M es responsable de la resistencia, ya que es un genotipo que más abunda en la familia enterobacteriaceae, este genotipo tiene como sustrato preferente a CTX y CAZ inactivando con ello la actividad antimicrobiana.

No existe suficiente información de la CMI frente a los β-lactámicos, pero en un estudio realizado por Grover y col., en 2006 en la India, demostró una alta resistencia a CTX con una CMI de 256 µg/mL y CAZ con una CMI de 256 µg/mL en cepas de *K. pneumoniae*. Para el año 2012, Martín-Pozo y col., en un hospital de España, demostraron que *E. coli* presentó frente a CTX una CMI > 8 µg/mL y para CAZ una CMI > 16 µg/mL, y *K. pneumoniae* presentó los mismos valores de CMI. En México hay pocos estudios, pero en 2015 Alcántar-Curiel y col., obtuvieron cepas de *E. coli* con una CMI > 138 µg/mL frente a CTX y una CMI > 126 µg/mL para CAZ. Para el 2017, Alyamani y col., en un hospital de Arabia Saudita obtuvieron cepas resistentes de *E. coli* con CMI de 512 µg/mL frente a CTX y CMI de 512 µg/mL frente a CAZ. También haciendo mención que Alyamani y col., obtuvieron cepas con elevada resistencia, llegando a los 1024 µg/mL y superando dicha concentración. Todos estos estudios coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo.

Una explicación de estos resultados es la elevada productividad y actividad enzimática BLEE que tienen las cepas ante la presencia de antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos y en combinación con inhibidores, por su elevada capacidad de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico e inactivar su actividad antimicrobiana. Se consideran a las enzimas BLEE tipo CTX y TEM como responsables de la capacidad hidrolítica, ya que son las enzimas con gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extrahospitalaria, aisladas en casi todas las enterobacterias, en particular en *E. coli* y *K. pneumoniae*. (Warjri, et al., 2015)

En este trabajo se demostró que las 43 cepas de estudio presentaron la misma expresión de BLEEs para ambas cefalosporinas, indicándonos que hay cepas capaces de inactivar a estos antimicrobianos; así como lo demostró Casabonne C. y col., en Argentina en 2012 quienes reportaron un alto porcentaje de  $\beta$ -lactamasas en coexistencia en las cepas estudiadas.

## 12. Conclusión

- Se evaluaron dos  $\beta$ -lactámicos en 43 cepas bacterianas, de las cuales el 100% (43/43) presentaron resistencia para cefotaxima (CTX) y el 81.3% (35/43) presentaron resistencia para ceftazidima (CAZ).
- Se demostró la presencia de BLEE en las 43 cepas bacterianas trabajadas. 41 de 43 cepas productoras de BLEE fueron *E. coli* y 2 de 43 fueron *K. pneumoniae*.
- Las 43 cepas bacterianas estudiadas mostraron resistencia a CTX, 5 de 43 cepas presentaron una CMI arriba de 128  $\mu\text{g/mL}$  para este  $\beta$ -lactámico, mientras que 25 de 43 cepas su CMI fue arriba de 512  $\mu\text{g/mL}$ .
- Para el  $\beta$ -lactámico CAZ, 35 de 43 cepas presentaron resistencia. 6 de estas 35 cepas presentaron una CMI arriba de 30  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que 4 de las 35 cepas resistentes mostraron una CMI arriba de 512  $\mu\text{g/mL}$ .

La administración indiscriminada de antimicrobianos, la falta de información de un antibiótico o la combinación con otros medicamentos ha llevado a la generación de cepas bacterianas resistentes, en este caso responsables de ITU, mostrando una alta resistencia a  $\beta$ -lactámicos usados en el tratamiento empírico, manifestándose por los altos valores de CMI obtenidos en este trabajo.

*E. coli* continúa siendo el uropatógeno más frecuente como responsable de una ITU, seguido de *K. pneumoniae*; mostrando que son los microorganismos que van adaptándose a los antimicrobianos utilizados, mediante la adquisición de un mecanismo de resistencia, como la producción de BLEE.

### **13. Perspectivas**

- Mediante el uso de métodos moleculares conocer los mecanismos de transferencia genética en estas cepas que hacen de ellas bacterias multirresistentes, ya que en este estudio mostraron una elevada actividad frente a los antimicrobianos.
- Identificar los diferentes tipos y variedades de BLEEs presentes en las cepas de estudio.
- Se debe insistir en tomar medidas para lograr una reducción de estos uropatógenos tanto en la comunidad como en hospital, así como complementarse con mejoras en el manejo higiénico y terapéutico de los pacientes que padezcan infecciones bacterianas.

## 14. Bibliografía

1. Aguinaga, A., Gil-Setas A., Mazón Ramos A., Alvaro A., García-Irure J.J., Navascués A., Ezpeleta Baquedano C. (2018). Infecciones del tracto urinario. Estudio de sensibilidad en Navarra. *An. Sist. Sanit. Navar*, pp. 17-26.
2. Alcántar-Curiel M.D, Alpuche-Aranda C.M., Varona-Bobadilla H.J., Gayosso-Vázquez C., Jarillo-Quijada M.D., Frías-Mendivil M., Sanjuan-Padrón L., Santos-Preciado J.I. (2015). Factores de riesgo en infecciones de vías urinarias causadas por *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en un hospital de tercer nivel. *Salud Pública México*, 57(5), pp. 412-418.
3. Alyamani E.J., Khiyami A.M. Booq R.Y., Majrashi M.A., Bahwerth F.S., Rechkina E. (2017). The occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, pp. 1-13.
4. Ambler , R., (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Volumen 289, pp. 321-331.
5. Ardila M., Rojas M., Santisteban G., Gamero A., Torres A. (2015). Infección Urinaria en Pediatría. *Repert. Med. Cir.*, pp. 113-122.
6. Brooks G.F, Carrol K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A. (2011). *Microbiología Médica*. México: McGraw Hill Interamericana Editores S.A de C.V.
7. Bush, K. & Jacoby , G. (2009). Updated Funtional Classification of Betalactamases.. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, pp. 969-976.
8. Calderón-Jaimes E., Casanova-Román G., Galindo-Fraga A., Guitiérrez-Escoto P., Landa-Juárez S., Moreno-Espinosa S., Rodríguez-Covarrubias F., Simón-Pereira L., Valdez-Vázquez R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: Un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Bol Med Hosp Infant Mex*, pp. 3-10.
9. Calderón Rojas , G. & Aguilar Ulate, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más reistentes y Antibióticos con menor actividad. *Revista médica de Costa Rica y Centroamerica LXXIII*, pp. 757-763.

10. Casabonne, C., Pérez, J., Balagué, C. & Fernández, L. (2012). Diversidad de  $\beta$ -lactamasas en aislamientos clínicos de enterobacterias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(3), pp. 405-412.
11. Castro O.R., Barreto M. A.C, Guzmán A.H., Ortega Q.A.J, Benítez P.L. (2010). Patrones de resistencia antimicrobiana en uropatógenos gramnegativos aislados de pacientes ambulatorios y hospitalizados Cartagena, 2005-2008. *Revista de Salud Pública Journal of Public Health*.
12. Chavolla-Canal, A., Gonzales-Mercado, M. & Ruiz-Larios, Ó. (2016). Prevalencia de bacterias aisladas con resistencia antibiótica extendida en los cultivos de orina durante 8 años en un hospital de segundo nivel en México. *Revista Mexicana de UROLOGIA*, 76(4), pp. 213-217.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 25th. CLSI document M100-S25. *Clinical and Laboratory Standards Institute USA*, Volumen 1, p. 35.
14. De la Fuente-Salcido, N. M., Villareal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á. & García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *REVISTA MEXINACA DE CIENCIAS FARMAÉUTICAS*, 46(2), pp. 7-16.
15. Delgado, M., Sojo, J., Pascual, Á. & Rodríguez, J. (2013). Clinical Management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, pp. 49-69.
16. Duran Luisa M.D. (2018). Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(2), pp. 213-221.
17. Escalante M., J. C., Síme D., A. & Díaz V., C. (2013). Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Epidemiología*, pp. 01-06.
18. Etebu, E. & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classifications and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, pp. 90-101.
19. Forbes, B. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires: Medica Panamericana.

20. García Hernández A. Gacía Vázquez E., Hernández Torres A., Ruiz J., Yague G., Antonio Herrero J., Gómez J. y (2011). Bacteremias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev. Esp. Quimioter*, pp. 57-66.
21. García Tello, A. (2014). Betalactamasas de espectro extendido en las infecciones del tracto urinario causadas por enterobacterias: aproximación a su conocimiento y pautas de actuación. *Actas Urológicas Españolas* , pp. 678-684.
22. Garza-Montúfar , M. E., Treviño-Valdez, P. D. & Garza-Salinas , L. H. (2018). Resistencia bacteriana y cormobilidades presentes en pacientes urológicos ambulatorios con urocultivos positivos. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* , 56(4), pp. 347-353.
23. Gómez, J., García V., E. & Hernández T., A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Esp. Quimioter*, pp. 1-9.
24. Grover S.S. Sharma M., Chattopadhy D., Kapoor H., Pasha S.T., Singh G. (2006). Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of high resistance againsts cepefime, the fourth generation cephalosporin. *Journal of Infection. ELSEVIER* , 53(4), pp. 279-288.
25. Lee S., H. & Le, J. (2018). Urinary Tract Infections. *Infectious Diseases*.
26. Lorenzo P., Moreno A., Lizasoian I., Leza J.C., Moro M.A., Portolés A. (2008). *Farmacología Velazquez. Básica y Clínica*. Buenos Aires: Editorial Panamericana .
27. Lozano, A. J. (2001). Infecciones urinarias: Clínica, diagnóstico y tratamiento.. *ELSEVIER*, pp. 99-109.
28. Luna-Pineda V.M., Ochoa S., Cruz-Córdoba A., Cázares-Domínguez V., Vélez-González F., Hernández-Castro R., Xicohtencatl-Cortes J. (2018). Infecciones del tracto urinario y vacunación. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, Issue 75, pp. 67-78.
29. Madigan T. , M. (2009). *Biología de los microorganismos*. s.l.:Pearson .
30. Martín-Pozo , A., Oteo, J., Sáez, D. & Alós, J. (2012). Infección urinaria por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes: descripción de un caso. *Revista Española Quimioter* , 25(4), pp. 295-296.

31. Mehta, D. & Kumar S. , A. (2016). Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology* , pp. 0976-3856.
32. Mella M.S., Zemelman M.C., Bello T.H. Dominguez Y.M., Gonzalez R.G., Zemelman Z.R. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Revista Chilena Infectología*, 18(1), pp. 7-19.
33. Molano G., Bayona M., Hinestroza L., Jiménez J., Luna W., Moncada M., Pineda W., Plazaz L., Ríos C., Runza H. (2012). Infección Por Bacterias De Vías Urinarias En Mujeres Tratadas Con Catéter Uretral Y Resistencia Bacteriana A Antimicrobianos.. *Revista U.D.C.A Act and Div Cient.* , 15(1), pp. 27-34.
34. Morejón García , M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4).
35. Orrego-Marin, C. P., Henao-Mejia, C. P. & Cardona-Arias , J. A. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Médica Colombiana* , 39(4), pp. 352-358.
36. Páramo Rivas , F., Tovar Serrano, A. & Rendón Macías , M. E. (2015). Resistencia antimicrobiana en pacientes con infección de vías urinarias hospitalizados en el servicio de Medicina Interna del Nuevo Sanatorio de Durango, de enero a diciembre de 2013. *Med Int Méx*, pp. 34-40.
37. Pemberthy-López C., Gutiérrez-Restrepo J., Arango-Salazar N., Mosalve M., Giraldo-Alzate N., Gutiérrez-Henado F., Amariles P. (2011). Aspectos clínicos y farmacoterapéuticos de la infección del tracto urinario. *Rev CES Med.*, 25(2), pp. 135-152.
38. Pereira A., Fariña N., De vega M., Gónzales P., Rodríguez F., Figueredo L. (2016). Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados en un Laboratorio privado de Asunción. *Paraguay Mem Inst. Investig. Cienc. Salud*, pp. 17-24.
39. Pérez-Cano, H. J. & Robles-Contreras, A.. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4(3), pp. 186-191.
40. Ponce de León R., S., Arredondo H., R. & López V., Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta Médica de México*, pp. 151:681-9.

41. Rané , A. & Ranan, D. (2013). *Urinary Tract Infection*. Londres : Springer-Verlag.
42. Seija , V. & Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos. *Bacteriología y Virología Médica* , pp. 631-647.
43. Seral García , C., Pardos de la Gándara, M. & Castillo García , F. J. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, pp. 12-18.
44. Sobel, J. & Kaye, D. (2014). *Urinary Tract Infections: Principles and Practice of Infectious Diseases*. Bennett: Philadelphia: Elsevier Saunders.
45. Suárez, C. & Gudiol, F. (2009). Antibióticos Betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. *ELSEVIER DOYMA*, 27(2), pp. 116-129.
46. Tafur, J. D., Torres, J. A. & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Centro Internacional de Investigaciones Médicas* .
47. Tandogdu, Z. & Wagenlehner , F. M. (2016). Global Epidemiology of urinary tract infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* , 29(1), pp. 73-79.
48. Warjri, I., Dutta, T., Lalzampaia , H. & Chandra , R. (2015). Detection and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases ( blaCTX-M-1 and blaSHV) producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Mizoram.. *Veterinary World*, 8(5), pp. 599-604.
49. Wei Tain, C. & Piotr Chlebicki, M. (2016). Urinary tract infections in adults. *Singapore Med J.*, pp. 485-490.

## 15. Anexo

Tabla 1. Dinámetros ( $\phi$ ) de halos de inhibición en mm de los antimicrobianos y confirmación de BLEE					
Cepa	$\phi$ CTX	$\phi$ CTX-CLA	$\phi$ CAZ	$\phi$ CAZ-CLA	BLEE
21	10	29	17	28	SI
26	13	30	20	28	SI
33-s	8	30	18	31	SI
34	8	28	16	28	SI
18	0	28	20	27	SI
13	0	27	12	26	SI
53	8	28	6	28	SI
46	0	0	0	9	SI
51	0	23	9	23	SI
45	0	30	20	30	SI
40	12	33	26	35	SI
39	0	19	0	22	SI
75	9	30	18	30	SI
12	12	31	22	31	SI
70	0	28	17	30	SI
69	0	28	15	28	SI
65	10	28	15	28	SI
57	0	25	13	25	SI
92	0	21	0	22	SI
33-D	0	27	17	25	SI
95	0	28	14	30	SI
91	0	25	15	25	SI
94	0	28	19	28	SI
102	0	30	22	32	SI
99	0	25	13	25	SI
109	0	29	18	30	SI
110	0	27	16	28	SI
100	0	25	13	25	SI
97	8	27	15	25	SI
93	10	28	15	25	SI
101	0	25	14	25	SI
104	0	25	12	25	SI
107	0	26	17	26	SI
105	0	27	18	26	SI
79	0	17	0	20	SI
09	0	25	8	28	SI
56	0	12	9	12	SI
38	0	30	20	30	SI
108	0	21	10	22	SI
96	0	28	18	28	SI

246	0	28	20	30	SI
204	0	25	14	24	SI
84	0	29	20	28	SI

CAZ: ceftazidima. CTX: cefotaxima. CLA: ácido clavulánico. ø: diámetro