



---

---

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE ENTEROBACTERIAS  
PRODUCTORAS DE  $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO EN FELINOS DOMÉSTICOS**

**TESIS PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**CANDY ARACELI RAMÍREZ CUEVAS**

**Director de Tesis**

**DR. CARLOS GERARDO CASTILLO SOSA**

**El Salado, Tecamachalco. Puebla, a  
Noviembre 2022**

## DEDICATORIA

A mi madre que se esforzó tanto por regalarme una carrera universitaria, por forjar mi carácter y darme los valores que hoy rigen mi vida como profesionalista.

A mi padre por demostrarme que el ingenio es de las cualidades más sobresalientes del hombre.

Y a ambos por enseñarme que la única forma de salir adelante es cultivarse y llenarse de conocimiento.

A mis hermanos porque de cada uno he aprendido lecciones invaluable, que han contribuido en todo lo que soy como individuo.

De igual manera a todos mis amigos felinos y caninos que me han acompañado a lo largo de estos años.

Cabe resaltar una dedicatoria especial a mi gatita Monín a quien le hice la promesa de ayudar a todos los animales que pudiera y la razón definitiva para decidirme a estudiar medicina Veterinaria.

Toda mi carrera se la dedico a ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis, a los doctores del Hospital Veterinario para pequeñas especies y fauna silvestre por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Microbiología y desarrollar esta investigación.

Especialmente quiero agradecer a mi profesor y mentor el doctor Carlos Gerardo Castillo Sosa por sus enseñanzas y el tiempo que ha dedicado a la dirección de este proyecto.

Finalmente, agradezco a todas las personas que formaron parte de mi vida durante mi estancia en la Universidad, aquellos compañeros que se convirtieron en parte de mi familia, a todos los médicos que participaron en mi formación académica y moral. Y a todos los miembros de mi familia por apoyarme siempre, y contribuir significativamente a consumir mi sueño de la infancia.

Gracias infinitas.

“El insensato no se nutre de cosas mundanas: la inquietud lo devora; conoce a medias su locura; pide a los cielos las más hermosas estrellas y a la Tierra los más sublimes regocijos, y, tanto lo que está cerca, como lo que está lejos, no basta a satisfacer su profundo y agitado corazón.”

*-Fausto, Goethe.*

## CONTENIDO

RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. JUSTIFICACIÓN .....	13
III. OBJETIVOS GENERALES.....	14
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
V. MARCO TEÓRICO .....	15
5.1 La Microbiota.....	22
5.1.1 La microbiota gastrointestinal de gatos .....	26
5.2 La familia de las Enterobacterias.....	27
5.2.1 <b>Escherichia coli</b> .....	31
5.2.2 <b>Klebsiella</b> .....	34
5.3 Clasificación y mecanismo de acción de antibióticos.....	36
5.3.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular.....	36
5.3.2 Inhibición de la síntesis de proteínas .....	39
5.4 Mecanismos de resistencia .....	45
5.4.1 Bombas de expulsión (eflujo).....	47
5.4.2 Modificación de la molécula blanco.....	48
5.4.3 Disminución de la permeabilidad.....	49
5.4.4 Inactivación por enzimas.....	50
5.5 $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) .....	52
5.5.1 Clasificación .....	53
5.5.2 Clasificación de las BLEE .....	57
5.5.3 Detección.....	60
5.5.4. Detección fenotípica.....	61
5.5.5. Detección genotípica.....	63
5.5.6 Otras BLEE .....	64
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
6.1 Aislamiento bacteriano .....	65
6.2 Sembrado de muestras .....	65
6.3 Identificación de especie.....	69
6.4 Prueba de sensibilidad antibiótica .....	71
6.5 Preparación de los inóculos e inoculación de medios.....	71

VII. RESULTADOS.....	73
7.1 Identificación de cepas.....	75
7.2 Prueba de sensibilidad a antimicrobianos.....	77
VIII. DISCUSIÓN .....	99
XI. CONCLUSIONES .....	105
X. BIBLIOGRAFÍA .....	106

## RESUMEN

Las bacterias productoras de BLEE en la familia *Enterobacteriaceae* han sido ampliamente estudiadas y encontradas tanto en humanos como en animales de compañía, cambiando la manera en la actualmente son tratadas las infecciones. No obstante, es el uso de antibióticos lo que ha impulsado a la evolución de los patógenos productores de resistencia a antimicrobianos, por ello el propósito de este estudio es la identificación de cepas de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en felinos domésticos en Puebla, México. Por medio de aislamientos de pacientes felinos sin ningún signo de enfermedad. Un total de 75 felinos fueron muestreados de los cuales se obtuvieron 51 enterobacterias que fueron sometidas a pruebas de sensibilidad antibiótica por difusión en disco, con la cual fueron detectadas 15 bacterias productoras de BLEE por medio de la prueba fenotípica; y se encontraron niveles altos de resistencia principalmente a Ceftriaxona con un 66% (33/50), 56% (28/50) a Cefotaxima, 54% (27/50) a Aztreonam, 52% (26/50) a Cefepime.

Los resultados son alarmantes, el grado de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos encontrados en las muestras procesadas en pacientes sanos llega a ser altamente preocupante debido a que esta familia de antibióticos se sigue utilizando como tratamiento de primera o segunda línea para infecciones comunes y ello implica un riesgo importante para los seres humanos, al tener una estrecha relación con los animales de compañía.

## I. INTRODUCCIÓN

En un entorno que contiene un vasto número de microorganismos expuestos repetidamente a antibióticos, la teoría darwiniana predice la inevitable selección de organismos resistentes (1).

La adaptación ecológica de los organismos no debe ser considerado como el producto final de la selección natural sino sólo como un recurso o un efecto secundario, como es en el caso de la resistencia bacteriana.

Después de la introducción de un nuevo antibiótico, inmediatamente en tan solo un año se informó de cepas resistentes, y después de un intervalo latente de algunos años, la resistencia ha aumentado drásticamente, a pesar de que la generación de nuevos productos no ha sido tan constante.

Un ejemplo de ello, es el *Staphylococcus aureus* ahora es casi universalmente resistente a la penicilina, un fenómeno observado por primera vez en brotes hospitalarios de una sepsis quirúrgica a fines de la década de 1940. Este organismo ha demostrado una notable facilidad para volverse resistente a cada antibiótico introducido, incluso a la vancomicina y ahora se ha detectado en *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), lo que hace que el organismo sea completamente resistente a los glucopéptidos. Es solo cuestión de tiempo antes de que se vean cepas que son sensibles a solo un pequeño número de antibióticos nuevos o en desarrollo y tal vez a algunos de los antibióticos más antiguos (por ejemplo, tetraciclina, cloranfenicol).

En contraste, algunos organismos aún no han adquirido resistencia a la Penicilina, a pesar de las enormes presiones; estos incluyen *Streptococcus pyogenes*, anaerobios gram positivos como *Clostridium spp.* y *Peptostreptococcus spp.* y *Neisseria meningitidis* (1).

La creciente ola de resistencia bacteriana impone una tremenda carga económica y social sobre el sistema de salud en todo el mundo y, lamentablemente, el desarrollo de nuevos antibióticos se ve muy superado por las terapias actuales que están perdiendo su eficacia. La resistencia es impulsada por el uso de antibióticos en la práctica humana y agrícola/veterinaria.

La selección de resistencia ocurre por mutaciones espontáneas que ocurren a una tasa de  $10^9$ - $10^6$  impulsada por la presencia de antimicrobianos. Los elementos de resistencia aparecen en las bacterias saprofitas como resultado del uso de antibióticos para promover el crecimiento y proteger los cultivos. Cuando los productos agrícolas son consumidos, la resistencia puede transferirse a bacterias humanas que ocasionalmente son patógenas (1).

La probabilidad de encontrar organismos resistentes en el tracto gastrointestinal está relacionada con el tonelaje de uso de antibióticos en el país en el que reside el individuo, en teoría todos los países deberían estar regidos por los mismos preceptos para el uso de antimicrobianos, de ello dependerá la facilidad con que pueda surgir un mecanismo de resistencia.

La resistencia nueva generalmente se detecta en diferentes lugares del mundo aproximadamente al mismo tiempo, lo que puede sugerir que las presiones antibióticas son similares en todo el mundo y que las bacterias tienen medios limitados para lidiar con el problema de la supervivencia.

Tras la aparición de una progenie resistente a mutantes, las bacterias que se replican rápidamente pueden recolonizar los sitios portadores en menos de 24 h. Una vez que se ha seleccionado la resistencia, los organismos transferidos de persona a persona continúan siendo resistentes. Cuando se elimina la presión antibiótica, la nueva flora colonizadora e infecciosa tiende a volver al fenotipo sensible. Algunas bacterias que contienen plásmidos de gran resistencia se consideran no aptas y desaparecen del entorno clínico con mayor facilidad que otras (1).

Las causas de la resistencia a los antibióticos son complejas e incluyen el comportamiento humano en muchos niveles de la sociedad; las consecuencias afectan a todos en el mundo. Las similitudes con el cambio climático son evidentes. Se han hecho muchos esfuerzos para describir las diferentes facetas de la resistencia a los antibióticos y las intervenciones necesarias para enfrentar el desafío.

Sin embargo, la acción coordinada está en gran parte ausente, especialmente a nivel político, tanto a nivel nacional como internacional. Los antibióticos allanaron el camino para desarrollos médicos y sociales sin precedentes, y hoy son indispensables en todos los sistemas de salud. Los logros en la medicina moderna, como la cirugía mayor, el trasplante de órganos, el tratamiento de bebés prematuros y la quimioterapia contra el cáncer, no serían posibles sin el acceso a un tratamiento eficaz para las infecciones bacterianas de carácter oportunista.

En unos pocos años, podríamos enfrentarnos a graves retrocesos, médica, social y económicamente, a menos que se tomen acciones coordinadas globales reales de inmediato (2).

La disminución de la efectividad de los antibióticos en el tratamiento de infecciones comunes se ha acelerado en los últimos años, y con la llegada de cepas no tratables de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, estamos en los albores de una era pos antibiótica (2).

En los países de altos ingresos, las altas tasas continuas de uso de antibióticos en los hospitales, la comunidad y la agricultura han contribuido a la presión de selección que ha mantenido a las cepas resistentes, forzando un cambio a antibióticos de mayor amplio espectro y con precios más elevados debido a los costos de producción.

La resistencia surge como consecuencia de mutaciones en los microorganismos y la presión de selección del uso de antibióticos, lo cual proporciona una ventaja competitiva para las cepas mutadas y sobrevivencia en el medio.

Se ha concluido que la utilización de dosis de antibiótico por debajo del nivel terapéutico óptimo ayuda a la selección gradual de la resistencia. Los genes de resistencia se transmiten en los elementos cromosómicos, y cada vez más, en elementos extra cromosómicos transmisibles. Los clones resistentes resultantes, se diseminan rápidamente en todo el mundo (2).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque son miembros naturales del tracto gastrointestinal de los mamíferos, pueden ser causa de enfermedades del tracto urinario, piel, oído, tejidos blandos, y aparato respiratorio en gatos y perros. Para infecciones no complicadas, la opción terapéutica de primera línea son ampicilina, amoxicilina y ácido clavulánico o cefalosporinas de primera y segunda generación, mientras que la amikacina, fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación pueden ser apropiadas para infecciones más severas (3).

No obstante, como ya se ha mencionado con anterioridad; es el uso de antibióticos lo que ha impulsado a la evolución de los patógenos portadores de resistencia a antimicrobianos. La resistencia bacteriana esta mediada por diversos mecanismos, por ejemplo, la producción de enzimas que hidrolizan e inactivan a los antibióticos, tal como las  $\beta$ -lactamasas (4).

Las  $\beta$ -lactamasas, son enzimas que inactivan antibióticos  $\beta$ -lactámicos, revelándose como una de las mayores causas de resistencia. El número de  $\beta$ -lactamasas ahora excede a las 1300, haciendo de este grupo de enzimas una de las familias más estudiadas a detalle.

El impacto clínico de estas enzimas es particularmente crítico, debido a la dependencia de las cefalosporinas y carbapenémicos para el tratamiento de enfermedades graves e infecciones especialmente en entornos sanitarios.

Sin embargo, estas bacterias han evolucionado hasta el punto donde múltiples genes que codifican  $\beta$ -lactamasas se producen en un solo organismo, junto con determinantes de resistencia para muchas otras clases de antimicrobianos, en el caso de las enterobacterias a este fenómeno se le conoce como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

(BLEE), como el grupo de enzimas TEM-, SHV-, (CTX)-M, las cuales son capaces de hidrolizar el aztreonam y cefalosporinas de tercera generación (5).

La aparición de enterobacterias que producen BLEE en animales de compañía tanto sanos como enfermos constituye un desafío cada vez mayor para el tratamiento de infecciones en la terapia veterinaria. Además, la resistencia causada por las BLEE se asocia a menudo con la resistencia a otras clases de antibióticos como los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y el sulfametoxazol/trimetoprima que son antimicrobianos de importancia crítica en la medicina humana.

En consecuencia, existe una creciente preocupación sobre las bacterias productoras de BLEE en animales de compañía ya que representan un peligro potencial para la salud de los seres humanos, ya sea a través de la transmisión directa de patógenos resistentes, o indirectamente por medio de la transmisión de genes de resistencia (3).

Esta propagación se ve facilitada por la transmisión de genes entre especies, la falta de saneamiento y la higiene en las comunidades y los hospitales, y la frecuencia cada vez mayor de transmisión global, de viajes, comercio y enfermedades (2).

La selección de antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas sigue siendo empírica, pero generalmente se basa en los síntomas físicos presentados por los pacientes y para los cuales se aprueba un antibiótico determinado. Dicha terapia se inicia antes de que estén disponibles los resultados de una prueba diagnóstica realizada para determinar qué cepas bacterianas son responsables de la infección. Muchos de los antibióticos Gram-negativos orales también inhiben los patógenos anaeróbicos en el intestino que alteran la flora intestinal y provocan enfermedades debido al desequilibrio de las especies microbianas intestinales, fenómeno conocido como disbiosis.

La resistencia bacteriana a los antibióticos parece ser inevitable. Los mecanismos de resistencia pueden incluir la modificación del objetivo para alterar la unión al fármaco, la producción de mecanismos alternativos para realizar la función del objetivo, la inactivación del fármaco, la reducción de la entrada del fármaco y la expresión de las bombas de salida para eliminar los fármacos del interior de las células bacterianas (6).

En ciertos casos, las bacterias no solo son resistentes a una clase de antibióticos, sino a varias clases simultáneamente, lo que limita significativamente las opciones de tratamiento.

Por ejemplo, el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) no solo es resistente a las penicilinas sino también a las cefalosporinas y carbapenémicos.

Lo que es más alarmante actualmente es la tasa de resistencia a muchos medicamentos que se producen en muchos patógenos gramnegativos críticos.

Esto ha llevado a la selección de una lista de seis patógenos prioritarios (dos Gram-positivos y cuatro Gram-negativos) denominados ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*) por Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA). No existen agentes efectivos contra las cepas resistentes de muchas de estas bacterias Gram negativas, en particular, *A. baumannii*.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que más de 23,000 personas murieron en los Estados Unidos de América en 2013 debido a infecciones causadas por cepas resistentes de bacterias.

Un informe completo reciente sugiere que más de 700,000 personas mueren cada año por infecciones resistentes a los medicamentos en todo el mundo. Los países de bajos y medianos ingresos son los más afectados por la resistencia a los antibióticos, donde se estima que 214,000 muertes por sepsis neonatal por año son directamente atribuibles a las bacterias resistentes a los antibióticos.

Se necesitan nuevos antibióticos con nuevos modos de acción o una nueva clase química con nuevas interacciones diana y un modo de acción establecido. La pregunta es, ¿por qué estamos donde estamos después del descubrimiento de la penicilina y muchos otros antibióticos altamente efectivos entre 1940 y 1962. ¿Cuáles son los retos? Que hemos aprendido ¿Hay un camino potencial hacia adelante? (6).

## II. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias productoras de BLEE en la familia *Enterobacteriaceae* han sido ampliamente estudiadas y encontradas tanto en humanos como en animales de compañía, cambiando la manera en la actualmente son tratadas las infecciones. No obstante, es el uso de antibióticos lo que ha impulsado a la evolución de los patógenos productores de resistencia a antimicrobianos, debido a que esta familia de antibióticos se sigue utilizando como tratamiento de primera o segunda línea para infecciones comunes y ello implica un riesgo importante para los seres humanos, al tener una estrecha relación con los animales de compañía.

Se han realizado estudios en los cuales se han identificado enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en animales de compañía procedentes de diferentes países, la mayor parte de estos han sido realizados en caninos, y en menor cantidad felinos domésticos.

Sin embargo, dichas investigaciones se han fundamentado en poblaciones conjuntas de perros y gatos, de muestras provenientes de distintos sitios corporales. Este estudio pretende identificar enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido únicamente en felinos domésticos, ya que ningún estudio se ha enfocado solamente en esta especie.

Por lo cual se pretende identificar enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido únicamente en felinos domésticos sin ninguna complicación clínica, siendo así el primer estudio que se realiza en México de manera puntual y específica.

### **III. OBJETIVOS GENERALES**

Identificar cepas de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en felinos domésticos que no presentan ninguna complicación clínica.

### **IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislamiento e identificación de especies de enterobacterias en felinos domésticos.
2. Identificación a través de la prueba fenotípica de difusión en disco doble del fenotipo  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.
3. Evaluación de la susceptibilidad in vitro a antibióticos no betalactámicos a través de la prueba de difusión en disco.

## V. MARCO TEÓRICO

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se exponen a medicamentos antimicrobianos. Bajo la presión selectiva de los antibióticos, las bacterias susceptibles son eliminadas o inhibidas, mientras que las bacterias que son resistentes de forma natural (o intrínseca) o que han adquirido rasgos resistentes a los antibióticos tienen una mayor probabilidad de sobrevivir y multiplicarse. No solo el uso excesivo de antibióticos sino también el uso inadecuado (elecciones inapropiadas, dosificación inadecuada, mala adherencia a las pautas de tratamiento) contribuyen al aumento de la resistencia a los antibióticos (7).

La resistencia a los antibióticos ha sido descrita como una de las mayores amenazas mundiales del siglo XXI. Aunque se reconoció poco después de la introducción de antibióticos, el impacto fue mitigado inicialmente por el desarrollo y el uso de agentes más nuevos. Sin embargo, se han desarrollado muy pocas clases nuevas de antibióticos desde fines de la década de 1960, y el desarrollo se ha estancado en los últimos años. Para algunos organismos, particularmente bacterias Gram negativas y algunas *Enterobacteriaceae*, existen opciones terapéuticas extremadamente limitadas (8).

Los antibióticos han tenido un profundo impacto en el manejo de las enfermedades infecciosas, pero también se han convertido en un componente esencial en la atención médica moderna. Debido a que ningún avance en la práctica médica o quirúrgica seguiría siendo exitoso si las infecciones ocasionadas por agentes oportunistas no se pudieran tratar, por ejemplo, en el caso de la quimioterapia, trasplantes de órganos que tienen un efecto de inmunosupresión en el paciente, dicho estado puede contribuir a la adquisición de infecciones bacterianas.

Los microorganismos se transfieren fácilmente entre individuos y, por lo tanto, la resistencia que emerge en un paciente o en las interacciones entre el paciente y el medio ambiente, puede afectar pronto a otro organismo susceptible. Por lo tanto, abordar la resistencia a los antibióticos es de gran importancia para la salud pública y no debe subestimarse.

La resistencia a los antibióticos es realmente un problema en el enfoque “One Health” y necesita ser monitoreada y controlada no solo en la medicina humana, sino también en diversos aspectos de la agricultura y la acuicultura.

Si bien la resistencia a los antibióticos puede considerarse una consecuencia del inevitable uso de antibióticos, la utilización nociva de antibióticos también es un factor importante que facilita la aparición de resistencia en todo el mundo. En muchas áreas, la disponibilidad de antibióticos de venta libre o por Internet permite que quien no prescribe tenga acceso libre y sin restricciones a estos agentes. Una vez que ha surgido resistencia, la posterior difusión de cepas resistentes se ve facilitada por la presión de selección ejercida por el uso adicional de antibióticos, el incumplimiento de las medidas de control de infecciones y la falta de higiene (especialmente en términos de higiene de manos, condiciones sanitarias y preparación de alimentos), que puede ocurrir tanto dentro como fuera de los entornos sanitarios.

La resistencia a los antibióticos tiene costos significativos para la sociedad en términos de aumento de la mortalidad, la morbilidad, el uso de los recursos de atención médica y el tiempo libre (8).

El impacto de la resistencia a los antibióticos en términos de mortalidad y del costo de salud pública es bastante difícil de estimar, y hay pocos estudios que aborden este tema (7).

En un informe de la Unión Europea, Islandia y Noruega, las infecciones por microorganismos resistentes causaron 25000 muertes y costaron 1.500 millones de euros por año en costos hospitalarios y sociales (8).

El Centro de EE. UU. para el Control y prevención de Enfermedades (CDC) estimó de manera conservadora que, en los EE. UU., más de dos millones de personas cada año se ven afectadas por infecciones resistentes a los antibióticos (7).

Otro informe sugirió que casi 23,000 personas mueren cada año como resultado directo de infecciones debidas a microorganismos resistentes adquiridos en hospitales de EE. UU., con costos de atención médica asociados que superan los \$20 mil millones.

La resistencia a los antibióticos no solo se desarrolla en el entorno hospitalario. A medida que los sistemas de atención médica han evolucionado, se han desdibujado los límites entre las instalaciones de atención médica tradicionales y la comunidad, de modo que los hogares de ancianos y residenciales ahora son reservorios importantes para organismos resistentes, además de entornos ambulatorios como unidades de diálisis y oncología. Las redes de viaje modernas también han facilitado que las personas y los organismos resistentes que transportan se propaguen rápidamente a través y entre continentes (8).

En el caso específico de los antibióticos, la complejidad de los procesos que contribuyen a la aparición y diseminación de la resistencia no puede exagerarse, y la falta de conocimientos básicos sobre estos temas es una de las razones principales por las que ha habido pocos logros significativos en la efectividad prevención y control del desarrollo de resistencia.

Los antibióticos han revolucionado la medicina en muchos aspectos, y se han salvado innumerables vidas; su descubrimiento fue un punto de inflexión en la historia humana. Los expertos médicos ahora están advirtiendo de un regreso a la era pre antibiótica; una base de datos reciente enumera la existencia de más de 20,000 genes de resistencia potencial (genes R) de casi 400 tipos diferentes, pronosticados principalmente de las secuencias del genoma bacteriano disponibles. Afortunadamente, el número existente como determinantes de resistencia funcional en patógenos es mucho menor.

La penicilina fue descubierta en 1928, pero la estructura completa de esta molécula relativamente simple no fue revelada hasta 1949, por los estudios cristalográficos de rayos X de Dorothy Crowfoot Hodgkin, y fue confirmada por síntesis total en 1959, y actualmente todavía es utilizado para tratar infecciones.

Para comenzar, la definición de antibiótico, propuesta por primera vez por Selman Waksman, el descubridor de la estreptomina, ha sido seriamente sobre interpretada; el término genérico "antibiótico" se usa para denotar cualquier clase de molécula orgánica que inhibe o mata a los microbios mediante interacciones específicas con objetivos bacterianos sin tener en cuenta la fuente del compuesto o clase en particular (9).

La colosal necesidad del uso de antibióticos ha tenido un inconveniente ambiental significativo. En los 60 años desde su introducción, se han producido y empleado millones de toneladas de antibióticos para una amplia variedad de propósitos. Las mejoras en la producción han proporcionado compuestos cada vez menos costosos que fomentan usos sin receta y fuera de etiqueta. Todo esto ha contribuido significativamente a la selección de cepas resistentes.

El desarrollo de generaciones de microbios resistentes a los antibióticos y su distribución en poblaciones microbianas en toda la biosfera son el resultado de muchos años de presión de selección incesante de las aplicaciones humanas de antibióticos, por infrautilización, uso excesivo y mal uso. Este no es un proceso natural, sino una situación hecha por el hombre superpuesta a la naturaleza; quizás no haya un mejor ejemplo de las nociones darwinianas de selección y supervivencia.

Curiosamente, la identificación de una penicilinasa bacteriana antes de su descubrimiento, se atribuye a un gran número de genes de antibióticos r son componentes de poblaciones microbianas naturales.

A medida que se descubrieron e introdujeron otros antibióticos en la práctica clínica, se produjo un curso similar de eventos. La identificación inesperada de la resistencia a los antibióticos genéticamente transferibles en Japón a mediados de la década de 1950 cambió todo el panorama al introducir el concepto genético herético de que las colecciones de genes de antibióticos r podrían diseminarse por conjugación bacteriana en toda la población de patógenos bacterianos.

Solo en los últimos años se ha apreciado que el intercambio de genes es una propiedad universal de las bacterias que se ha producido a lo largo de eones de evolución microbiana. El descubrimiento de la presencia de secuencias genéticas bacterianas putativas en genomas eucariotas ha aumentado la conciencia de la gran importancia de la transferencia horizontal de genes en la evolución del genoma.

No es sorprendente que la transferencia de resistencia a antibióticos mediada por plásmidos haya sido un foco importante de investigación debido a su importancia médica y, más recientemente, práctica.

Los patógenos gramnegativos más prevalentes, como la *E. coli*, la *salmonella entérica* y la neumonía por *Klebsiella*, causan una variedad de enfermedades en humanos y animales, y se ha observado una fuerte correlación entre el uso de antibióticos en la amenaza de estas enfermedades y el desarrollo de resistencia a los antibióticos observado durante el último medio siglo. Esto es especialmente evidente con la clase de antibióticos B-lactámicos y sus enzimas inactivadoras relacionadas, las B-lactamasas. Esto incluye nuevas clases de genes y sus radiaciones mutantes.

Los genes *r* son omnipresentes en ambientes naturales. Esto plantea la cuestión de sus funciones naturales. Por mencionar algún ejemplo, la flora tiene numerosas fuentes, como productos de la degradación de polímeros naturales en conversiones de nutrientes, productos vegetales, compuestos antibióticos de insectos y hongos, y descomposición orgánica general. Las plantas producen muchos compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano en la rizosfera (9).

El medio ambiente es un entorno complicado para los microorganismos que habitan en él. Debido a la interacción humana el entorno contiene muchos productos provenientes de la industria y/o provocados por la contaminación humana. En concreto ciertos químicos como el arsénico, el mercurio y el yodo se utilizaban antes del descubrimiento de antibióticos, como medicamentos. La principal solución bacteriana para los desafíos tóxicos toma la forma de sistemas de bombeo multivalentes que evitan la acumulación intracelular de sustancias bactericidas y bacteriostáticas estructuralmente diversas. Algunos organismos fúngicos producen metabolitos secundarios que tienen un efecto significativo en el desarrollo de ciertos microorganismos, es por eso que dichos componentes tratan de ser replicados dentro de los laboratorios. Es entonces que algunos genes encontrados conocido como genes cuasi-*r* son asociados a grupos biosintéticos, debido a esto se especula que la resistencia a los antibióticos podría ser de carácter altamente pleiotrópico. Las interacciones pleiotrópicas también pueden derivarse de cambios en las vías metabólicas distribuidas que están conectadas en red en las células; una alteración en la concentración de una enzima o proteína podría conducir a ajustes en los procesos relacionados con las redes de la comunidad microbiana.

Las mutaciones en los genes de la proteína ribosómica que conducen a la resistencia a los antibióticos tienen una serie de efectos extra ribosómicos (traducción errónea, sensibilidad a la temperatura, propagación de fagos, etc.) que influyen en la función celular.

Diferentes presiones selectivas pueden conducir a mutaciones que coinciden con un nivel de resistencia a los antibióticos. Un fenotipo de resistencia a los antibióticos no necesariamente se produce de forma exclusiva en respuesta a la selección de antibióticos.

Hoy en día, se hace hincapié en las investigaciones de las interacciones dentro de comunidades bacterianas complejas (microbiomas) en diferentes entornos, ya que muchas enfermedades ocurren como resultado de infecciones polimicrobianas (9).

La aparición de patógenos de resistencia a múltiples fármacos es una crisis económica y sanitaria mundial cada vez más importante. Catalogada por la Organización Mundial de la Salud como una de las 3 principales amenazas para la salud pública mundial.

La resistencia a los antibióticos aumenta mientras que el número de antibióticos disminuye.

Los programas de vigilancia de antibióticos, como el programa SENTRY, han monitoreado las estadísticas mundiales de MRSA (MRSA en hospitales entre 1997 y 1999 fue 22.4% en Australia, 66.8% en Japón, 34.9% en América Latina, 40.4% en América del Sur, 32.4% en el EE. UU. Y 26.3% en Europa y observaron con horror la necesidad de elevadas concentraciones de antibióticos para matar efectivamente a muchos patógenos humanos comunes, lo que provocó la preocupación de volver a la era pre-antibiótica (10).

Ante esta realidad, la necesidad de actuar para evitar una crisis mundial en desarrollo en la atención de la salud es imprescindible. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce desde hace tiempo la necesidad de un esfuerzo global mejorado y coordinado para contener la resistencia antimicrobiana. En 2001, la Estrategia global de la OMS para la contención de la resistencia a los antimicrobianos ha proporcionado un marco de intervenciones para retrasar la aparición y reducir la propagación de microorganismos

resistentes a los antimicrobianos; en 2012, la OMS publicó “La evolución de la amenaza de la resistencia a los antimicrobianos: opciones para la acción” proponiendo una combinación de intervenciones que incluyen sistemas de salud y vigilancia fortalecidos; mejorar el uso de antimicrobianos en hospitales y en la comunidad; prevención y control de infecciones; alentando el desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas apropiados; y compromiso político. Siguiendo la indicación de un papel principal para la vigilancia, en abril de 2014, la OMS publicó el primer informe global sobre la vigilancia de AMR que recopila experiencias de redes de vigilancia nacionales e internacionales. La falta de vigilancia adecuada en muchas partes del mundo deja grandes lagunas en el conocimiento existente sobre la distribución y el alcance de este fenómeno.

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se exponen a medicamentos antibióticos. Bajo la presión selectiva de los antibióticos, las bacterias susceptibles son eliminadas o inhibidas, mientras que las bacterias que son resistentes de forma natural (o intrínseca) o que han adquirido rasgos resistentes a los antibióticos tienen una mayor probabilidad de sobrevivir y multiplicarse. No solo el uso excesivo de antibióticos sino también el uso inadecuado (elecciones inapropiadas, dosificación inadecuada, mala adherencia a las pautas de tratamiento) contribuyen al aumento de la resistencia a los antibióticos (7).

La evolución de la resistencia a los antibióticos es probablemente el caso mejor documentado de la evolución contemporánea en acción. Se sabe muy poco sobre cuáles son las consecuencias ecológicas y evolutivas del uso humano de antibióticos en la naturaleza.

Como tal, las poblaciones de bacterias naturales pueden servir como reservorios ambientales de los determinantes de la resistencia, pero la forma en que evoluciona la resistencia y cómo se mantienen y dispersan los genes de resistencia en la naturaleza es poco conocida.

Desentrañar estos mecanismos será crítico para predecir los patógenos resistentes emergentes, ya que podemos esperar la existencia de bucles de retroalimentación continua desde entornos clínicos y agrícolas hasta la naturaleza y viceversa.

Muchas de las bacterias asociadas con los humanos (patógenos, mutualistas o comensales) también tienen otros huéspedes, incluida una amplia variedad de especies de ganado y vida silvestre, o se pueden encontrar en un entorno más amplio (sapronótico) o en ambos. *Escherichia coli* es un ejemplo obvio de tales especies. Resolver el problema de la resistencia a los antimicrobianos en un solo entorno, como en la clínica, resultará ineficaz dado que, en las bacterias, los elementos genéticos móviles (MGE) y las drogas mismas se mueven entre los compartimentos humanos, animales y ambientales (11).

### **5.1 La Microbiota**

La microbiota intestinal es un componente clave en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Investigaciones recientes sugieren que la eficacia de algunos tratamientos y la estabilidad del paciente depende de la acción de las bacterias comensales.

Los antibióticos son armas invaluable para combatir enfermedades infecciosas. Sin embargo, los antibióticos no son puramente selectivos, sino que pueden llegar a alterar la composición y las funciones de la microbiota, también pueden producir efectos nocivos para el huésped, que pueden ser de efecto prolongado.

La aparición de agentes patógenos resistentes a múltiples fármacos suscita inquietudes sobre el uso común e inapropiado de los tratamientos antimicrobianos.

En las últimas dos décadas, la microbiota intestinal ha sido reconocida como un componente fundamental que orquesta la fisiología y la patología del huésped. Trillones de bacterias habitan en el tracto gastrointestinal (GI) de metazoos complejos, expandiendo en gran medida el repertorio genético del huésped.

La microbiota intestinal ejerce muchas funciones beneficiosas para el huésped, a un nivel que puede considerarse un órgano adicional.

Esto se traduce en la posibilidad de que el huésped realice funciones que no están codificadas por su propio genoma; un claro ejemplo de ello es que los microorganismos comensales protegen contra la invasión de patógenos, extraen energía adicional de los alimentos y sintetizan moléculas clave para el desarrollo de tejidos de una manera altamente especializada con respecto a su ubicación a lo largo del tracto gastrointestinal. Las bacterias comensales convierten los ácidos biliares primarios en ácidos biliares

secundarios y también producen vitaminas de los grupos B y K, y fermentan fibras derivadas de plantas que de otro modo no serían digeribles y producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que alimentan los enterocitos y modulan las funciones inmunes. Además, la microbiota impulsa el desarrollo intestinal al promover la vascularización, el engrosamiento de las vellosidades, el ensanchamiento de la superficie de la mucosa, la producción de moco, la proliferación celular y el mantenimiento de las uniones epiteliales. Notablemente, la influencia de la microbiota no se limita al intestino, y afecta la fisiología de la mayoría de los órganos del huésped, incluso el cerebro.

Aunque la fisiología de prácticamente todos los órganos está influenciada por la microbiota, la mucosa intestinal y sus componentes inmunes son los más afectados por esta simbiosis (12).

La microbiota comensal intestinal proporciona innumerables beneficios al huésped sano, incluida la resistencia a la colonización contra los patógenos. Las perturbaciones de la microbiota intestinal (disbiosis) pueden afectar negativamente el estado de salud de un individuo y evitar la protección contra la colonización. Toda la gama de genes de resistencia a antibióticos (resistoma) en una microbiota específica se encuentra en bacterias patógenas y no patógenas. La administración de antibióticos puede causar disbiosis, contribuyendo a la pérdida de resistencia a la colonización seguida de un incremento del resistoma en la microbiota intestinal. Los tratamientos para controlar el aumento actual de bacterias multirresistentes (MDR) son extremadamente limitados.

La microbiota intestinal constituye un ecosistema diverso que contiene miles de especies microbianas diferentes. La mayoría de estas especies pertenecen a *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y, en menor medida, a *Proteobacteria phyla*. Sin embargo, las proporciones relativas de cada taxón varían dramáticamente entre individuos e incluso dentro de individuos a lo largo de su vida. La composición de la microbiota está influenciada por muchos factores, la edad, la procedencia geográfica y el medio ambiente, la alimentación, las comorbilidades y el uso de probióticos, prebióticos y antibióticos (13).

La microbiota ha sido de gran interés por su participación en múltiples procesos fisiológicos en el huésped, incluida la resistencia contra la colonización por patógenos, la

producción de sustancias útiles que actúan como fuente de energía para las células epiteliales intestinales, modulación del sistema inmune intestinal, recuperación de energía de componentes dietéticos no digeridos y estimulación de la angiogénesis intestinal (14).

La homeostasis inmune está directamente ligada a la microbiota intestinal, la cual brinda resistencia contra una amplia gama de patógenos, un mecanismo conocido como resistencia a la colonización. La resistencia a la colonización resulta de mecanismos indirectos, es decir, la activación de las defensas inmunes innatas en la mucosa y la producción de metabolitos protectores como los ácidos biliares secundarios, péptidos antimicrobianos y ácidos grasos de cadena corta; y mecanismos directos, a través de la competencia directa, la secreción de bacteriocinas y el agotamiento de nutrientes. En esencia, la perturbación de la microbiota intestinal normalmente estable, conocida como disbiosis, puede afectar negativamente el estado de salud de un individuo y, críticamente, causar la pérdida de protección contra la colonización (13).

En efecto cualquier cambio en la composición taxonómica del microbioma propio del individuo por más sutil que sea, se ha asociado a una mayor susceptibilidad a estados de enfermedad.

Sin embargo, una microbiota saludable tiene la capacidad de revertir los cambios disbióticos a su estado original, lo que se conoce como “resiliencia”, este mecanismo depende de distintos factores, como la dieta o el tipo de tratamientos con antibióticos recibidos por el huésped, la edad y la presencia de otras enfermedades.

En el caso de las bacterias resistentes o multirresistentes pueden llegar a fusionarse con el microbioma intestinal a través de dos mecanismos: en primer lugar, el huésped puede adquirir bacterias exógenas y colonizar el epitelio intestinal; en segundo lugar, las bacterias previamente susceptibles pueden volverse resistentes mediante la selección o inducción de mutantes resistentes a los antibióticos mediada por la presencia de antibióticos o por eventos de transferencia génica (13).

Al grupo de genes de resistencia se le asocio el concepto de "resistoma antibiótico" se acuñó primero para describir la colección de genes de resistencia a antibióticos que se

encuentran en el medio ambiente. Toda la gama de genes de resistencia a los antibióticos se puede encontrar tanto en bacterias patógenas como no patógenas. Existe un gran reservorio de genes AR en varios ecosistemas, como el cuerpo humano, incluso en bacterias comensales. En este sentido, es probable que los genes AR conocidos de las bases de datos disponibles hasta la fecha representen solo una pequeña fracción de la población "verdadera" de genes AR. El resistoma puede definirse en múltiples niveles. A nivel global, el resistoma se refiere a una gran reserva de genes de resistencia a antibióticos que se encuentran en el medio ambiente. Localmente, el resistoma intestinal se refiere a los genes de resistencia a antibióticos que se encuentran en la microbiota intestinal y, finalmente, a nivel bacteriano, se refiere a los genes resistentes transportados por una especie bacteriana específica (13).

La mayor parte de la información actual sobre la composición y actividad de la microbiota GI proviene de estudios en poblaciones humanas. Sin embargo, se han realizado estudios en perros y gatos, donde se ha encontrado evidencia que afirma que la composición y actividad metabólica de la microbiota GI varía a lo largo del tracto GI, en parte reflejando condiciones anatómicas y fisiológicas inherentes a cada una de las secciones intestinales.

En gatos y perros, así como en otros animales monogástricos, tanto la diversidad bacteriana (un índice que incorpora el número de especies en un área y su abundancia relativa) como la riqueza (número de especies) son mayores en el intestino grueso en comparación con el estómago y todas las regiones del intestino delgado.

La microbiota gastrointestinal incluye los tres dominios principales de la vida (arqueas, bacterias y eucariotas), pero las bacterias constituyen el grupo de microorganismos más abundante y metabólicamente activo en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, un estudio metagenómico reciente mostró que las bacterias pueden representar hasta el 98% de toda la microbiota fecal en perros, con *Archaea*, eucariotas y virus que representan solo alrededor del 2%. Del mismo modo, un estudio reciente también utilizó un enfoque metagenómico y demostró que las *Eukariotas*, *Archaea* y los virus eran componentes menores (<3%) de la microbiota fecal en los gatos, mientras que las bacterias representaban la gran mayoría (97.8%).

El intestino grueso contiene grupos bacterianos principalmente dentro de los *Firmicutes* y *Bacteroidetes phyla*. Otros phyla como Actinobacteria, Proteobacteria, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* y *Tenericutes* también se identifican con frecuencia, pero sus proporciones suelen ser bajas.

Un estudio mostró que los gatos y perros sanos pueden albergar > 90% de Firmicutes en las heces, mientras que otros han demostrado que estas especies animales solo pueden albergar -13% (gatos) y -35% (perros) de este filo también en las heces. Se desconocen los motivos de estas discrepancias, pero pueden incluir diferencias en los protocolos de extracción de ADN, variabilidad dentro de las heces de los microorganismos intestinales, diferencias interindividuales, la región objetivo del gen 16S rRNA, así como las diferencias inherentes entre las técnicas utilizadas para caracterizar la microbiota (14).

#### 5.1.1 La microbiota gastrointestinal de gatos

##### 5.1.1.1 Estómago

Un estudio inicial utilizó varias técnicas de detección y mostró que el estómago del 91% de los gatos domésticos (n = 58) fueron positivos para el género *Helicobacter*, lo que sugiere una alta ocurrencia de este grupo bacteriano en el estómago felino. En otro estudio, se demostró que los gatos y los perros están colonizados predominantemente por *H. heilmannii*, pero otras especies (por ejemplo, *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. pametensis*) también ha sido identificado en estas especies animales (14).

##### 5.1.1.2 Intestino delgado.

Osbaldiston y Stowe (1971) fueron de los primeros en investigar la composición de la microbiota GI en gatos (n = 12) utilizando una amplia variedad de medios de cultivo. En este estudio, los coliformes, estreptococos, enterococos y lactobacilos fueron los grupos predominantes de bacterias a lo largo del tracto gastrointestinal felino. Otros estudios anteriores sugirieron que *Bacteroides* y *Clostridium spp.* fueron las bacterias más comunes en el duodeno de los gatos, también basadas en aislamientos culturales. Del mismo modo, un estudio que utilizó técnicas moleculares y sugirió que el intestino delgado (yeyuno) de los gatos alberga principalmente los órdenes *Clostridiales* y *Lactobacillales* (~ 90%), pero también pequeñas proporciones de al menos cinco órdenes más, mientras que el íleon y el colon ambos albergaban una alta proporción (> 50%) de *Clostridiales* con bajas proporciones de *Actinobacterias* (~ 5%) (14).

### 5.1.1.3 Intestino grueso.

Un estudio reciente secuenció el gen que codifica la chaperonina universal de 60 kDa y mostró que la microbiota fecal de los gatos estaba dominada por *Actinobacteria* (~ 53%) y *Firmicutes* (~ 40%).

Estudios recientes que usan 454-pyrosequencing sugieren que > 90% de todas las secuencias obtenidas de las heces de gatos sanos pertenecen al *Phylum Firmicutes*, especialmente miembros de la famosa *Clostridiaceae*, mientras que un estudio metagenómico sugiere que *Bacteroidetes/Chlorobi* es el grupo bacterial más abundante (~ 68%), seguido de *Firmicutes* (~ 13%) y *Proteobacterias* (~ 6%) también en las heces de los gatos. Se especula que estas discrepancias en los porcentajes informados pueden deberse en parte a la forma utilizada para asignar taxonomías. En parte debido a que la mayoría de los microorganismos gastrointestinales no se han cultivado con éxito, se sabe poco sobre el fenotipo de la microbiota gastrointestinal en los gatos. Los tres principales ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que se encuentran en los gatos son el butirato, el acetato y el propionato. En particular, se considera que el butirato desempeña un papel vital en la salud humana del colon, pero se sabe poco sobre su papel en la salud intestinal de los gatos. No obstante, las bacterias productoras de butirato se encuentran comúnmente en las heces de los gatos (14).

## 5.2 La familia de las Enterobacterias

Las enterobacterias constituyen una amplia familia de bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, relacionados por sus propiedades bioquímicas y genómicas.

Se caracterizan por ser poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a la acción de los agentes externos, por ello se encuentran muy difundidos en el medio ambiente.

Aunque cierto número se comportan como saprofitos del medio ambiente (agua, suelo, plantas), en su mayoría se encuentran asociadas con el hombre o los animales y constituyen la mayor parte de la microbiota gram negativa que coloniza el tubo digestivo, además, en ocasiones pueden intervenir en procesos patógenos intra o extraintestinales (15).

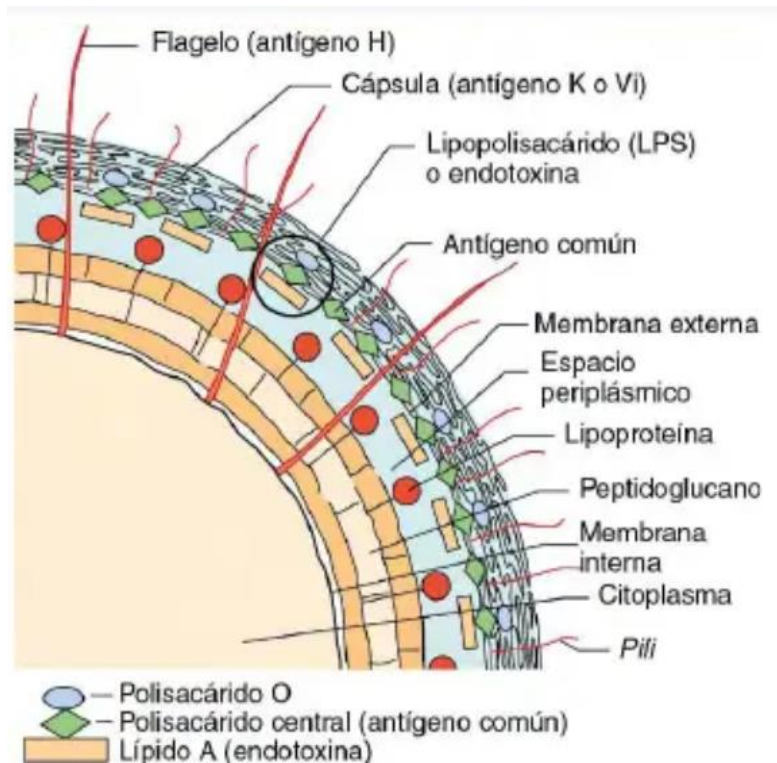
La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica.

Se han descrito 50 géneros, además de cientos de especies y subespecies. Estos se han clasificado en función de sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación de ADN y secuenciación del ARNr.

Las enterobacterias son microorganismos omnipresentes, se encuentran de forma universal en el suelo, el agua, la vegetación y son parte del microbioma intestinal normal de muchos animales. Son los microorganismos responsables de producir una gran variedad de enfermedades, más del 70% de las infecciones del tracto urinario e infecciones intestinales (16).

En relación con su acción patógena puede distinguirse un grupo reducido de especies que se consideran patógenos estrictos ((*Salmonella typhi*, *Shigella*, *Yersinia pestis*), capaces de producir cuadros patológicos en huéspedes normales. La gran mayoría que se comportan como patógenos potenciales, capaces de expresar su acción patógena solo cuando las condiciones ecológicas del huésped se encuentran modificadas, lo que hace que las enterobacterias se encuentren en el origen de gran número de infecciones oportunistas y, junto con *Pseudomonas* y bacilos gramnegativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), constituyan la causa más importante de infecciones hospitalarias (15).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gram negativos de tamaño intermedio de alrededor de 0,3 a 1,0 - 1,0 a 6,0  $\mu\text{m}$ . Comparten un antígeno común (antígeno común enterobacteriano), pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos (uniformemente distribuidos sobre la célula) y no forman esporas. Todos los miembros pueden crecer rápidamente de forma aerobia o anaerobia (anaerobios facultativos) en varios medios no selectivos (agar sangre) y selectivos (agar MacConkey).



**Figura 1.** Imagen que muestra la estructura antigénica de las enterobacterias. Tomado de Murray P. 2013 7ª edición.

La familia *Enterobacteriaceae* tiene unos requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa-positivos y oxidasa-negativos. La ausencia de actividad de citocromo oxidasa es una característica importante, debido a que se puede determinar rápidamente mediante una sencilla prueba, y se utiliza para diferenciar a las enterobacterias de otros bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores (*Vibrio*, *Pseudomonas*) (16).

Se ha utilizado el aspecto de las bacterias en los medios de cultivo para diferenciar a los miembros más frecuentes de la familia *Enterobacteriaceae*. Por ejemplo, la capacidad de fermentar la lactosa (detectada por cambios en el color de medios de cultivo que contienen lactosa, como el agar MacConkey, de uso habitual) se ha utilizado para distinguir a las cepas fermentadoras de lactosa (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*; colonias de color rosado-púrpura en agar MacConkey) de las cepas que no fermentan la lactosa o lo hacen lentamente (*Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* y especies de *Yersinia*; colonias incoloras en agar MacConkey). La resistencia a las sales

biliares en algunos medios selectivos se ha utilizado para separar a los patógenos entéricos (*Shigella*, *Salmonella*) de los microorganismos comensales que son inhibidos por las sales biliares (bacterias gram positivas y algunas gram negativas que están presentes en el aparato digestivo). Algunas enterobacterias que presentan un aspecto mucoso (colonias de aspecto húmedo, elevadas, viscosas) tienen cápsulas prominentes (p. ej., la mayoría de las cepas de *Klebsiella*, algunas cepas de *Enterobacter* y *Escherichia*), mientras que otras están rodeadas de una biopelícula viscosa difusible y suelta.

El lipopolisacárido (LPS) termoestable es el principal antígeno de la pared celular y está formado por tres componentes: el polisacárido O somático más externo, un polisacárido central compartido por todas las enterobacterias (antígeno común enterobacteriano mencionado anteriormente) y el lípido A (16).

El núcleo polisacárido resulta importante para clasificar un microorganismo como miembro de las *Enterobacteriaceae*, el polisacárido O es importante para la clasificación epidemiológica de las cepas dentro de una especie y el componente lipídico A del LPS es responsable de la actividad de la endotoxina, un importante factor de virulencia.

La clasificación epidemiológica (serológica) de las enterobacterias se basa en tres grandes grupos de antígenos: los polisacáridos O somáticos, los antígenos K de la cápsula (polisacáridos específicos de tipo) y las proteínas H de los flagelos bacterianos.

- Los antígenos O específicos de cepa están presentes en cada género y especie, aunque es frecuente la reactividad cruzada entre los géneros que están muy relacionados (p. ej., *Salmonella* con *Citrobacter*, *Escherichia* con *Shigella*). Estos antígenos se detectan mediante aglutinación con anticuerpos específicos.
- Los antígenos K no se usan frecuentemente para tipificar las cepas, pero son importantes porque pueden interferir en la detección de los antígenos O (un problema con algunas cepas de *Salmonella*). Este problema se resuelve al hervir el microorganismo con el fin de eliminar el antígeno K termolábil y exponer el antígeno O termoestable. (16)
- Los antígenos H son proteínas flagelares termolábiles. Pueden estar ausentes en una célula o bien sufrir variaciones antigénicas y estar presentes en dos fases. La

mayor parte de las enterobacterias son móviles, a excepción de algunos géneros frecuentes (p. ej. *Klebsiella*, *Shigella* y *Yersinia*). Las cepas móviles están rodeadas por flagelos (peritricos). Un gran número de enterobacterias posee, asimismo, fimbrias (también conocidas como pili), las cuales se han subdividido en dos clases generales: fimbrias comunes codificadas por el cromosoma y pili sexuales codificados por plásmidos conjugativos. Las fimbrias comunes revisten importancia en la capacidad de la bacteria de adherirse a receptores específicos de la célula anfitriona, mientras que los pili sexuales o conjugativos facilitan el proceso de transferencia genética entre las bacterias (16).

### 5.2.1 *Escherichia coli*

Las especies de *Escherichia* son habitantes casi universales del intestino humano y de otros animales de sangre caliente, aunque no son los organismos dominantes en dicho hábitat.

*Escherichia* puede desempeñar un papel nutritivo en el intestino, donde sintetiza vitaminas, en particular la vitamina K. Como aerobio facultativo, probablemente ayuda a consumir O<sub>2</sub> y hacer anóxico el intestino. Las cepas silvestres de *Escherichia* no suelen requerir factores de crecimiento, y pueden crecer con muchos tipos de fuente de carbono y energía como azúcares, aminoácido o ácidos orgánicos (17).

*E. coli* es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Este microorganismo se asocia a múltiples enfermedades, que incluyen la gastroenteritis e infecciones extraintestinales, como las ITU, meningitis y sepsis. Multitud de cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia (16).

Están constituidos por enterobacterias móviles que fermentan la lactosa (bacilos coliformes) y la glucosa, con producción de gas y ácidos diversos (fermentación ácido-mixta), y que presentan una respuesta característica al grupo de pruebas IMVIC (++--). Son bacilos gramnegativos (fig. 38-1) poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos, que se cultivan en medios comunes, incluso a temperaturas de 45°C, lo que permite diferenciarlos de los demás coliformes.

Forman la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo, y se eliminan por las heces al exterior. Por esto, no es infrecuente que se encuentren en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento constituye un indicador de contaminación fecal reciente. Por otra parte, pueden intervenir en procesos patológicos como patógenos verdaderos en la producción de cuadros intestinales con diarrea o como oportunistas en infecciones extraintestinales diversas, que también pueden ser producidas por otras enterobacterias (15).

*E. coli* posee una amplia variedad de factores de virulencia. Además de los factores generales que comparten todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae, las cepas de *Escherichia* poseen unos factores de virulencia especializados que se pueden clasificar en dos categorías generales: adhesinas y exotoxinas (16).

Presentan antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y en las fimbrias (F). Los antígenos capsulares se han dividido a su vez en 3 clases L, A y B, pero esta clasificación ha sido revisada, recomendando la supresión del antígeno B, que nunca se ha podido separar del antígeno O ni demostrar su individualidad, y la conversión del antígeno proteico L en antígeno F por haberse demostrado que corresponde a fimbrias, de manera que el antígeno K quedaría limitado al antígeno polisacárido ácido. En la actualidad se conocen 167 antígenos O, 103 antígenos K, 75 antígenos H y alrededor de 12 antígenos F, que han permitido establecer una clasificación de *E. coli* en grupos O y serotipos, algunos de los cuales están relacionados con cuadros patológicos (grupos O asociados con procesos diarreicos O con infecciones urinarias, serotipo KI con sepsis y meningitis neonatales) (15).

#### 5.2.1.1 Antígenos

Las fimbrias actúan por su capacidad de adherencia. Las fimbrias tipo 1 0 manosa-sensibles (MS) son muy ubicuas y se encuentran en la mayoría de *E. coli*, que se aíslan de heces normales (70-80 %). Se considera que facilitan la adherencia al moco del intestino grueso y al moca urinario, que en gran parte está constituido por la glicoproteína de Horsfall y Tamm. Las fimbrias manosa-resistentes (MR), denominadas también factores de colonización (CFAI, CFAll y E8775), facilitan la fijación en receptores

específicos de las células de la mucosa intestinal. Por otra parte, los antígenos O y K presentan propiedades anti fagocitarias e inhibitoras de las sustancias bactericidas del suero y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas, cuya síntesis esta codificada por plásmidos de elevado peso molecular (140 Mdaltons) (15).

#### 5.2.1.2 Toxinas

Al igual que todas las enterobacterias, presentan una endotoxina ligada al lipopolisacárido, en especial al lípido A, responsable de la acción pirógena y probablemente de las alteraciones vasculares que se producen en las infecciones generalizadas. Pero, además, algunas cepas pueden producir exotoxinas responsables de la producción de diarreas, cuya síntesis esta codificada por la presencia de plásmidos (plásmidos ent.), que a su vez pueden contener genes asociados con la capacidad de adherencia y otras propiedades (producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antibióticos) (15).

Por otra parte, existen cepas de *E. coli* caracterizadas par su capacidad de penetrar e invadir las células del epitelio intestinal (*E. coli enteroinvasivos*). Se considera que la capacidad de penetración es debida a la presencia de antígenos superficiales, en especial de proteínas de la membrana externa, cuya síntesis esta codificada por plásmidos de 140 Mdaltons, al igual que se ha demostrado en el género *Shigella*. Por otra parte, se ha sugerido en algunos *E. coli* enteropatógenos (0, 26) la posibilidad de producción de enterotoxinas semejantes a las producidas por *S. dysenteriae* (enterotoxinas citotóxicas), que presentarían una acción tóxica directa sobre las células del epitelio intestinal, responsable de la destrucción de las microvellosidades del enterocito y de la producción de diarrea. También se ha demostrado que el serotipo 0 157 produce una enterotoxina citotóxica (Verotoxina) sobre las células endoteliales de los vasos responsables de diarreas hemorrágicas.

#### 5.2.1.3 Fermentos

Algunas cepas de *E. coli* son hemolíticas y se han descrito dos hemolisinas, una asociada al soma bacteriano y otra difusible, cuya importancia como determinantes de la patogenicidad no se conoce.

El cultivo se efectúa en placas de agar-sangre o en medios diferenciales poco selectivos (EMB, MacConkey), seleccionando las colonias fermentadoras de lactosa y procediendo a su identificación por pruebas metabólicas (15).

Las cepas de *E. coli* que provocan gastroenteritis se sub-dividen en los cinco principales grupos siguientes: *E. coli* enterotoxigénica, enteropatógena, enteroagregativa, enterohemorrágica y enteroinvasiva. Los tres primeros grupos ocasionan principalmente una diarrea secretora que afecta al intestino delgado, mientras que los dos últimos afectan sobre todo al intestino grueso (16).

### 5.2.2 **Klebsiella**

Las enterobacterias oportunistas en su mayoría forman parte de la flora normal del tubo digestivo o proceden del medio externo. Se caracterizan por presentar exigencias nutritivas escasas y ser relativamente resistentes a los agentes externos y a un gran número de antibióticos. Por ello, son muy ubicuas, se difunden en el medio ambiente, forman parte de la flora hospitalaria y son capaces de sobrevivir en medios mínimos y aun de colonizar la piel y mucosas de los enfermos hospitalizados.

Su acción patógena es escasa, pero puede manifestarse cuando se produce un aumento de susceptibilidad del huésped, debido a una disminución o inhibición de sus mecanismos defensivos, ya de las defensas externas por alteraciones anatómicas o fisiológicas de la piel y mucosas (introducción directa de microorganismos por heridas, quemaduras, punciones, catéteres urinarios e intravenosos) o de las defensas generales del organismo, como consecuencia de la propia enfermedad o de los tratamientos a que ha sido sometido (corticoides, radiaciones, citostáticos).

Corresponden en su mayoría a los llamados “bacilos coliformes”, grupo heterogéneo de enterobacterias fermentadoras rápidas y lentas de la lactosa, que incluyen los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* y *Citrobacter*, a los que se incluyen algunas no fermentadoras, como *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Edwardsiella* y los géneros de reciente adquisición (15).

Las bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* son enterobacterias inmóviles, en su gran mayoría productoras de ureasa, poseen una cápsula prominente que confiere el

aspecto mucoso a las colonias aisladas y la mayor virulencia de los microorganismos in vivo.

Los miembros de este género que se aíslan con mayor frecuencia son *K. pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, los cuales pueden producir una neumonía lobular primaria adquirida. Estas bacterias producen también infecciones de heridas, de tejidos blandos e ITU (16).

Pero las *Klebsiellas* se encuentran más frecuentemente en el suelo y en el agua. La mayoría de las cepas de *Klebsiella* también fijan nitrógeno, una propiedad que no es característica de otras bacterias entéricas (17).

Presentan un antígeno capsular K y un antígeno somático O, que por pruebas de aglutinación o de hinchamiento de la capsula ha permitido dividir el género en 11 grupos O y 80 tipos K, algunos de los cuales presentan reacciones cruzadas con los polisacáridos capsulares del neumococo. Algunas cepas presentan fimbrias y, además, se ha demostrado la producción de bacteriocinas (klebocinas). Se conocen dos especies: *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, y la primera se divide en 3 subespecies: *K. pneumoniae subespecie pneumoniae*, *K. pneumoniae subespecie ozaenae* y *K. pneumoniae subespecie rhinoscleromatis*. *K. pneumoniae subespecie pneumoniae* y *K. oxytoca* son las más frecuentes y difundidas en la naturaleza (agua, vegetales, alimentos). Se encuentran en las vías respiratorias superiores del 5-10 % de personas normales y se aíslan del 20 % de esputos y también de las heces, por lo que su hallazgo no es significativo. Intervienen en procesos neumónicos, que, a diferencia de la neumonía neumocócica, se caracterizan por presentar una clara tendencia a la necrosis, con formación de abscesos y elevada mortalidad, especialmente en alcohólicos y enfermos hospitalizados. Las subespecies *rhinoscleromatis* y *ozaenae* se encuentran en las vías respiratorias superiores con menos frecuencia. La primera está relacionada con el rinoscleroma, tumor granulomatoso, de crecimiento lento, que se inicia en la mucosa nasal, bucal, de la faringe y de la laringe, y progresa por contigüidad produciendo destrucciones y trastornos mecánicos. *K. pneumoniae subespecie ozaenae* se encuentra asociada con casos de ozena, rinitis atrófica con secreción mucopurulenta y un olor fétido muy penetrante, cuya etiología no se conoce; también se ha aislado de infecciones urinarias, otitis y procesos diversos (15).

### 5.3 Clasificación y mecanismo de acción de antibióticos

En el mundo, se fabrican y utilizan anualmente más de 10.000 toneladas de diversos fármacos antimicrobianos.

Los fármacos antimicrobianos son compuestos que matan microorganismos en el hospedador o controlan su crecimiento. Los antimicrobianos eficaces tienen una toxicidad selectiva, inhiben o matan los agentes patógenos sin causar daño al hospedador (17).

Los fármacos antimicrobianos se clasifican según su estructura molecular, mecanismo de acción, y espectro de actividad antimicrobiana.

#### 5.3.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular

El mecanismo más común de actividad antibiótica es la interferencia en la síntesis de la pared celular bacteriana. La mayoría de los antibióticos activos sobre la pared se clasifican en antibióticos  $\beta$ -lactámicos (p. ej., penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenems, monobactams, inhibidores de  $\beta$ -lactamasa), así denominados porque comparten una estructura de anillo  $\beta$ -lactámico común.

Otros antibióticos que interfieren en la construcción de la pared celular bacteriana son la vancomicina, la daptomicina, la bacitracina y los siguientes agentes antimicobacterianos: isoniazida, etambutol, cicloserina y etionamida.

El principal componente estructural de la mayoría de las paredes de las células bacterianas es la capa de peptidoglicano. La estructura básica es una cadena de 10 a 65 residuos disacáridos que constan de moléculas en alternancia de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. A continuación, estas cadenas se entrecruzan con puentes peptídicos que crean una malla rígida que recubre la bacteria. La construcción de las cadenas y el entrecruzamiento están catalizados por enzimas específicas (p. ej., transpeptidasas, transglucosilasas, carboxipeptidasas) que son miembros de una gran familia de serina proteasas.

Estas enzimas reguladoras reciben también la denominación de proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, del inglés penicillin-binding proteins), porque son las dianas de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Cuando las bacterias en crecimiento quedan expuestas a estos

antibióticos, el antibiótico en cuestión se une a PBP específicas de la pared celular bacteriana e inhibe el ensamblaje de las cadenas de peptidoglucano. Esto, a su vez, activa autolisinas que degradan la pared celular, lo que da lugar a la muerte de la célula bacteriana. Así, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos actúan como agentes bactericidas (16).

#### 5.3.1.1 Penicilinas

Las penicilinas son antibióticos muy eficaces con una toxicidad extraordinariamente baja. El compuesto básico es un ácido orgánico con un anillo  $\beta$ -lactámico obtenido a partir del cultivo del hongo *Penicillium chrysogenum*. Si el hongo crece por un proceso de fermentación, se producen grandes cantidades del ácido 6-aminopenicilánico (el anillo  $\beta$ -lactámico se fusiona con un anillo tiazolidínico). La modificación bioquímica de este intermedio produce antibióticos que poseen una mayor resistencia a los ácidos del estómago, una mayor absorción en el tracto gastrointestinal, resistencia a la destrucción por la penicilinasasa o un espectro de actividad más amplio que incluye bacterias gramnegativas. La penicilina G es inactivada por el ácido gástrico; por ello, se utiliza principalmente como fármaco intravenoso para el tratamiento de infecciones causadas por el limitado número de microorganismos sensibles. La penicilina V es más resistente al ácido y es la forma oral preferida para el tratamiento de las bacterias sensibles. Las penicilinas resistentes a la penicilinasasa, como la meticilina y la oxacilina, se emplean para tratar infecciones causadas por estafilococos sensibles (16).

La ampicilina fue la primera penicilina de amplio espectro, aunque el espectro de actividad frente a los bacilos gramnegativos se limitaba principalmente a especies de *Escherichia*, *Proteus*, y *Haemophilus*. Otras penicilinas (p. ej., carbenicilina, ticarcilina, piperacilina) son eficaces frente a una gama más amplia de bacterias gramnegativas, entre las que figuran especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Se han combinado penicilinas seleccionadas con inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas.

Los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (p. ej., ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) son relativamente inactivos por sí mismos, pero, cuando se combinan con algunas penicilinas (es decir, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina), son eficaces en el tratamiento de algunas infecciones causadas por bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa. Los inhibidores se unen irreversiblemente a las  $\beta$ -lactamasas bacterianas susceptibles y

las inactivan (aunque no todas son fijadas por estos inhibidores), lo que permite al fármaco acompañante que desestructure la síntesis de la pared celular bacteriana (16).

#### 5.3.1.2 Cefalosporinas y cefamicinas

Las cefalosporinas son antibióticos  $\beta$ -lactámicos derivados del ácido 7-aminocefalosporánico (el anillo  $\beta$ -lactámico se fusiona con un anillo dihidrotiazínico) que fue aislado originalmente a partir del hongo *Cephalosporium*.

Las cefamicinas están estrechamente relacionadas con las cefalosporinas, excepto que contienen oxígeno en lugar de azufre en el anillo dihidrotiazínico, lo que las hace más estables a la hidrólisis por las  $\beta$ -lactamasas. Las cefalosporinas y las cefamicinas tienen el mismo mecanismo de acción que las penicilinas; sin embargo, tienen un espectro antibacteriano más amplio, son resistentes a muchas  $\beta$ -lactamasas y tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas (p. ej., una mayor semivida).

Las modificaciones bioquímicas en la molécula antibiótica básica dieron lugar a una mejora en la actividad y en las propiedades farmacocinéticas. Las cefalosporinas poseen una mayor actividad frente a bacterias gramnegativas que las penicilinas. Esta actividad, a su vez, varía entre las diferentes «generaciones» de las cefalosporinas. La actividad de los antibióticos de primera generación de corto espectro queda restringida principalmente a especies de *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis* y cocos grampositivos sensibles a oxacilina. Muchos de los antibióticos de segunda generación de espectro expandido poseen una actividad adicional frente a *Haemophilus influenzae* y especies de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*, y algunos anaerobios, como *Bacteroides fragilis*.

Los antibióticos de tercera generación de amplio espectro y los antibióticos de cuarta generación de espectro extendido son activos frente a la mayoría de las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los antibióticos de espectro extendido ofrecen la ventaja de una mayor estabilidad frente a las  $\beta$ -lactamasas. Lamentablemente, las bacterias gramnegativas han desarrollado rápidamente resistencia a la mayoría de cefalosporinas y de cefamicinas (principalmente como consecuencia de la producción de  $\beta$ -lactamasas), que ha comprometido de modo significativo el empleo de todos estos agentes (16).

### 5.3.1.3 Carbapenems y monobactams

Otras clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los carbapenems (p. ej., imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) y los monobactams (p. ej., aztreonam). Los carbapenems son antibióticos de amplio espectro importantes, ampliamente prescritos, que son activos frente a muchos grupos de microorganismos. En cambio, los monobactams son antibióticos de corto espectro que son activos sólo frente a bacterias gramnegativas aerobias. Las bacterias anaerobias y las bacterias grampositivas son resistentes. La ventaja de los antibióticos de corto espectro es que pueden emplearse para tratar infecciones causadas por microorganismos sensibles sin afectar a la población bacteriana protectora normal del paciente. A pesar de esta ventaja, los monobactams no se emplean con frecuencia (16).

### 5.3.2 Inhibición de la síntesis de proteínas

La acción principal de los agentes en la segunda clase más importante de antibióticos es la inhibición de la síntesis de proteínas.

#### 5.3.2.1 Aminoglucósidos

Los antibióticos aminoglucósidos constan de amino azúcares unidos por medio de enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. La estreptomina, la neomicina, la kanamicina y la tobramicina fueron aisladas originalmente de especies de *Streptomyces*, y la gentamicina y la sisomicina fueron aisladas de especies de *Micromonospora*. La amikacina y la netilmicina son derivados sintéticos de la kanamicina y la sisomicina, respectivamente. Estos antibióticos ejercen su acción al pasar a través de la membrana externa bacteriana (en bacterias gramnegativas), la pared celular y la membrana citoplasmática al citoplasma, en donde inhiben la síntesis de proteínas al unirse de modo irreversible a las proteínas ribosómicas 30S. Esta unión a los ribosomas tiene dos efectos: producción de proteínas aberrantes como consecuencia de una lectura errónea del ARN mensajero (ARNm) y la interrupción de la síntesis de proteínas al producir la liberación prematura del ribosoma del ARNm.

Los aminoglucósidos son bactericidas por su capacidad para unirse irreversiblemente a los ribosomas y se utilizan comúnmente para tratar infecciones graves causadas por bacilos gramnegativos (p. ej., enterobacterias, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) y algunos microorganismos grampositivos. La penetración a través de la membrana citoplasmática

es un proceso aeróbico que requiere energía; por tanto, los anaerobios son resistentes a los aminoglucósidos y los microorganismos sensibles en un ambiente de anaerobiosis (p. ej., abscesos) no responden al tratamiento. Los estreptococos y los enterococos son resistentes a los aminoglucósidos porque los aminoglucósidos no penetran a través de la pared celular de estas bacterias. El tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos requiere la coadministración de un aminoglucósido con un inhibidor de la síntesis de la pared celular (p. ej., penicilina, ampicilina, vancomicina) que facilite la captación del aminoglucósido. Los antibióticos de esta clase utilizados con mayor frecuencia son la amikacina, la gentamicina y la tobramicina (16).

Los tres aminoglucósidos se utilizan para tratar infecciones sistémicas causadas por bacterias gramnegativas sensibles. La amikacina posee la mejor actividad y con frecuencia se reserva para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gramnegativas que son resistentes a la gentamicina y a la tobramicina. La estreptomina no está fácilmente disponible, pero se ha empleado para el tratamiento de la tuberculosis, la tularemia y las infecciones causadas por estreptococos o enterococos resistentes a gentamicina (en combinación con una penicilina).

La resistencia a la acción antibacteriana de los aminoglucósidos puede desarrollarse de cuatro modos distintos: 1) mutación del sitio de unión en el ribosoma, 2) menor captación del antibiótico al interior de la célula bacteriana, 3) mayor expulsión del antibiótico de la célula o 4) modificación enzimática del antibiótico. El mecanismo de resistencia más común es la modificación enzimática de los aminoglucósidos. Se lleva a cabo por la acción de fosfotransferasas (amino-glucósido fosfotransferasas [APH]; siete descritas), adenil-transferasas (adenina nucleótido translocasas [ANT]; cuatro descritas) y acetiltransferasas (acetil-CoA carboxilasas [AAC]; cuatro descritas) en los grupos amino e hidroxilo del antibiótico. Las diferencias en la actividad antibacteriana entre los aminoglucósidos vienen determinadas por su relativa susceptibilidad a estas enzimas. Los otros mecanismos por los que las bacterias pueden desarrollar resistencia a los aminoglucósidos son relativamente infrecuentes. La resistencia causada por alteración del ribosoma bacteriano requiere la mutación sistemática de múltiples copias de los genes ribosómicos que existen en la célula bacteriana. La resistencia causada por una

inhibición en el transporte del antibiótico al interior de la célula bacteriana se observa en ocasiones en *Pseudomonas*, pero se observa con mayor frecuencia en bacterias anaerobias. Este mecanismo produce una resistencia cruzada de bajo nivel a todos los aminoglucósidos. Se produce un eflujo activo de los aminoglucósidos sólo en bacterias gramnegativas y rara vez se observa (16).

#### 5.3.2.2 Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro que inhiben la síntesis proteica en las bacterias al unirse de modo reversible a las subunidades ribosómicas 30S, bloqueando de este modo la unión del aminoacil-ARN de transferencia (ARNt) al complejo ribosoma 30S-ARNm. Las tetraciclinas (es decir, tetraciclina, doxiciclina, minociclina) son eficaces en el tratamiento de las infecciones causadas por especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Rickettsia* y otras bacterias grampositivas y gramnegativas seleccionadas. Todas las tetraciclinas poseen un espectro de actividad similar, y las diferencias principales entre los antibióticos son sus propiedades farmacocinéticas (la doxiciclina y la minociclina se absorben fácilmente y tienen una semivida prolongada). La resistencia a las tetraciclinas puede originarse a partir de una menor penetración del antibiótico en el interior de la célula bacteriana, un eflujo activo del antibiótico fuera de la célula, una alteración del sitio diana ribosómico o una modificación enzimática del antibiótico. Las mutaciones en el gen cromosómico que codifica la proteína porina de la membrana externa, OmpF, pueden llevar a una resistencia de bajo nivel a las tetraciclinas, así como a otros antibióticos (p. ej.,  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, cloranfenicol).

Los investigadores han identificado una variedad de genes en diferentes bacterias que controlan el eflujo activo de las tetraciclinas fuera de la célula. Es ésta la causa de resistencia más común. La resistencia a las tetraciclinas puede ser consecuencia también de la producción de proteínas similares a factores de elongación que protegen el ribosoma 30S. Cuando así sucede, el antibiótico puede aún unirse al ribosoma, pero no se desestructura la síntesis proteica (16).

#### 5.3.2.3 Macrólidos

La eritromicina, derivada de *Streptomyces erythreus*, es el antibiótico macrólido modelo. La estructura básica de esta clase de antibióticos es un anillo lactónicomacrocíclico unido

a dos azúcares, desosamina y cladinosa. La modificación de la estructura macrólida llevó al desarrollo de la azitromicina, la claritromicina y la roxitromicina.

Los macrólidos ejercen su efecto al unirse de modo reversible al ARN ribosómico (ARNr) 23S de la subunidad ribosómica 50S, que bloquea la elongación polipeptídica. Lo más frecuente es que la resistencia a los macrólidos se origine de la metilación del ARNr 23S, impidiendo la unión por el antibiótico. Otros mecanismos de resistencia incluyen la inactivación de los macrólidos por enzimas (p. ej., estererasas, fosforilasas, glucosidasa) o mutaciones en el ARNr 23S y en las proteínas ribosómicas. Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos con un amplio espectro de actividad. Se han empleado en el tratamiento de infecciones pulmonares causadas por especies de *Mycoplasma*, *Legionella* y *Chlamydia*, así como en el tratamiento de infecciones causadas por especies de *Campylobacter* y bacterias grampositivas en pacientes alérgicos a la penicilina. La mayoría de las bacterias gramnegativas son resistentes a los macrólidos. También se han utilizado la azitromicina y la claritromicina en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias (p. ej., complejo *Mycobacterium avium*) (16).

#### 5.3.2.4 Clindamicina

La clindamicina (de la familia de los antibióticos de la lincosamida) es un derivado de la lincomicina, que fue aislada originalmente de *Streptomyces lincolnensis*. Al igual que el cloranfenicol y los macrólidos, la clindamicina bloquea la elongación proteica al unirse al ribosoma 50S. Inhibe la peptidil transferasa al interferir en la unión del complejo aminoácido-acil-ARNt. La clindamicina es activa frente a los estafilococos y bacilos gramnegativos anaerobios, pero es generalmente inactiva frente a bacterias gramnegativas aerobias. La metilación del ARNr 23S es el origen de la resistencia bacteriana. Dado que tanto la eritromicina como la clindamicina pueden inducir esta resistencia enzimática (también de mediación plasmídica), se observa resistencia cruzada entre estas dos clases de antibióticos (16).

#### 5.3.2.5 Estreptograminas

Las estreptograminas son una clase de péptidos cíclicos producidos por especies de *Streptomyces*. Estos antibióticos se administran en forma de combinación de dos componentes, estreptograminas del grupo A y del grupo B, que actúan sinérgicamente

para inhibir la síntesis proteica. El antibiótico actualmente disponible de esta clase es la quinupristina-dalfopristina.

La dalfopristina se une a la subunidad ribosómica 50S e induce un cambio en la conformación que facilita la unión de la quinupristina. La dalfopristina previene la elongación de la cadena peptídica, y la quinupristina da comienzo a una liberación prematura de las cadenas peptídicas del ribosoma. Este fármaco de combinación es activo frente a estafilococos, estreptococos y *E. faecium* (pero no *E. faecalis*). El empleo del antibiótico ha quedado restringido principalmente al tratamiento de infecciones por *E. faecium* resistente a vancomicina (16).

#### 5.3.3.1 Quinolonas

Las quinolonas son una de las clases de antibióticos más utilizados. Son agentes quimioterapéuticos sintéticos que inhiben la topoisomerasa de tipo II (girasa) en el ADN bacteriano o la topoisomerasa de tipo IV, que se requieren para la replicación, recombinación y reparación del ADN. La subunidad girasa A del ADN es la principal diana quinolónica en las bacterias gramnegativas, mientras que la topoisomerasa de tipo IV es la principal diana en las bacterias grampositivas. La primera quinolona utilizada en la práctica clínica fue el ácido nalidíxico. Se empleó este fármaco para tratar infecciones del tracto urinario causadas por una variedad de bacterias gramnegativas, pero se desarrolló con rapidez resistencia a este fármaco, lo que hizo que dejara de utilizarse. Este fármaco ha sido reemplazado en la actualidad por quinolonas más modernas y más activas, como el ciprofloxacino, el levofloxacino y el moxifloxacino.

La modificación de los dos anillos del núcleo conduce a las nuevas quinolonas (denominadas fluoroquinolonas). Estos antibióticos poseen una excelente actividad frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, aunque puede desarrollarse resistencia rápidamente en *Pseudomonas*, estafilococos resistentes a oxacilina y enterococos. En particular, las quinolonas más modernas de espectro extendido poseen una actividad significativa frente a bacterias grampositivas

La resistencia a las quinolonas está mediada por mutaciones cromosómicas en los genes estructurales de la ADN girasa y en la topoisomerasa de tipo IV. Otros mecanismos

incluyen una menor captación del fármaco causada por mutaciones en los genes reguladores de la permeabilidad bacteriana, y una hiperexpresión de bombas de eflujo que de modo activo eliminan el fármaco. Cada uno de estos mecanismos está principalmente mediado por el cromosoma (16).

#### 5.3.3.2 Antimetabolitos

Las sulfamidas son antimetabolitos que compiten con el ácido p-aminobenzoico, con lo que se previene la síntesis del ácido fólico requerido por ciertos microorganismos. Dado que los mamíferos no sintetizan ácido fólico (requerido como vitamina), las sulfamidas no interfieren en el metabolismo celular de los mamíferos.

La trimetoprima es otro antimetabolito que interfiere con el metabolismo del ácido fólico al inhibir la dihidrofolato reductasa, con lo que se previene la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato. Esta inhibición bloquea la formación de timidina, algunas purinas, metionina y glicina. La trimetoprima se combina comúnmente con el sulfametoxazol para producir una combinación sinérgica activa en dos etapas en la síntesis del ácido fólico. La dapsona y el ácido p-aminosalicílico también son antifolatos cuya utilidad ha sido demostrada en el tratamiento de infecciones micobacterianas. Las sulfamidas son eficaces frente a una amplia gama de microorganismos grampositivos y gramnegativos, tales como *Nocardia*, *Chlamydia* y algunos protozoos. Las sulfamidas de acción corta, como el sulfisoxazol, se encuentran entre los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones agudas del tracto urinario causadas por bacterias sensibles, tales como *E. coli*.

El trimetoprima-sulfametoxazol es eficaz frente a una gran variedad de microorganismos grampositivos y gramnegativos y es el fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones agudas y crónicas del tracto urinario. La combinación también es eficaz en el tratamiento de las infecciones causadas por *Pneumocystis jirovecii*, infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior, otitis media y gonorrea no complicada. La resistencia a estos antibióticos puede originarse por una variedad de mecanismos. Las bacterias tales como *Pseudomonas* son resistentes como consecuencia de barreras de permeabilidad. Una menor afinidad de la dihidrofolato reductasa puede ser el origen de la

resistencia a trimetoprima. Además, las bacterias que utilizan timidina exógena (p. ej., enterococos) también son intrínsecamente resistentes (16).

#### **5.4 Mecanismos de resistencia**

La resistencia a antimicrobianos es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que usualmente es sensible. La mayor parte de la resistencia a antimicrobianos es debida a genes de resistencia que se transfieren por intercambio genético (17).

La resistencia a un antibiótico significa que un microorganismo puede crecer o sobrevivir en presencia de una concentración de antibiótico que suele ser suficiente para inhibir o matar organismos de la misma especie. Los términos "susceptible" y "resistente" relacionados con los antibióticos se suelen utilizar en la práctica clínica para inferir el probable éxito o fracaso del tratamiento.

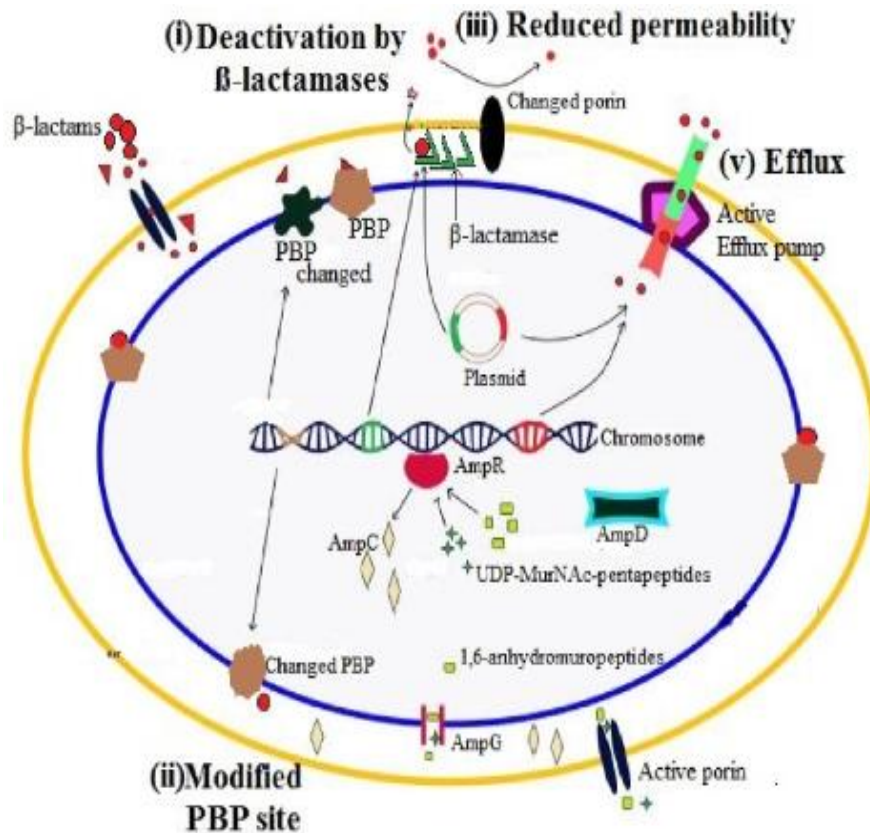
Los microorganismos pueden ser intrínsecamente resistentes a un antibiótico o desarrollar resistencia después de la exposición a ese antibiótico (resistencia adquirida) (8).

Existen diversas razones por las que los microorganismos pueden tener una resistencia inherente a un antibiótico:

1. El microorganismo puede carecer de la estructura que inhibe el antibiótico; por ejemplo, algunas bacterias como los *Micoplasmas*, carecen de una pared celular típica, por lo que son resistentes a las penicilinas.
2. El organismo puede ser impermeable al antibiótico; por ejemplo, la mayoría de las bacterias Gram negativas son impermeables a la penicilina G.
3. El organismo puede alterar el antibiótico inactivándolo. Muchos estafilococos producen  $\beta$ -lactamasas que rompen el anillo  $\beta$ -lactámico de la mayoría de las penicilinas.
4. El organismo puede modificar la diana del antibiótico por un cambio genético, la alteración puede tener lugar en una ruta metabólica que bloquea el antimicrobiano. El organismo desarrolla entonces una ruta bioquímica resistente; por ejemplo, muchos patógenos desarrollan resistencia a sulfonamidas. Debido a que estas

inhiben la producción de ácido fólico en bacterias, pero las bacterias resistentes modifican su metabolismo incorporando ácido fólico ya sintetizado del medio, obviando así la necesidad de una ruta que pueda ser bloqueada por las sulfonamidas.

5. El organismo puede ser capaz de bombear hacia fuera un antibiótico que haya entrado en la célula (eflujo) (caso de la tetraciclina) (17).



**Figura 2.** Mecanismos básicos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en bacterias Gram negativas.

- i) Desactivación de  $\beta$ -lactámicos, por  $\beta$ -lactamasas codificadas por plásmidos o cromosomas que tienen actividad hidrolítica.
- ii) Cambio en el sitio dinámico de las PBP que dificultan la unión de las moléculas de  $\beta$ -lactámicos a las PBP.
- iii) Reducción de la permeabilidad de la membrana externa por modificaciones de las porinas, cambio en los tipos de porinas que se encuentran en la membrana externa o pérdida completa de la expresión de las porinas
- iv) salida de  $\beta$ -lactámicos al exterior de la bacteria a través de la activación de la bomba de eflujo.

Tomado de Hussain, Hafiz Iftikhar. Genetic basis of molecular mechanisms in  $\beta$ -lactam resistant gram-negative bacteria. 2021.

La resistencia adquirida puede desarrollarse como resultado de una mutación o transferencia directa de genes que codifican un mecanismo de resistencia. La transferencia de genes de resistencia puede ocurrir mediante una variedad de mecanismos que incluyen la conjugación (transferencia de genes transportados en plásmidos, que también se conocen como elementos genéticos móviles), transformación (transferencia directa de ADN desnudo) o transducción (transferencia de ADN similar por bacteriófago). El material genético, incluidos los genes de resistencia a los antibióticos, puede propagarse de manera muy eficaz entre bacterias, incluso las de especies no relacionadas (8).

Los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos han contribuido significativamente a nuestro conocimiento de la estructura y función celular. Los procesos de resistencia están ampliamente distribuidos en el reino microbiano; la mayoría puede diseminarse mediante uno o más mecanismos distintos de transferencia de genes. (9)

A continuación, se mencionan detalladamente los principales mecanismos de resistencia:

#### 5.4.1 Bombas de expulsión (eflujo)

El eflujo como mecanismo de resistencia a los antibióticos se describió originalmente para las tetraciclinas (McMurry et al., 1980), ahora se aprecia mucho y se encuentra comúnmente (18).

Los sistemas de eflujo capaces de transportar múltiples antimicrobianos se dividen en su mayoría en cinco clases de proteínas distintas: la superfamilia de facilitadores principales (MFS), la familia de cassettes de unión a ATP (ABC), la familia de división de nodulación de resistencia (RND), la familia de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR) (en sí mismo un miembro de la superfamilia de transportadores de fármacos/metabolitos [DMT]) y la familia de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos (MATE) (19).

La salida de proteínas de las familias RND, SMR, MF y MATE está impulsada por la fuerza motriz de protones (y sodio) y, por lo tanto, se denomina transporte secundario.

La hidrólisis de ATP impulsa el flujo de salida en los transportadores primarios (ABC). Las proteínas de eflujo también vienen en dos tipos generales. Algunos, como los

transportadores de tetraciclina y macrólido, son sistemas de eflujo de un solo componente que tienen perfiles de sustrato estrechos, que actúan sobre unos pocos agentes o múltiples agentes dentro de la misma clase de drogas. Otros, como los miembros de la familia RND, requieren dos proteínas adicionales para conferir resistencia, pero son capaces de unirse a múltiples compuestos estructuralmente no relacionados y conferir amplios fenotipos de resistencia. Las organizaciones de los sistemas de eflujo basados en RND, que se encuentran en varias bacterias gramnegativas, les permiten transportar fármacos desde el citoplasma y a través de las membranas interna y externa de la envoltura celular (18).

Los más importantes con respecto a la resistencia a agentes clínicamente relevantes son los miembros de la familia RND. Originalmente se pensó que se limitaba a las bacterias Gram-negativas, pero ahora se han identificado miembros de la familia RND en todos los reinos principales, aunque en realidad se ha demostrado que solo los miembros de los organismos Gram-negativos desempeñan un papel en la salida y resistencia a múltiples fármacos.

Los transportadores RND funcionan junto con una proteína de fusión de membrana periplásmica (MFP) y una proteína de membrana externa, ahora llamada factor de membrana externa (OMF). Esta organización permite la salida de antibióticos a través de ambas membranas de un típico organismo Gram-negativo.

Apuntar al flujo de salida y/o a la barrera de la membrana externa es claramente un enfoque para promover la acumulación de fármacos dentro de la célula bacteriana, aumentando así la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

Los estudios han confirmado mutaciones, por ejemplo, que la pérdida de mecanismos de salida de múltiples fármacos como AcrAB en *E. coli* y en *P. aeruginosa* comprometerá la resistencia antimicrobiana tanto intrínseca como adquirida significativamente (19).

#### 5.4.2 Modificación de la molécula blanco

Puede ser una alteración estructural que impida la unión de un antibiótico, o un mecanismo por el cual la ruta metabólica que normalmente se inhibe es desviada por otra

alternativa. Esto se ve en la resistencia a las sulfonamidas y en los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), que ha adquirido una nueva proteína de unión a penicilina de *Staphylococcus scuiri*.

Los cambios importantes en el sitio objetivo incluyen topoisomerasas II y IV (quinolonas), la subunidad b de la ARN polimerasa dependiente de ADN (rifamicinas) y la metilación del objetivo 23S (macrólidos de 14/15 miembros) (1).

#### 5.4.3 Disminución de la permeabilidad

La membrana externa de la envoltura de las células gramnegativas es una barrera para los compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos. Para eludir esta barrera de permeabilidad, estos organismos han desarrollado proteínas de porina (p. ej., OmpF en *E. coli* y OprD en *P. aeruginosa*) que funcionan como puntos de entrada y salida "no específicos" para antibióticos y otras sustancias químicas orgánicas de molécula pequeña (18).

Las porinas son estructuras proteicas incrustadas en la membrana bilipídica externa solo de los organismos gramnegativos. Controlan lo que entra y sale de la célula en función del tamaño y la carga moleculares. Las mutaciones en los elementos genéticos que codifican las porinas (mutaciones de permeabilidad) pueden excluir un antibiótico o múltiples antibióticos.

*Pseudomona aeruginosa* tiene dos membranas lipídicas externas, produce  $\beta$ -lactamasas de manera constitutiva y, por lo tanto, tiende a ser más resistente que los coliformes.

Alternativamente, los organismos pueden excretar activamente antibióticos, en particular tetraciclinas, macrólidos y quinolonas. Las bombas de eflujo pueden regularse al alza, generalmente por la exposición al antibiótico en cuestión. *S. aureus* resistente a la eritromicina por excreción activa sigue siendo sensible a la clindamicina, pero la mutación más común en el sitio de destino afecta la susceptibilidad a ambos antibióticos (1).

Imipenem (y en menor medida meropenem) y los aminoácidos básicos pasan a través de la porina OprD; las mutaciones que disminuyen la expresión de la porina contribuyen a la resistencia clínica al imipenem. Además, la expresión de OprD y el sistema de eflujo de MexEF-OprM está corregulado, y de esta manera puede desarrollarse resistencia a los

carbapenémicos y otros sustratos de MexEF-OprM en mutantes donde la expresión de OprD y la bomba de expulsión ha sido alterada.

En 1996, Hiramatsu y sus colegas identificaron aislados clínicos de *S. aureus* en Japón que exhibían un nivel intermedio de resistencia a la vancomicina (las cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia [VISA] a la vancomicina), y poco después aparecieron en los Estados Unidos organismos adicionales con un fenotipo insensible a los glucopéptidos (los aislados GISA). Una característica destacada de los aislados de VISA es la presencia de una pared celular engrosada. Se presume que esta propiedad atrapa la vancomicina y evita que el antibiótico alcance su objetivo. Más recientemente, el mismo grupo realizó una caracterización preliminar de los aislamientos de VISA y encontró una susceptibilidad reducida a la daptomicina. Aunque sin duda se necesitan caracterizaciones moleculares y bioquímicas adicionales, los hallazgos sí conllevan una nota de advertencia. Las mutaciones que ofrecen resistencia a la polimixina B en *P. aeruginosa* presumiblemente involucran cambios en la envoltura de la célula bacteriana que no involucran porinas. En *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, PmrAB (un sistema regulador de dos componentes) regula la resistencia a la polimixina modificando el lipopolisacárido y el lípido A. El sistema de salida RosAB de *Yersinia enterocolitica* también afecta la susceptibilidad a la polimixina B (18).

#### 5.4.4 Inactivación por enzimas

La producción de enzimas capaces de introducir cambios químicos en la molécula antimicrobiana es un mecanismo bien conocido de resistencia antibiótica adquirida tanto en bacterias gramnegativas como grampositivas (20).

Las enzimas que modifican los fármacos antibacterianos se dividen en dos clases generales: aquellas como las  $\beta$ -lactamasas que degradan los antibióticos y otras (incluidas las proteínas modificadoras de macrólidos y aminoglucósidos) que realizan transformaciones químicas (18).

Curiosamente, la mayoría de los antibióticos afectados por estas modificaciones enzimáticas ejercen su mecanismo de acción inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel

de los ribosomas. Se han descrito muchos tipos de enzimas modificadoras y las reacciones bioquímicas más frecuentes que catalizan incluyen:

- i) acetilación (aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas),
- ii) fosforilación (aminoglucósidos, cloranfenicol) y
- iii) adenilación (aminoglucósidos, lincosamidas).

Independientemente de la reacción bioquímica, el efecto resultante a menudo se relaciona con un impedimento estérico que disminuye la avidéz del fármaco por su objetivo, lo que, a su vez, se refleja en CIM bacterianas más altas (20).

#### 5.4.4.1 Hidrólisis

Otra reacción bioquímica sobresaliente, en este caso muchos antibióticos tienen enlaces químicos hidrolíticamente susceptibles (por ejemplo, ésteres y amidas), cuya integridad es fundamental para la actividad biológica. Entonces, no sorprende que haya varios ejemplos de enzimas que han evolucionado para atacar y escindir estos enlaces vulnerables y, como resultado, proporcionar un medio para destruir la actividad antibiótica. El principal de ellos es un grupo de amidasas que escinden el anillo lactámico de las clases de fármacos penicilina y cefalosporina. Otros ejemplos también incluyen estererasas que se han relacionado con la resistencia a los antibióticos macrolidos y las epoxidasas de apertura del anillo con resistencia a la fosfomicina. Debido a que estas enzimas solo requieren agua como co-sustrato, a menudo pueden ser excretadas por las bacterias, interceptando así los antibióticos antes de que entren en contacto con las bacterias (21).

#### 5.4.4.2 Enzimas inactivadoras de antibióticos

Pueden llegar a producirse en gran exceso, alrededor del organismo (p. ej., b-lactamasas de *S. aureus*), o en cantidades limitadas en el espacio periplásmico de algunas bacterias Gram-negativas. El efecto in vivo es similar, pero estos últimos organismos pueden parecer sensibles in vitro. Clásicamente, esto se ve en *Enterobacter spp.* resistente a antibióticos β-lactámicos de espectro extendido como piperacilina y cefotaxima; la exposición del organismo a inductores como penicilina, clavulanato, ciertas cefalosporinas e imipenem puede “activar” la producción de betalactamasas cromosómicas (AmpC).

Las  $\beta$ -lactamasas clásicas TEM (*Escherichia coli*) y SHV (*Klebsiella spp.*) que inactivan la ampicilina, han mostrado una notable capacidad para mutar a formas de espectro extendido (que inactivan la cefoxitina y el cefotetán) y la resistencia a los inhibidores (no inhibidos por el clavulanato o el tazobactam). La cefotaximasa ctx-M surgió por escape del cromosoma de *Kluyvera spp.* y ahora está muy extendida en *Enterobacteriaceae*, incluida *E. coli*. Otras enzimas inactivadoras clásicas incluyen la cloranfenicolacetiltransferasa y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (1).

### **5.5 $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)**

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas versátiles con una gama limitada de estructuras moleculares que se encuentran en una diversidad de fuentes bacterianas. Su característica común es la capacidad de hidrolizar compuestos químicos que contienen un anillo  $\beta$ -lactámico. Se han clasificado bioquímicamente en dos amplias divisiones según el mecanismo por el cual realizan la hidrólisis, ya sea a través de la formación de una enzima acilo con una serina en el sitio activo o mediante una reacción hidrolítica y una reacción facilitada por uno o dos iones esenciales de zinc en los sitios activos de las metalo-  $\beta$ -lactamasas (22).

Las  $\beta$ -lactamasas se describieron por primera vez a principios de la década de 1940, un año antes de que la penicilina se introdujera en el mercado, sin embargo, existe evidencia de su existencia durante millones de años. Las infecciones causadas por *S. aureus* resistente a la penicilina se volvieron clínicamente relevantes después de que la penicilina estuvo ampliamente disponible y se descubrió que el mecanismo de resistencia era una penicilinasas codificada por un plásmido que se transmitía fácilmente entre las cepas de *S. aureus*, lo que resultó en una rápida diseminación del rasgo de resistencia. Para superar este problema, se fabricaron nuevos compuestos  $\beta$ -lactámicos con un espectro de actividad más amplio y menos susceptibilidad a las penicilinasas (como la ampicilina). Sin embargo, durante la década de 1960 se encontró entre los gram negativos una nueva  $\beta$ -lactamasa codificada por plásmido capaz de hidrolizar la ampicilina (denominada TEM-1 por el nombre del paciente en el que se encontró originalmente).

A partir de entonces, el desarrollo de nuevas generaciones de  $\beta$ -lactámicos ha sido seguido sistemáticamente por la rápida aparición de enzimas capaces de destruir

cualquier compuesto novedoso que llega al mercado, en un proceso que es un excelente ejemplo de evolución bacteriana adaptativa impulsada por antibióticos. Los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas generalmente se denominan “bla”, seguidos del nombre de la enzima específica (p. ej., blaKPC) y se han encontrado en el cromosoma o localizados en MGE como parte del genoma accesorio. Estos genes también se pueden encontrar formando parte de integrones, situación que facilita su diseminación. En cuanto a su expresión, la transcripción de estos genes puede ser constitutiva o puede requerir una señal externa para inducir su producción (20).

### 5.5.1 Clasificación

Los primeros esquemas de clasificación se basaban en las tasas de hidrólisis relativas de las penicilinas y las primeras cefalosporinas, junto con la respuesta enzimática a los agentes modificadores de proteínas. A medida que se introdujeron sustratos e inhibidores adicionales en la práctica clínica y la secuenciación de genes se volvió económica y rutinaria, las características tanto moleculares como funcionales se combinaron en un esquema de clasificación más completo.

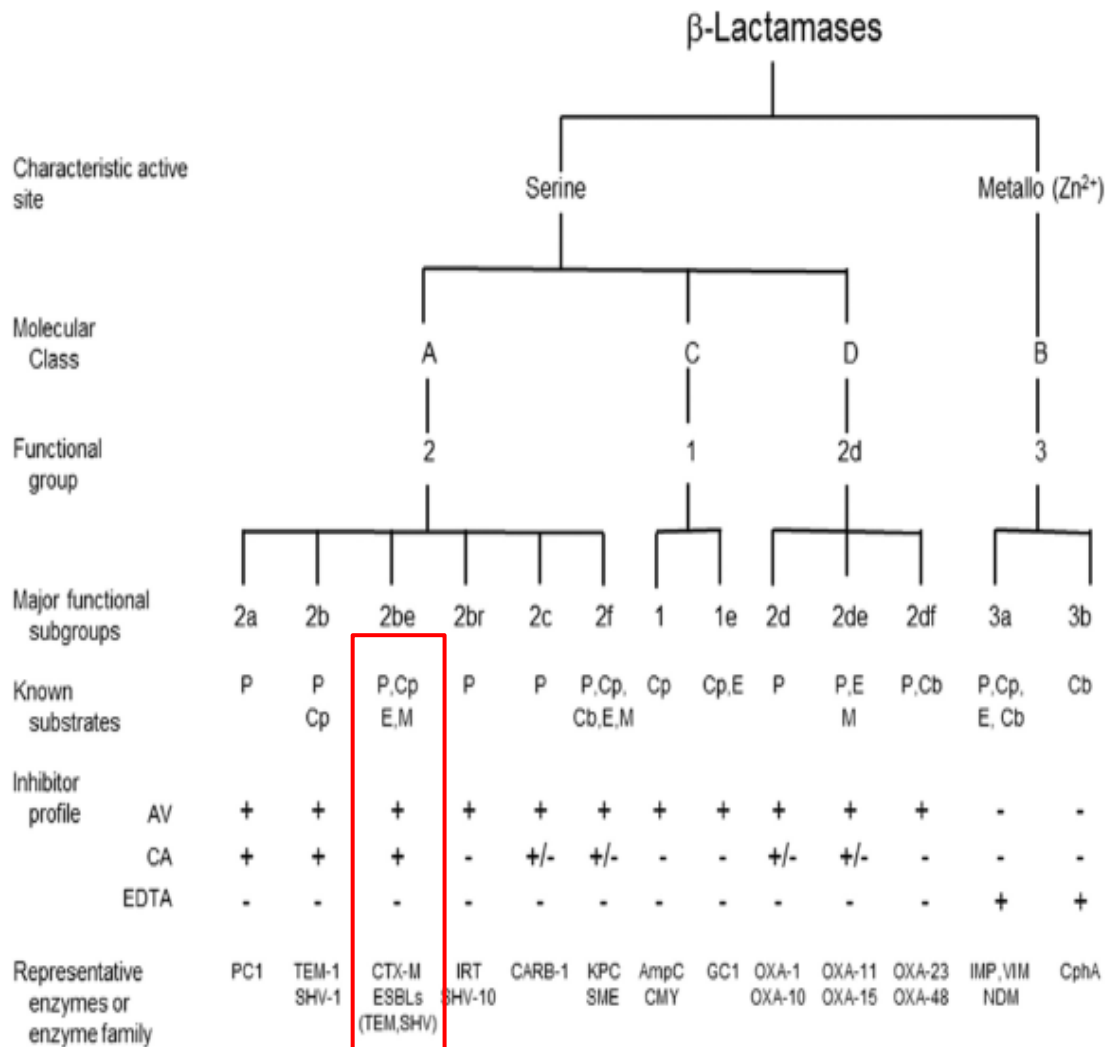
En la actualidad, se han distinguido al menos 17 grupos funcionales asociados con las cuatro clases moleculares. Las enzimas todavía se diferencian con respecto a la hidrólisis relativa de los sustratos de  $\beta$ -lactámicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (22).

Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican utilizando esquemas basados en la función (el sistema de Bush-Jacoby-Medeiros) o la estructura (clasificación de Ambler), pero en general se dividen ampliamente en enzimas con un sitio activo de serina y aquellas que requieren un cofactor de iones metálicos.

El esquema de clasificación de Ambler divide las  $\beta$ -lactamasas en cuatro grupos: las enzimas de clase A, C y D son proteínas con un residuo de serina en sus sitios activos y las proteínas de clase B son metaloenzimas dependientes de zinc. Algunas proteínas de clase A funcionan como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y como carbapenemasas. Las metaloenzimas de clase B que hidrolizan los carbapenémicos son susceptibles de inhibición por EDTA, mientras que no son susceptibles de inhibición por clavulanato (un inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa). AmpC, una enzima inducible y generalmente cromosómica

que se encuentra en muchas especies de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, es la enzima clase C prototipo. Informes recientes han descrito genes *ampC* transmitidos por plásmidos que pueden transferirse entre *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Salmonella spp.* Las enzimas de clase D se han encontrado solo en unas pocas especies, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y *Aeromonas spp.* (18).

Se reconocen cuatro grupos principales de enzimas. Los grupos 1, 2 y 4 son ser- $\beta$ -lactamasas, mientras que los miembros del grupo 3 son metalo- $\beta$ -lactamasas. El grupo 1 está compuesto por cefalosporinasas que son poco inhibidas por el ácido clavulánico, inhibidor de la lactamasa  $\beta$ ; el grupo 2 está compuesto por penicilinasas sensibles al ácido clavulánico e incluye las denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE); y el grupo 4 está compuesto por lactamasas que son poco inactivadas por el ácido clavulánico y no encajan en las otras categorías. Las Ser- $\beta$ -lactamasas actúan a través de un mecanismo catalítico covalente que recuerda a las proteinasas y esterasas de Ser, donde un sitio activo de Ser realiza un ataque nucleofílico de apertura de anillo en el anillo de lactama. A esto le sigue luego la escisión hidrolítica del intermedio enzimático covalente. Este mecanismo es paralelo a la inactivación por  $\beta$ -lactámicos de las transpeptidasas de peptidoglicano bacterianas extracelulares, que son los objetivos de estos antibióticos en los que el fármaco modifica covalentemente un sitio activo Ser. Sin embargo, en este caso, la configuración del sitio activo de estas transpeptidasas no permite el fácil acceso del agua para completar la segunda mitad de la reacción de la lactamasa y, por lo tanto, el intermedio acil-enzima es un complejo sin salida que da como resultado la titulación enzimática y el consiguiente deterioro de la síntesis de la pared celular. La similitud en el mecanismo entre las peptidasas de peptidoglucano y las Ser-h-lactamasas también se extiende a su estructura tridimensional y se ha especulado que están vinculadas evolutivamente. Las metalo- $\beta$ -lactamasas son miembros de la Zn-lactamasas, la familia más amplia de hidrolasas dependientes y alguna vez se pensó que tenían una importancia clínica mínima, aunque han surgido durante la última década como causas importantes de resistencia a los carbapenémicos en bacterias Gram-negativas (21).



**Figura 3.** Relaciones moleculares y funcionales entre β-lactamasas. AV, Avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, carbapenem; Cp, cefalosporina; E, cefalosporina de espectro expandido; M, monobacta; P, penicilina. Tomado de Bush K. Past and present perspectives on β-lactamasas. 2018.

El primer informe de una enzima hidrolizante de β-lactámicos de origen natural en *E. coli* se publicó incluso antes de que se comercializara el uso de la penicilina. En 1960, la β-lactamasa mediada por plásmido blaTEM se informó por primera vez en Grecia. Posteriormente, se identificaron otros tipos transmisibles de β-lactamasas, por ejemplo, blaSHV-1. Estas β-lactamasas confieren resistencia a las penicilinas y las cefalosporinas de espectro reducido, pero no a las penicilinas o cefalosporinas de espectro extendido.

Poco después, se generalizaron los nuevos agentes  $\beta$ -lactámicos de espectro más amplio (p. ej., cefalosporinas con cadena lateral oximino, cefamicinas, carbapenémicos y monobactámicos). Posteriormente, pronto comenzaron a surgir nuevas familias de  $\beta$ -lactamasas. Uno de los grupos de este tipo de enzimas con mayor “éxito” epidemiológico es el de las lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE son serina  $\beta$ -lactamasas, caracterizadas según su clasificación de Ambler bioquímicamente funcional como clase A, y son inhibidos por inactivadores de  $\beta$ -lactamasa, como clavulanato o tazobactam. Esta característica constituye la base para el diagnóstico fenotípico de bacterias productoras de BLEE en muchos laboratorios, midiendo el halo de inhibición de los aislados en presencia y ausencia de inhibidor de  $\beta$ -lactamasa (BLI; es decir, el “test de BLEE”). Según la clasificación funcional Bush-Jacoby-Medeiros, las BLEE se clasifican en el grupo 2be.

Aunque las *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE hidrolizan penicilinas, cefalosporinas (excluidas las cefamicinas) y monobactámicos, su grado de actividad hidrolítica puede variar mucho. Este grado variable de actividad hidrolítica da como resultado tanto desafíos diagnósticos como controversias relacionadas con la eficacia del tratamiento de agentes para los cuales los aislamientos supuestamente son "susceptibles" (23).

Según la clasificación de Ambler, más de 1800 variantes descritas se clasifican en cuatro tipos de  $\beta$ -lactamasas según la secuencia de proteínas: A (serina penicilinasas), B (metalo- $\beta$ -lactamasas), C (cefalosporinasas) o D (oxacilinasas); que muestran resistencia a la penicilina, la mayoría de los betalactámicos, las cefalosporinas y la cloxacilina, respectivamente. Estas variantes también se pueden clasificar en función de sus perfiles fenotípicos Bush y Jacoby (2010); sin embargo, en su mayoría se sigue la clasificación de Ambler. La clase A y la clase D consisten en BLEE y se componen principalmente de enzimas CTX-M, TEM, SHV y OXA; Las  $\beta$ -lactamasas de clase B consisten en metalo- $\beta$ -lactamasas (NDM-1), mientras que la clase C contiene  $\beta$ -lactamasas AmpC. Muchos genes productores de  $\beta$ -lactamasas con estos mecanismos también son responsables de la resistencia contra diferentes clases de antibióticos, como aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas. Es bien sabido que la principal resistencia microbiana se

debe a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), betalactamasas AmpC y carbapenemasas. En todas las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y aztreonam, el anillo betalactámico es hidrolizado por las  $\beta$ -lactamasas, mientras que la mayoría de las cefalosporinas de cuarta generación también se ven afectadas por la BLEE (24).

### 5.5.2 Clasificación de las BLEE

Las BLEE son un grupo de enzimas que descomponen los antibióticos que pertenecen a los grupos de las penicilinas, las cefalosporinas, en general todos los antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos y los vuelven ineficaces.

Las BLEE se han definido generalmente como  $\beta$ -lactamasas transmisibles que pueden ser inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam, y que están codificadas por genes que pueden intercambiarse entre bacterias. La variante genética actualmente más común de BLEE es CTX-M (4).

#### 5.5.2.1 Tipo SHV

La familia SHV de  $\beta$ -lactamasas parece derivar de *Klebsiella spp.* El progenitor de la clase de enzimas SHV, SHV-1, se encuentra universalmente en *K. pneumoniae*. En muchas cepas de *K. pneumoniae*, el gen que codifica SHV-1, o su aparente precursor, LEN-1, también reside dentro del cromosoma bacteriano; puede ser que el gen de SHV-1 $\beta$ -lactamasa haya evolucionado como un gen cromosómico en *Klebsiella* y luego se incorporó a un plásmido que se ha propagado a otras especies de enterobacterias. El SHV-1 confiere resistencia a las penicilinas de amplio espectro como la ampicilina, la tigeciclina y la piperacilina, pero no a las cefalosporinas sustituidas con oxiiimino. La SHV-1 $\beta$ -lactamasa es responsable de hasta el 20% de la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos en especies de *K. pneumoniae*. (4).

#### 5.5.2.2 Tipo de TEM

TEM-1, reportado por primera vez a partir de un aislado de *E. coli* en 1965, tiene perfiles de sustrato e inhibición similares a los de SHV-1. TEM-1 es capaz de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera generación, pero es incapaz de atacar a la oxiiimino

cefalosporina. La primera variante de TEM con mayor actividad contra las cefalosporinas de espectro extendido fue TEM-3. TEM-2, el primer derivado de TEM-1, tenía una sustitución de un solo aminoácido de la  $\beta$ -lactamasa original. Esto provocó un cambio en el punto isoeléctrico de un pI de 5,4 a 5,6, pero no cambió el perfil del sustrato. TEM-3, reportada originalmente en 1989, fue la primera  $\beta$ -lactamasa de tipo TEM que mostró el fenotipo BLEE. En retrospectiva, es posible que TEM-3 no haya sido la primera BLEE de tipo TEM. *Klebsiella oxytoca*, que alberga un plásmido portador de un gen que codifica la resistencia a la ceftazidima, se aisló por primera vez en Liverpool, Inglaterra, en 1982. La  $\beta$ -lactamasa responsable fue lo que ahora se llama TEM-12. Curiosamente, la cepa procedía de una unidad neonatal que había sido atacada por un brote de *K. oxytoca* que producía TEM-1. Este es un buen ejemplo de la aparición de BLEE como respuesta a la presión selectiva inducida por las cefalosporinas de espectro extendido (4).

#### 5.5.2.3 Tipo CTX

Ha surgido una nueva familia de  $\beta$ -lactamasas que hidroliza preferentemente a la cefotaxima. Se ha encontrado en aislamientos de *Salmonella enterica* serovar, *Typhimurium*, *E. coli* principalmente y algunas otras especies de *Enterobacteriaceae*. Estos no están muy relacionados con TEM o SHV $\beta$ -lactamasas. Además de la rápida hidrólisis de la cefotaxima, otra característica única de estas enzimas es que son mejor inhibidas por el inhibidor de  $\beta$ -lactamasa tazobactam que por sulbactam y clavulanato. Las  $\beta$ -lactamasas CTX-M se encuentran exclusivamente en el grupo funcional 2 y se cree que se originan a partir de genes cromosómicos de BLEE que se encuentran en *Kluyvera spp.* un patógeno oportunista de las *Enterobacteriaceae* que se encuentran en el medio ambiente. Las primeras proteínas CTX-M de resistencia a antibióticos y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido se descubrieron a fines de la década de 1980 y en la actualidad se han secuenciado más de 100 variantes. Según sus secuencias de aminoácidos, se pueden dividir en cinco grupos. El origen de las enzimas CTX-M es diferente al de TEM y BLEE SHV (4).

Mientras que SHV-BLEE y TEM-BLEE se generaron mediante sustituciones de aminoácidos de sus enzimas originales, CTX-M BLEE se adquirieron mediante la transferencia horizontal de genes de otras bacterias utilizando aparatos genéticos como plásmidos conjugativos o transposones. Las secuencias de genes que codifican las

enzimas CTX-M muestran una gran similitud con las de las  $\beta$ -lactamasas de la especie *Kluyvera*. Además, las secuencias de genes adyacentes a los genes CTX-M de *Enterobacteriaceae* también son similares a las que rodean los genes de  $\beta$ -lactamasa en los cromosomas de las especies de *Kluyvera*. Los estudios cinéticos han demostrado que las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M hidrolizan la cefalotina o la cefaloridina mejor que la bencilpenicilina y que hidrolizan preferentemente la cefotaxima sobre la ceftazidima. Aunque hay algo de hidrólisis de ceftazidima por estas enzimas, por lo general no es suficiente para proporcionar resistencia clínica a los organismos en los que residen. Se ha sugerido que el residuo de serina en la posición 237, que está presente en todas las enzimas CTX-M, juega un papel importante en la actividad de espectro extendido de las  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M. Aunque se ha demostrado que no es esencial, el residuo Arg-276 se encuentra en una posición equivalente a Arg-244 en las BLEE de tipo TEM o SHV, como sugiere el modelo molecular, y también puede desempeñar un papel en la hidrólisis de oximinocefalosporinas. Datos cristalográficos recientes para la enzima Toho-1 sugirieron que había una mayor flexibilidad de las hebras b3 que interactúan y el bucle x de esta enzima en comparación con otras  $\beta$ -lactamasas de clase A. Además, la falta de enlaces de hidrógeno en la vecindad del xloop podría explicar el fenotipo de espectro extendido (4).

#### 5.5.2.4 Tipo OXA

Las  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA se denominan así debido a su capacidad para hidrolizar la oxacilina. Estas  $\beta$ -lactamasas se caracterizan por tasas de hidrólisis de cloxacilina y oxacilina superiores al 50% de las de la bencilpenicilina. Ocurren predominantemente en *P. aeruginosa*, pero se han detectado en muchas otras bacterias Gram negativas. De hecho, la  $\beta$ -lactamasa de tipo OXA más común, OXA-1, se ha encontrado en 1 a 10% de los aislados de *E. coli*. Las BLEE de tipo OXA se descubrieron originalmente en aislamientos de *P. aeruginosa* de un solo hospital en Ankara, Turquía. En Francia, se encontró un nuevo derivado de OXA-10 (numerado OXA-28) en un aislado de *P. aeruginosa*. Una nueva BLEE (OXA-18) y un derivado de espectro extendido de la  $\beta$ -lactamasa OXA-13 de espectro estrecho (numerada OXA-19) también se han descubierto en Francia en aislamientos de *P. aeruginosa*. La evolución de las  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA de BLEE a partir de enzimas originales con espectros más estrechos tiene muchos

paralelismos con la evolución de las BLEE de tipo SHV y TEM. Lamentablemente, existen muy pocos datos epidemiológicos sobre la propagación geográfica de las BLEE de tipo OXA (4).

#### 5.5.2.5 Tipo POR

Las BLEE de tipo PER comparten solo alrededor del 25-27% de homología con las BLEE conocidas de tipo TEM y SHV. La PER-1b-lactamasa hidroliza eficazmente las penicilinas y las cefalosporinas y es susceptible a la inhibición del ácido clavulánico. PER-1 se detectó por primera vez en *P. aeruginosa*, y más tarde en aislados de *S. enterica* serovar *Typhimurium* y *Acinetobacter*. En Turquía, hasta el 46 % de los aislamientos nosocomiales de *Acinetobacter spp.* y se encontró que el 11% de *P. aeruginosa* produce PER-1. PER-2, que comparte un 86 % de homología con PER-1, se ha detectado en *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Vibrio cholerae* O1 El Tor (4).

#### 5.5.2.6 Tipo GES

GES-1 se describió inicialmente en un aislado de *K. pneumoniae* de un paciente recién nacido recién trasladado a Francia desde la Guayana Francesa. GES-1 tiene actividad hidrolítica contra penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido, pero no contra cefamicinas o carbapenémicos, y es inhibido por inhibidores de b-lactamasas. Estas propiedades enzimáticas se asemejan a las de otras BLEE de clase A; por lo tanto, GES-1 fue reconocido como miembro de BLEE (4).

#### 5.5.2.7 VEB-1, BES-1 y otro tipo BLEE

También se han descrito otras enzimas inusuales que tienen BLEE (por ejemplo, BES-1, CME-1, VE-B-1, PER, SFO-1 y GES-1). Estas nuevas enzimas se encuentran con poca frecuencia, los detalles de estas enzimas se revisan en otra parte.

### 5.5.3 Detección

La observación de organismos que albergan BLEE proporciona información útil a los profesionales de la salud, puesto que algunos pacientes que presentan infecciones con este tipo de bacterias, a menudo son difíciles de tratar. En la mayoría de los casos los tratamientos de infecciones causadas por organismos productores de BLEE con cefalosporinas de espectro extendido o aztreonam puede resultar en el fracaso, incluso cuando los organismos causantes parecen ser susceptibles a estos agentes mediante

pruebas de susceptibilidad de rutina. Además, los pacientes colonizados o infectados con organismos productores de BLEE deben tomar precauciones de contacto para evitar la transmisión hospitalaria. Estos casos específicos requieren la detección de organismos productores de BLEE en laboratorios clínicos especializados.

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de EE. UU. (CLSI) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) ha logrado la revisión de los puntos de corte específicos para la detección de bacterias productoras de BLEE (4).

Las directrices aprobadas por el CLSI y el EUCAST se utilizan para interpretar la susceptibilidad bacteriana, la resistencia y los puntos de corte. Estas reglas definen qué acciones se deben tomar para reducir los errores después de recibir resultados específicos de susceptibilidad antimicrobiana (25).

#### 5.5.4. Detección fenotípica

La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE han sido diseñados para Enterobacterias y se fundamentan en el carácter inhibible de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Existen también otros métodos basados en bioensayos, en el análisis del perfil de substrato o en técnicas moleculares, aunque son más propios para su caracterización. Cualquier método elegido debe ir precedido de un riguroso análisis del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos, con los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma, que permita detectar fenotipos compatibles con la presencia de BLEE (26).

La estrategia estándar para detectar BLEE y otras  $\beta$ -lactamasas consta de dos etapas:

- 1) detección de resistencia a una o más oximiinocefalosporinas
- 2) confirmación de BLEE, AmpC u otra producción de enzimas.

La susceptibilidad o resistencia de las bacterias a diversos compuestos antimicrobianos puede determinarse utilizando métodos de dilución en caldo, difusión en disco, pruebas de tira MIC, medios de cultivo cromogénicos o sistemas automatizados.

El método de difusión en disco de Kirby-Bauer es un método estandarizado para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (25).

Este método es de los más difundido en los laboratorios clínicos, también se le conoce como de aproximación de discos, de doble difusión con discos o método de Jarlier, quien lo describió por primera vez en 1988 (26).

El microorganismo patógeno se cultiva en placas con agar Mueller-Hinton en presencia de varios discos de papel de filtro impregnados con antimicrobianos (25).

Consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros discos con cefalosporinas, por ejemplo: ceftazima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg). La confirmación de la producción de BLEE se basa en la sinergia entre las oximiino-cefalosporinas y el ácido clavulánico.

La presencia o ausencia de zonas de inhibición es una medida indirecta de la capacidad del compuesto para inhibir ese microorganismo (26).

La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de BLEE. Si se observa un “aumento” de la zona de inhibición entre la cefalosporina y los discos de clavulánico, se predice la producción de BLEE. Este fenómeno suele denominarse “cola de pescado” “corcho de champán”, “ojo de cerradura”, “puntos suspensivos” o “imagen fantasma”.

Se recomienda la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer para todas las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* a fin de verificar la susceptibilidad a cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ) (o cefpodoxima) y para detectar cepas productoras de BLEE.

Igualmente, el método es adecuado para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de carácter primario y, de acuerdo con los puntos de corte clínicos proporcionados por EUCAST o CLSI, las bacterias pueden dividirse en tres grupos: susceptibles, intermedias y resistentes a diferentes antibióticos, esto dependerá de la medida del diámetro creado por el halo de inhibición (CLSI, 2012; EUCAST, 2013). Se encontró que la prueba de difusión de disco para BLEE tiene sensibilidades muy altas (96 %) al probar cefotaxima, cefepima y ceftazidima, cefpodoxima o aztreonam en comparación con otros métodos como Vitek2 y ESBL Etes (25).

Esta prueba ha sufrido diferentes modificaciones para aumentar su eficiencia entre ellas, la reducción de la distancia entre los discos (a 20 mm), la utilización de un inóculo algo más elevado que el habitual en las pruebas de difusión y la utilización de cefaloporinas de cuarta generación, esencialmente la cefepima. Con ello se facilita la detección de cepas con BLEE con poca eficiencia hidrolítica y, por lo tanto, con halos de inhibición poco afectados, así como de microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasa AmpC (*Enterobacter cloacae*, *E.aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*) que podrían enmascarar su presencia (26).

Las pruebas confirmatorias fenotípicas para BLEE, como el método de sinergia de doble disco (DDSM), la prueba de sinergia de cuatro discos, el método de difusión de disco combinado (CDDM) y la prueba de gradiente (prueba ESBLE y método de microdilución en caldo), se han aplicado durante más de 25 años. Cabe señalar que la BLEE se pudo identificar en casi el 100% de todos los casos mediante el uso de una segunda prueba confirmatoria (25).

#### 5.5.5. Detección genotípica

La determinación de si una BLEE específica está presente en un aislado clínico es relacionada con las enzimas TEM y SHV es un proceso complicado porque las mutaciones puntuales alrededor de los sitios activos de las secuencias TEM y SHV han llevado a cambios de aminoácidos que aumentan el espectro de actividad de las enzimas parentales, como en TEM1, TEM2 y SHV1. El método molecular comúnmente utilizado es la amplificación por PCR de los genes blaTEM y blaSHV con cebadores de oligonucleótidos, seguida de secuenciación. La secuenciación es esencial para discriminar entre las enzimas parentales no BLEE (p. ej., TEM1, TEM2 o SHV1) y las diferentes variantes de BLEE TEM o SHV (p. ej., TEM3, SHV2, etc.). Productos sin secuenciación, en un aislado que produce una BLEE, por lo general proporciona evidencia suficiente de que el gen blaCTX-M es responsable de este fenotipo. Esto es diferente a los tipos de BLEE TEM y SHV. Varios estudios recientes han descrito varios enfoques moleculares para la detección rápida de organismos positivos para BLEE en busca de la presencia de diferentes genes blaCTX-M. Esto involucró un ensayo de PCR que usó cuatro conjuntos de cebadores para amplificar genes de CTX-M-lactamasa específicos de grupo, amplificación de un fragmento de ADN universal específico para la

mayoría de los diferentes grupos de CTX-M $\beta$ -lactamasas, PCR dúplex, PCR multiplex, PCR en tiempo real, pirosecuenciación e hibridación de línea. Sin duda, las técnicas moleculares tienen el potencial de desempeñar un papel esencial en el entorno de laboratorio para la detección, el seguimiento y la monitorización de la propagación de un gran número de organismos que producen enzimas CTX-M en entornos comunitarios y hospitalarios en tiempo real (4).

La transposición de un solo nucleótido en los genes que codifican la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas puede generar resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido porque estos genes están relacionados con SHV-1, TEM-1 y TEM-2. Muchos aislados de gramnegativos muestran resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos por hidrólisis porque contienen BLEE; por lo tanto, se reduce la eficacia de esos antibióticos para enfermedades desarrolladas por estas bacterias. Además, los plásmidos que albergan genes BLEE a menudo contienen genes que desarrollan resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol y aminoglucósidos, principalmente debido a la resistencia provocada por plásmidos a cefalosporina. Existe una clara relación entre la producción de BLEE y la resistencia a las quinolonas en ausencia de una reducción de la susceptibilidad a las quinolonas mediada por plásmidos. Los estudios epidemiológicos encontraron que Asia tiene la mayor prevalencia de enzimas BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli*; China ocupa la primera posición en *E. coli* productora de BLEE.

#### 5.5.6 Otras BLEE

Las BLEEs raras, por ejemplo, IBC-1, TLA-1, BES-1 y SFO-1, solo se han identificado en algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Otras BLEE se estudian principalmente en *P. aeruginosa* de diferentes territorios pequeños. Su mecanismo multifactorial de resistencia (transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos, pérdida de porina, presión selectiva de carbapenem, bombas de expulsión) y las cepas mostraron resistencia a muchos antibióticos, incluidos piperacilina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam y gentamicina. La co-presencia de genes BLEE en el mismo plásmido constituye una amenaza significativa de transferencia a otras especies (24).

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Aislamiento bacteriano**

El aislamiento de las cepas de enterobacterias se llevó a cabo a partir de Julio de 2018 a enero de 2019. Se realizó la toma de muestra vía rectal con hisopos estériles individuales a felinos domésticos. Como criterio de inclusión para pertenecer a este estudio los pacientes debían presentar un adecuado estado de salud y no manifestar signos clínicos de enfermedad, ni alguna alteración entérica. El transporte de muestras se realizó en tubos individuales de 13 x 100 mm con 5ml de medio líquido de peptona de caseína adicionado con Vancomicina a 20 µg por litro como antibiótico. Cuando fue necesario su almacenamiento se hizo en condiciones de refrigeración (4° C), de lo contrario el sembrado de las muestras se realizó de manera inmediata.

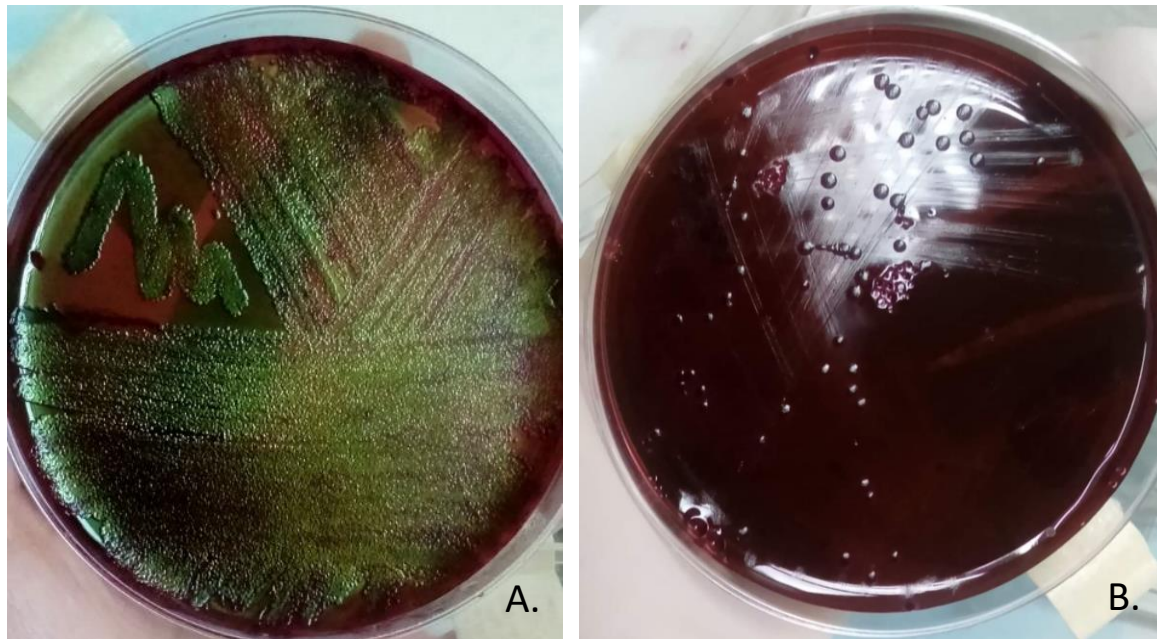
### **6.2 Sembrado de muestras**

El cultivo de las muestras obtenidas de los pacientes felinos se realizó en un medio estéril con ayuda de dos mecheros de Fisher, un asa bacteriológica promedio no desechable y como técnica de sembrado se empleó la estría cruzada. Los agares se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante, todo el proceso se realizó dentro de las instalaciones del laboratorio de microbiología del Hospital Veterinario para pequeñas especies de la BUAP. El sembrado se efectuó primeramente en placas Petri con medio EMB adicionado con un antimicrobiano, en este caso se eligió cefotaxima a 2 µg por litro. Con el propósito de crear un criterio de exclusión para el desarrollo de las bacterias, cuya característica sea proliferar en un medio con cualidades que inhabilitan el crecimiento, lo cual nos indica que posiblemente se trate de una bacteria resistente, debido a que a pesar de la cantidad de antibiótico en el medio de cultivo la bacteria será capaz de crecer después de 24 horas de incubación a 37°C.

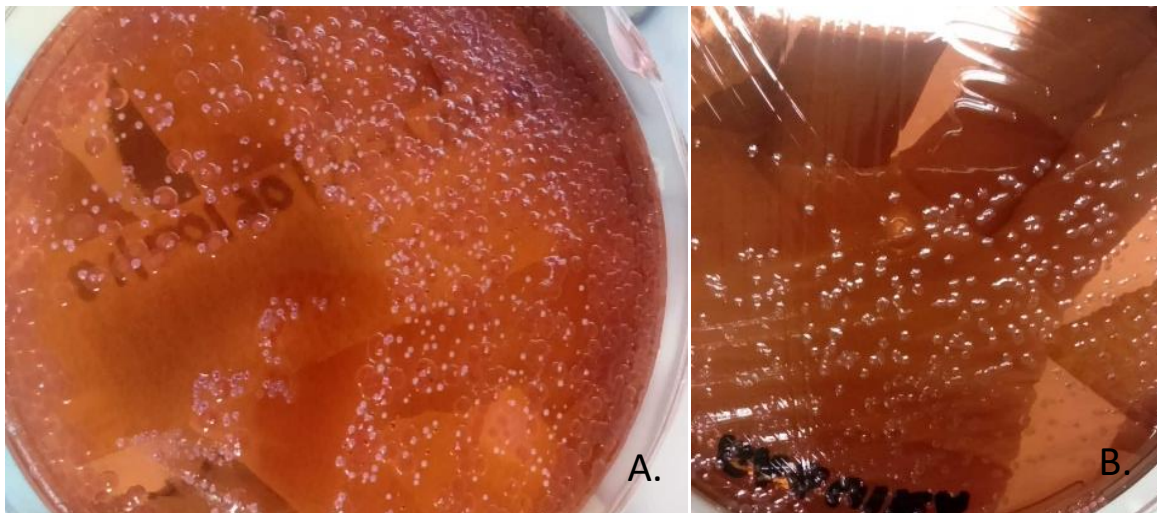


**Figura 4.** Equipo utilizado durante el procesamiento de muestras.

A. Incubadora. B. Mechero de Fisher. C. Autoclave.



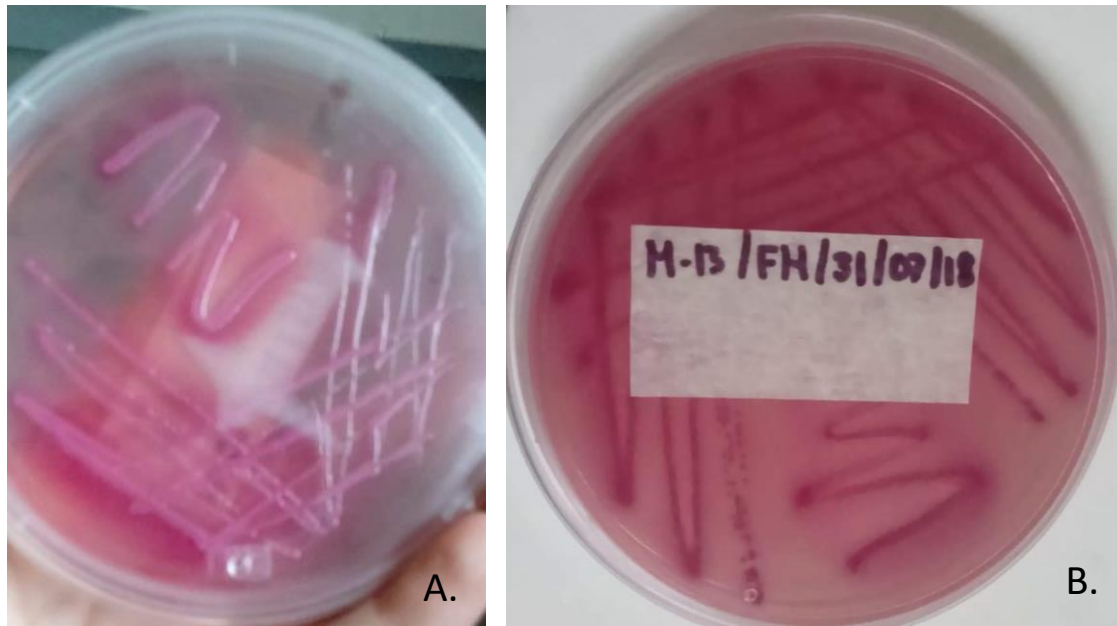
**Figura 5.** A. Cepa de *E. coli* sembrada en Agar EMB. B. Cepa de *Klebsiella* sembrada en Agar EMB a las 24 horas posteriores a la incubación.



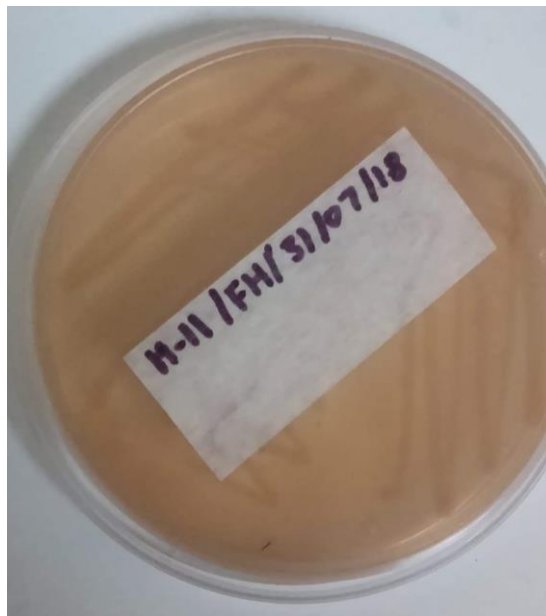
**Figura 6.** A y B. Muestras provenientes de pacientes felinos, sembradas en Agar EMB positivas al crecimiento después de 24 horas de incubación.

Una vez que la muestra se desarrolló, las cepas se cultivaron nuevamente, esta vez en un medio MacConkey, debido a que este medio es tanto selectivo como diferencial, ya que contiene sales biliares y cristal de color violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y selecciona bacterias gramnegativas. También contiene lactosa, que

permite la diferenciación de bacterias gramnegativas en función de su capacidad para fermentar este carbohidrato. Los organismos que fermentan lactosa producen ácidos que reaccionan con el indicador de pH rojo neutro y producen un color rosado. Por lo tanto, tiene la función de ser una primera prueba bioquímica que contribuye a la identificación de la bacteria aislada.



**Figura 7.** A y B. Muestras en Agar MacConkey, positivas a la fermentación de Lactosa.



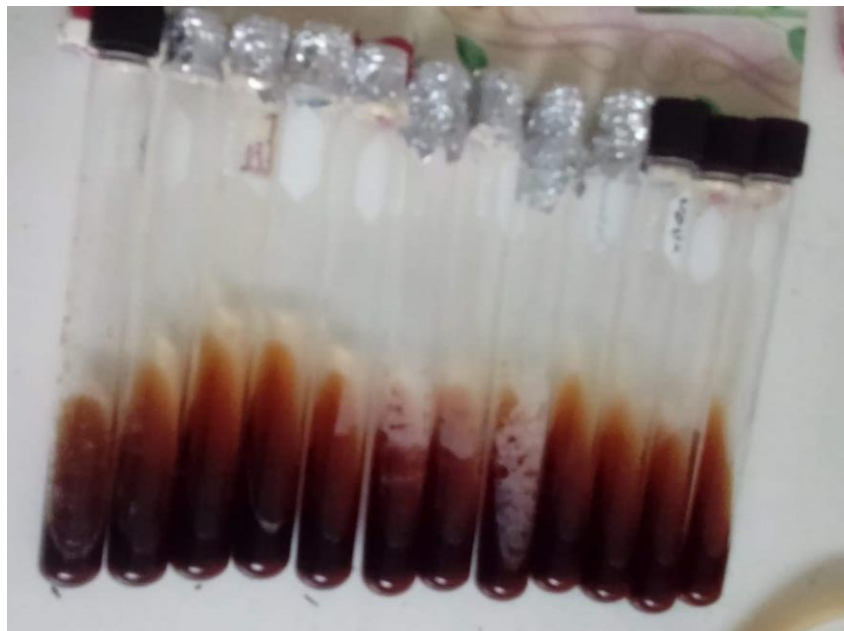
**Figura 8.** Muestra M-11 sembrada en Agar TSA para su conservación.

### 6.3 Identificación de especie

Se obtuvieron colonias de un medio TSA previamente seleccionadas y aisladas, todas las muestras fueron revisadas, asegurándose de que no presentaran alguna característica que indique se encuentran diferentes tipos de cepas en una sola placa, para garantizar que las muestras a procesar pertenezcan a un cultivo puro y sin contaminantes.

Se realizaron pruebas bioquímicas estándares para la identificación de las cepas aisladas: MIO (prueba Indol, Ornitina y Movilidad), LIA (Agar Hiero Lisina), Citrato de Simmons, TSI (Agar Hierro Triple Azúcar), MRVP (prueba rojo de metilo y Voges Proskauer), Fenilalanina y Urea.

La serie tradicional de pruebas bioquímicas se preparó de la manera rutinaria, utilizando tubos de ensayo de 13 x 100 mm con 5 ml de medio en cada tubo y dejando solidificar con pico de flauta los medios sólidos y sin pico de flauta en los medios líquidos. Todos los medios se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante.



**Figura 9.** Tubos para prueba bioquímica, agar TSI sin inocular.

En cada caso se eligió una colonia aislada para inocular los medios de las series estándares. Los tubos inoculados se incubaron por 48 horas.

Para la prueba de Indol se precisó el uso de 5 gotas de reactivo de Kovac para el medio MIO y 5 gotas de rojo de metilo para el medio MRVP. Posteriormente se observaron los resultados.



**Figura 10.** A. Set de pruebas bioquímicas en incubación. B. Medio LIA con aparente crecimiento. C. Medio LIA con reacción positiva. D. Prueba positiva en medio Citrato de Simmons. E. Prueba INDOL negativa. F. Prueba INDOL positiva.

#### **6.4 Prueba de sensibilidad antibiótica**

Nuevamente se sembraron las cepas resultantes en medio TSA, cada cepa aislada se cultivó por duplicado para la realización de los antibiogramas y esta vez en lugar de usar el método de estría cruzada todas las muestras se sembraron por medio de estriado masivo.

#### **6.5 Preparación de los inóculos e inoculación de medios**

Una vez listos los cultivos después de 24 horas de incubación, se prepararon los inóculos, para los cuales fueron necesarios 50 tubos de vidrio con 5 ml de agua destilada estéril, y con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una cantidad abundante de colonia de cada una de las muestras y se depositó en un tubo con agua estéril, se mezcló con ayuda de un Vortex para homogenizar perfectamente la muestra.



**Figura 11.** Patrón de turbidez de McFarland.

Cada tubo se comparó con el patrón de turbidez de McFarland y también con ayuda de una hoja de papel rayada para aseverar que todas las muestras contengan la misma cantidad de muestra. Una vez que fue verificada esa parte, se tomó un hisopo individual

estéril y se sumergió en cada uno de los tubos ya preparados para tomar una pequeña muestra de inóculo y en 2 placas preparadas con Agar Müller Hinton. Se procedió a realizar un estriado masivo en 3 puntos diferentes, esto se realizó 3 veces en cada una de las placas, todo esto en condiciones de esterilidad con ayuda de los mecheros.

Posteriormente se requirió el uso de unas pinzas de metal y un recipiente con alcohol para poder tomar los discos de antibióticos sin contaminar la placa, se empapó la punta de las pinzas y se pasó por la flama del mechero para esterilizar. Cada placa ya preparada con los inóculos fueron colocadas y ordenadas de manera que su identificación fuera posible, los discos de antibióticos (Amikacina 30 µg, Amoxicilina 20 µg + ácido clavulánico 10 µg, Aztreonam 30 µg, Cefepime 30 µg, Ceftazidime 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Ceftriaxona 30 µg, Ciprofloxacino 5 µg, Gentamicina 10 µg, Imipenem 10 µg, Meropenem 10 µg, Tetraciclina 30 µg, Trimetoprima+Sulfametoxazol 23.7/1.25 µg) fueron dispuestos en placas de vidrio estériles para facilitar su manipulación; una vez esterilizada la pinza se tomó un disco de cada antibiótico y se colocó siguiendo un patrón a elección para permitir la lectura posterior.

Cada set de discos fue colocado en placas por duplicado es decir por cada muestra se utilizaron 4 placas de agar Müller Hinton, debido a que el número de antimicrobianos a examinar excedía el espacio delimitado por cada placa, para cada set se ocuparon 2 placas por duplicado, es decir, 4 por cada muestra. Todo se realizó con sumo cuidado y precaución con la finalidad de corroborar resultados en el crecimiento y desarrollo en un tiempo posterior a las 24 horas de incubación.

De inmediato después de haber cumplido estrictamente con el tiempo, se midió el diámetro del halo de inhibición resultante de cada uno de los discos y el resultado fue registrado para su correspondiente interpretación.

## VII. RESULTADOS

Se tomaron un total de 75 muestras de pacientes felinos que se presentaron a consulta en el Hospital Veterinario para pequeñas especies de la BUAP, con un rango de edad de un mes y medio a 12 años, con un promedio de 2 años, es decir gatos adultos jóvenes en su mayoría.

**Tabla 1. Tabla de datos de muestras positivas a crecimiento desde el sembrado en Agar EMB hasta la conservación en Agar TSA.**

No. De ID	DATOS	Edad	Fecha de sembrado	Crecimiento
M-01	FELINO HEMBRA	8 AÑOS	06/08/2018	L+
M-09	FELINO MACHO	4 AÑOS	28/08/2018	L+
M-11	FELINO HEMBRA	4 AÑOS	11/08/2018	L- Swarming
M-13	FELINO HEMBRA	3 AÑOS	06/08/2018	L+
M-17	FELINO HEMBRA	5 AÑOS	10/08/2018	L-
M-18	FELINO MACHO	2 AÑOS	10/08/2018	L+
M-19	FELINO MACHO	4 AÑOS	10/08/2018	L+
M-20	FELINO MACHO	2 AÑOS	10/08/2018	L-
M-21	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	10/08/2018	L+
M-22	FELINO MACHO	2 AÑOS	10/08/2018	L-
M-23	FELINO MACHO	2 AÑOS	10/08/2018	L+
M-24	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	10/08/2018	L+
M-27	FELINO MACHO	5 AÑOS	10/08/2018	L+
M-27-2	FELINO MACHO	5 AÑOS	10/08/2018	L+
M-28	FELINO HEMBRA	7 AÑOS	28/08/2018	L+
M-28-2	FELINO HEMBRA	7 AÑOS	28/08/2018	L+

<b>M-29</b>	FELINO MACHO	2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-30</b>	FELINO MACHO	2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-32</b>	FELINO MACHO	5 AÑOS	28/08/2018	L-
<b>M-34</b>	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-34-2</b>	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	28/08/2018	L-
<b>M-37</b>	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-38</b>	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-39</b>	FELINO HEMBRA	7 MESES	28/08/2018	L+
<b>M-40</b>	FELINO MACHO	1 AÑO	28/08/2018	L-
<b>M-41</b>	FELINO HEMBRA	5 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-41-2</b>	FELINO HEMBRA	5 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-42</b>	FELINO MACHO	1 AÑO	28/08/2018	L+
<b>M-43</b>	FELINO MACHO	6 MESES	28/08/2018	L+
<b>M-44</b>	FELINO MACHO	6 MESES	28/08/2018	L+
<b>M-44-2</b>	FELINO MACHO	6 MESES	28/08/2018	L+
<b>M-45</b>	FELINO HEMBRA	12 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-47</b>	FELINO MACHO	1 1/2 MES	28/08/2018	L+
<b>M-48</b>	FELINO MACHO	10 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-50</b>	FELINO MACHO	1 1/2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-50-2</b>	FELINO MACHO	1 1/2 AÑOS	28/08/2018	L-
<b>M-51</b>	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-52</b>	FELINO HEMBRA	11 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-53</b>	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	28/08/2018	L+

<b>M-53-2</b>	FELINO HEMBRA	2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-54</b>	FELINO HEMBRA	1 AÑO	28/08/2018	L+
<b>M-55</b>	FELINO MACHO	5 MESES	28/08/2018	L+
<b>M-56</b>	FELINO HEMBRA	10 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-61</b>	FELINO MACHO	4 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-62</b>	FELINO MACHO	1 1/2 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-64</b>	FELINO MACHO	1 AÑO	28/08/2018	L+
<b>M-67</b>	FELINO MACHO	6 AÑOS	28/08/2018	L+
<b>M-68</b>	FELINO MACHO	1 AÑO	28/08/2018	L+
<b>M-69</b>	FELINO MACHO	6 MESES	28/08/2018	L+
<b>M-71</b>	FELINO MACHO	4 AÑOS	28/08/2018	L+

### 7.1 Identificación de cepas

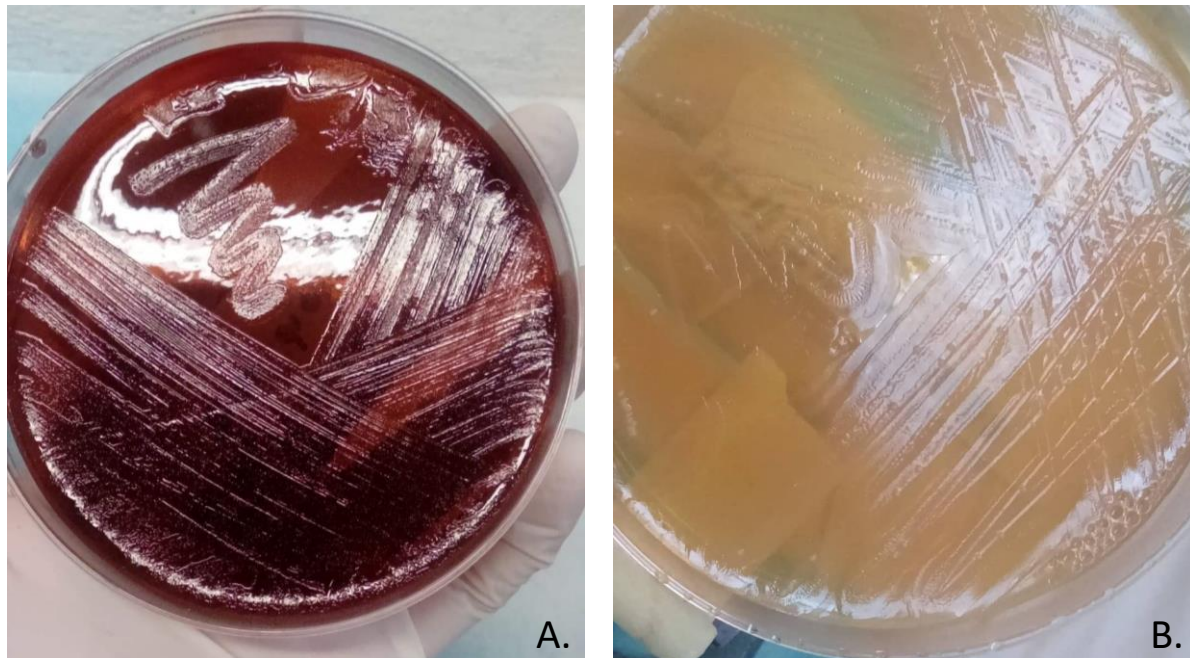
La interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas estándares se realizó mediante la observación de las reacciones y el crecimiento de las colonias en cada una de las pruebas. Posteriormente las muestras identificaron de la siguiente manera:

**Tabla 2. Tabla de bacterias identificadas a partir de los resultados en las pruebas bioquímicas.**

<b>Número de ID</b>	<b>Bacteria identificada</b>
<b>M-01</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-09</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-11</b>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b>M-13</b>	<i>Citrobacter diversus</i>
<b>M-17</b>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b>M-18</b>	<i>Escherichia adecarboxylata</i>
<b>M-19</b>	<i>Citrobacter diversus</i>
<b>M-20</b>	<i>Providencia stuartii</i>
<b>M-21</b>	<i>Klebsiella oxitoca</i>

<b>M-22</b>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b>M-23</b>	<i>Klebsiella oxitoca</i>
<b>M-24</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>M-27</b>	<i>Citrobacter diversus</i>
<b>M-27-2</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-28</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-28-2</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>M-29</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-30</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-32</b>	<i>Escherichia coli inactiva</i>
<b>M-34</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>M-34-2</b>	<i>Serratia marcescens</i>
<b>M-37</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-38</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-39</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>M-40</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-41</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>M-41-2</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-42</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-43</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>M-44</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-44-2</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>M-45</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-47</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-48</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-50</b>	<i>Providencia stuartii</i>
<b>M-50-2</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>M-51</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-52</b>	<i>Serratia odorifera</i>
<b>M-53</b>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>M-53-2</b>	<i>Escherichia adecarboxylata</i>
<b>M-54</b>	<i>Citrobacter diversus</i>
<b>M-55</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-56</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>M-61</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>M-62</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-64</b>	<i>Citrobacter diversus</i>
<b>M-67</b>	<i>Klebsiella oxitoca</i>
<b>M-68</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-69</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>M-71</b>	<i>Escherichia coli</i>

De julio de 2018 a enero de 2019, se aislaron un total de 51 enterobacterias obtenidas de los hisopados rectales de 75 pacientes felinos que se presentaron a consulta en el hospital veterinario de pequeñas especies de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cabe recalcar que los pacientes felinos eran clínicamente sanos, de las cuales el 40% (20/51) se identificaron como *Klebsiella pneumoniae*, el 16% (8/51) corresponden a *E.coli*, el 10% (5/51) a *Citrobacter diversus*, el 10% (5/51) a *Enterobacter aerogenes*, el 6% (3/51) a *Proteus vulgaris*, y el 18% (9/51) a otras enterobacterias.



**Figura 12.** A. Muestra M-11 en Agar EMB se puede apreciar una ligera sombra alrededor de las colonias. B. Muestra M-11 en Agar TSA se observa claramente el desplazamiento de las colonias, fenómeno conocido como Swarming,

## 7.2 Prueba de sensibilidad a antimicrobianos

El método utilizado para la prueba de sensibilidad antibiótica tuvo dos fines. El primero fue identificar a las bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido por medio de la prueba fenotípica de difusión con doble disco, en la cual se detecta la formación de un halo de sinergia entre los diferentes discos de antibióticos pertenecientes al grupo de los betalactámicos (ceftriaxona, cefepime, cefotaxima, aztreonam, ceftazidima) y un disco con amoxicilina/ ácido clavulánico. El segundo objetivo fue el reconocimiento de cepas resistentes a antibióticos mediante la prueba de difusión en

disco a los siguientes grupos de antibióticos: quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y tetraciclinas.

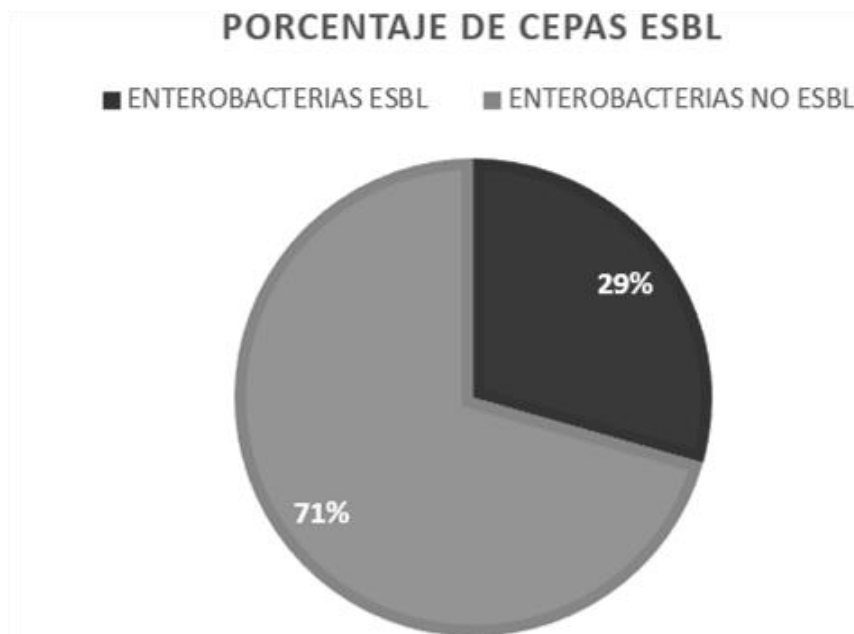
Dichas pruebas, junto con los puntos de corte para cada antibiótico se ejecutaron de acuerdo a los lineamientos del CLSI versión 2019, con los hallazgos correspondientes a la siguiente tabla:

**Tabla 3. Clasificación de acuerdo a los puntos de corte de las cepas aisladas de enterobacterias aisladas en pacientes felinos. Color rojo (Resistencia), color amarillo (Intermedio) y color verde (Susceptibilidad).**

MUESTRAS	CRO	AN	ATM	FEP	CAZ	CTX	AMC	STX	CIP	GM	IMP	MEM	TE
M-01	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Red
M-09	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Yellow	Red	Red	Red	Red
M-11	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
M-13	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green
M-17	Red	Green	Red	Red	Yellow	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red
M-18	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red
M-19	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red
M-20	Red	Green	Red	Yellow	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red
M-21	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Red
M-22	Red	Green	Red	Red	Yellow	Red	Green	Red	Yellow	Red	Green	Green	Red
M-23	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red
M-24	Red	Green	Red	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red
M-27	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red
M-27-2	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	Red
M-28	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red
M-28-2	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red
M-29	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red
M-30	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red
M-32	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Yellow	Yellow	Red
M-34	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red
M-34-2	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red
M-37	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red
M-38	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
M-39	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Yellow
M-40	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow
M-41	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
M-41-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Red
M-42	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Yellow	Red	Yellow	Red	Red
M-43	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Green	Red	Yellow	Red
M-44	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Green	Green	Red
M-44-2	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red
M-45	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Red

M-46													
M-47													
M-48													
M-50													
M-50-2													
M-51													
M-52													
M-53													
M-53-2													
M-54													
M-55													
M-56													
M-61													
M-62													
M-64													
M-67													
M-68													
M-69													
M-71													

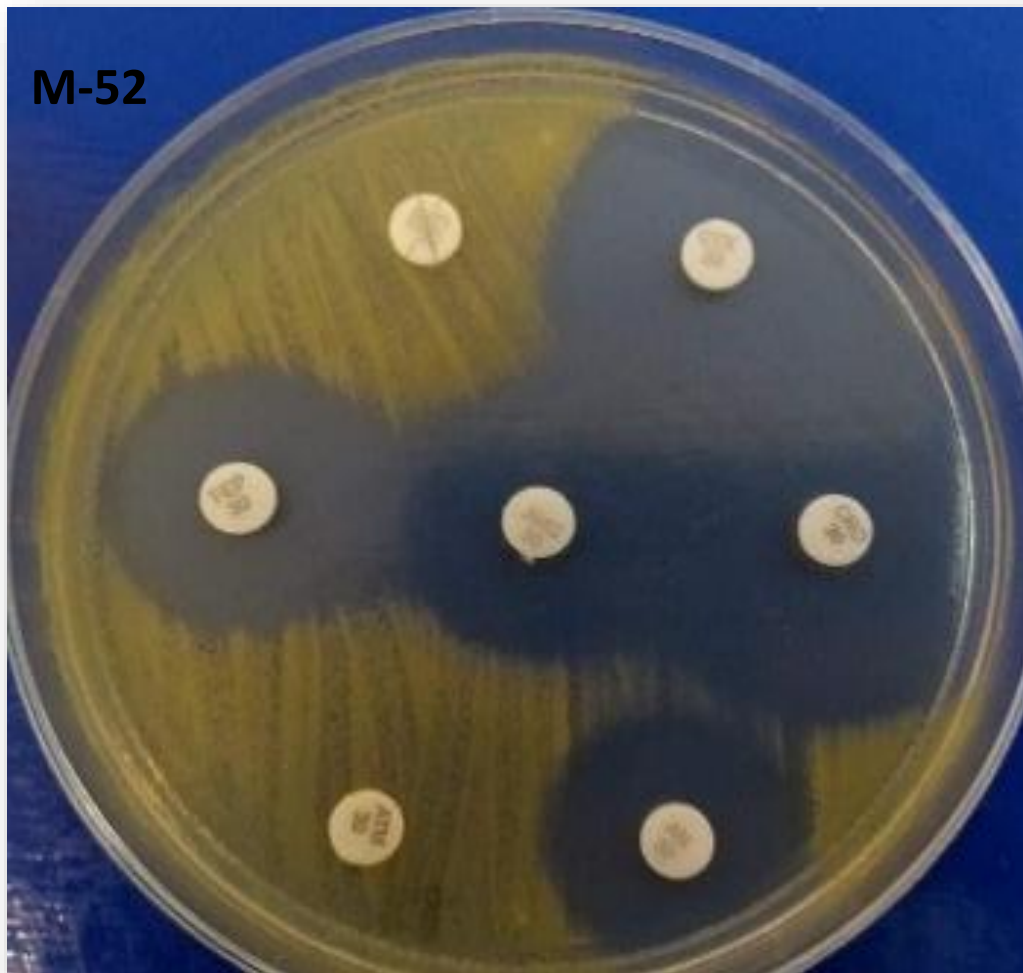
En el análisis de las bacterias aisladas se identificaron 15 bacterias ESBL por medio de la prueba fenotípica, es decir el 29.4% (15/51); de las cuales el 20% (3/15) pertenecen a *Proteus vulgaris*, el 20% (3/15) a *Klebsiella oxitoca*, el 13% (2/15) a *Escherichia coli*, el 13% (2/15) *Escherichia adecarboxylata*, otro 13% (2/15) a *Providencia stuartii*, el 6% a *Citrobacter diversus*, y otro 6% a *Enterobacter aerogenes* y *Serratia odorifera* respectivamente.



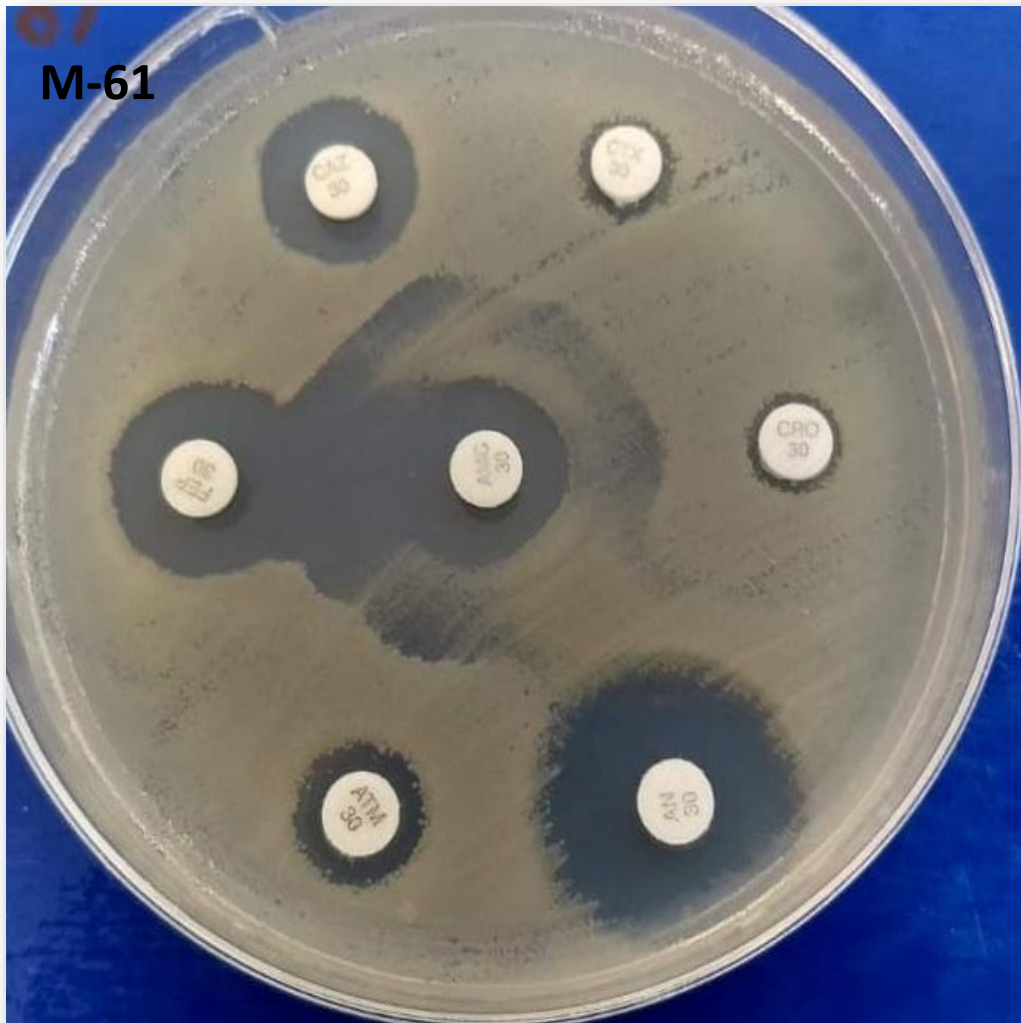
**Gráfica 1.** Se observa el porcentaje de las muestras positivas a la prueba fenotípica para identificación de ESBL en comparación con las demás enterobacterias aisladas.

**Tabla 4. Cepas positivas a la prueba de sinergia con disco de ácido clavulánico.**

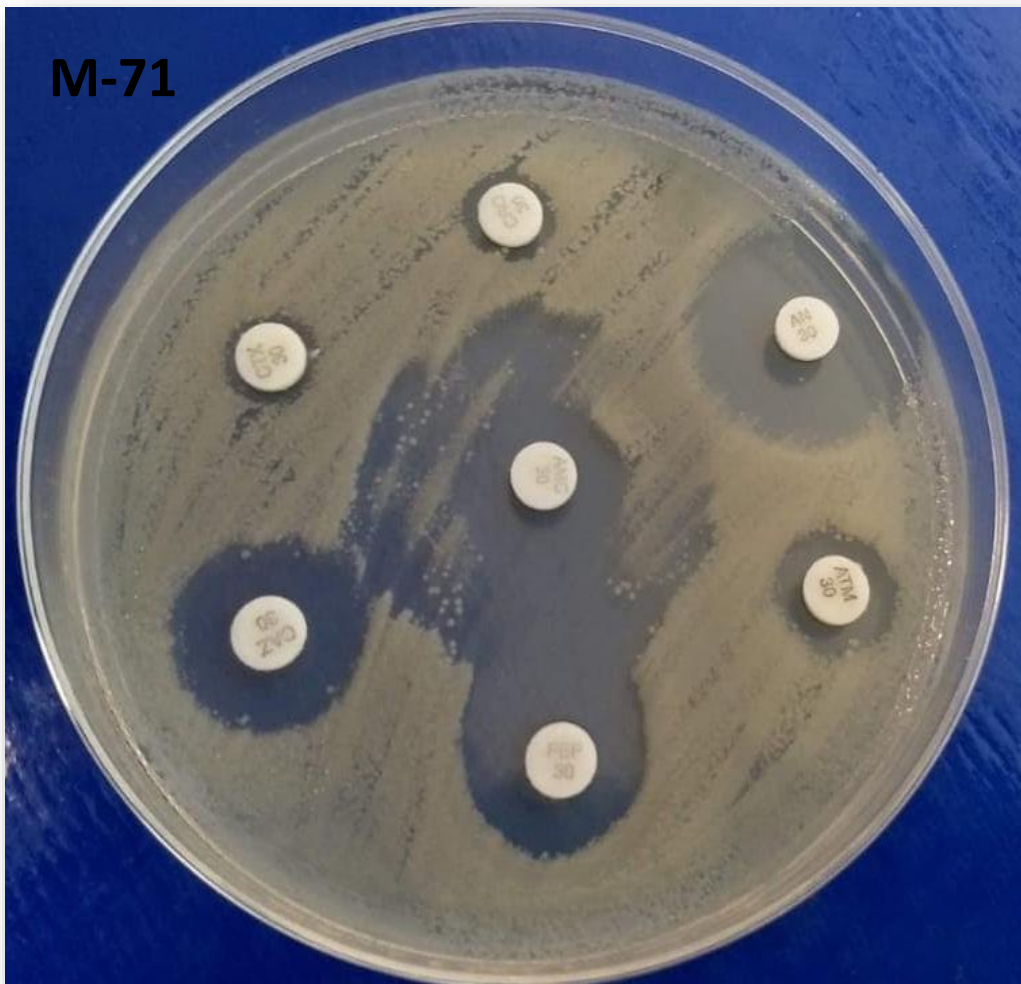
NO. DE ID	BACTERIA	HALO DE SINERGIA
M-11	<i>Proteus vulgaris</i>	CEFEPIME/CEFTRIAXONA
M-13	<i>Citrobacter diversus</i>	CEFEPIME
M-17	<i>Proteus vulgaris</i>	CEFEPIME
M-18	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	CEFEPIME
M-20	<i>Providencia stuartii</i>	CEFEPIME
M-21	<i>Klebsiella oxitoca</i>	CEFEPIME/CEFTAZIDIME
M-22	<i>Proteus vulgaris</i>	CEFEPIME
M-23	<i>Klebsiella oxitoca</i>	CEFEPIME
M-50	<i>Providencia stuartii</i>	CEFEPIME
M-52	<i>Serratia odorifera</i>	CEFEPIME, CEFTRIAXONA, CEFOTAXIMA
M-53	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CEFEPIME
M-53-2	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	CEFTRIAXONA
M-61	<i>Escherichia coli</i>	CEFEPIME
M-67	<i>Klebsiella oxitoca</i>	CEFEPIME
M-71	<i>Escherichia coli</i>	CEFEPIME



**Figura 13.** Muestra M-52 mostrando una reacción compatible con ESBL, se aprecia el halo de sinergia creado del disco de Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) unido con Cefepime (FEP), Ceftriaxona (CRO) y Cefotaxima (CTX). El resto de antibióticos del set son Ceftazidime (CAZ), Aztreonam (ATM) y Amikacina (AN).



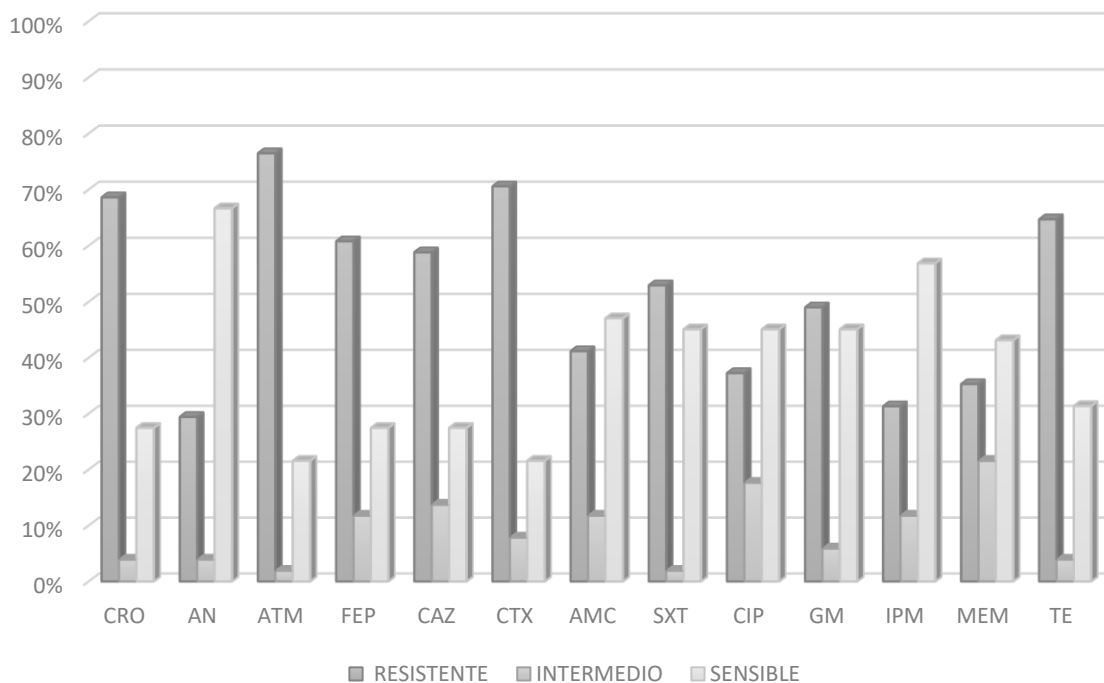
**Figura 14.** Muestra M-61 se observa la típica formación de ESBL, se aprecia el halo de sinergia creado del disco de Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y Cefepime (FEP). Podemos observar las reacciones de crecimiento con el resto del set Ceftazidime (CAZ), Cefotaxime (CTX), Ceftriaxona (CRO), Amicacina (AN), Aztreonam (ATM).



**Figura 15.** Muestra M-71 se observa el halo de sinergia creado del disco de Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y Cefepime (FEP), creando la forma de “pescado” muy común en las bacterias ESBL. Además, se puede ver el crecimiento con los demás antibióticos del set Ceftazidime (CAZ), Cefotaxime (CTX), Ceftriaxona (CRO), Amicacina (AN), Aztreonam (ATM).

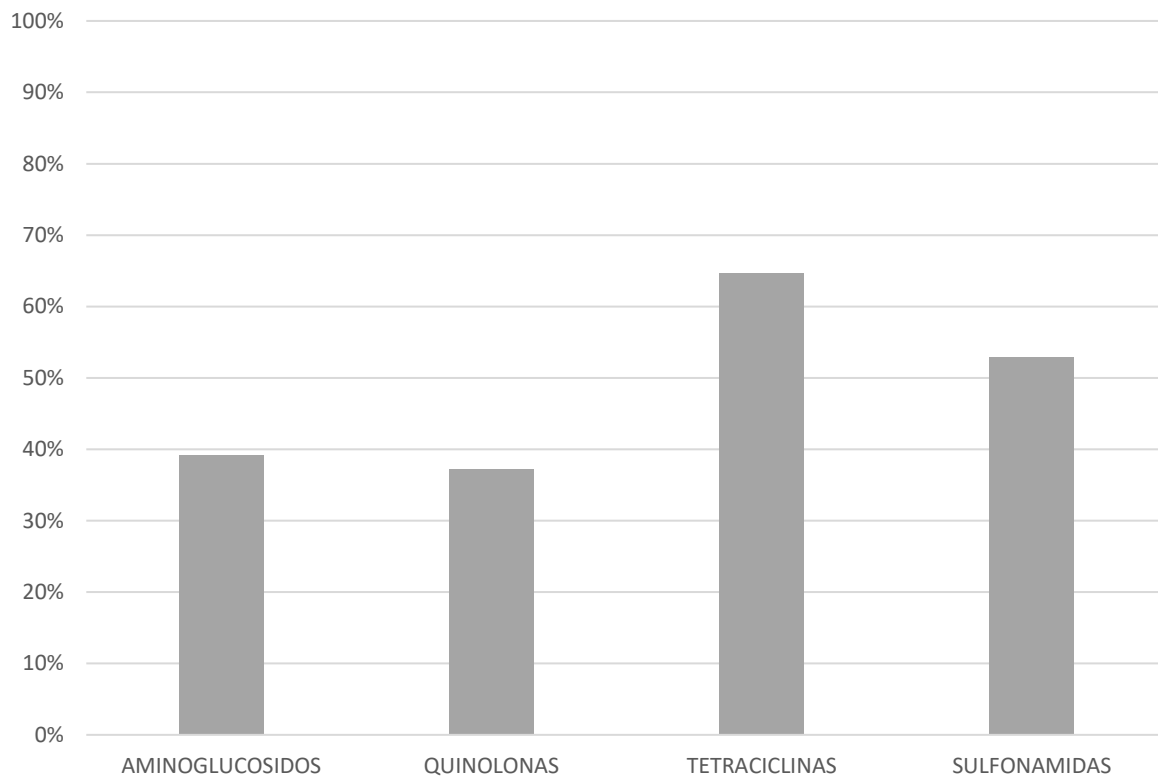
En cuanto a los betalactámicos probados se obtuvo un 64.7% (33/51) de resistencia a Ceftriaxona, 54.9% (28/51) de resistencia a Cefotaxima, 52.9% (27/51) a Aztreonam, 50.9% (26/51) a Cefepime, 45% (23/51) a Ceftazidime, 29.4% (15/51) Amoxicilina con ácido clavulánico.

PORCENTAJE DE RESISTENCIA GENERAL DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE FELINOS DOMESTICOS.



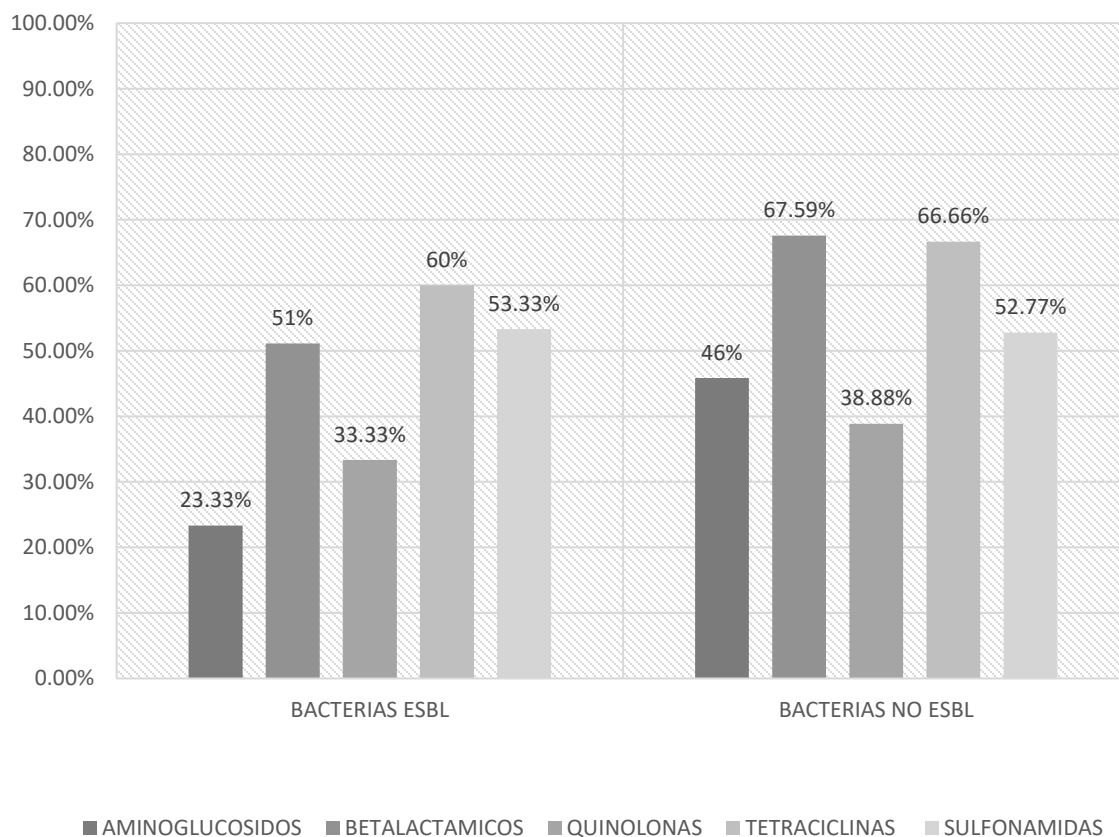
**Gráfica 2.** Se observa el porcentaje de resistencia y sensibilidad de forma general.

### PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS NO $\beta$ -LACTÁMICOS



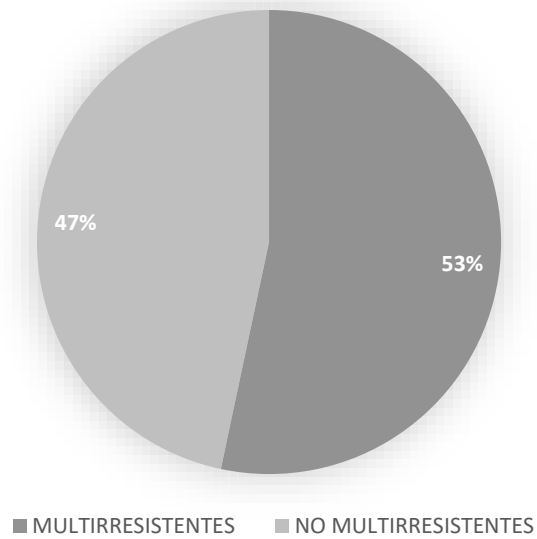
**Gráfica 3.** Muestra el porcentaje de resistencia por familia de antibióticos, a excepción de la familia de los  $\beta$ -lactámicos.

## PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE BACTERIAS BLEE EN COMPARACIÓN CON BACTERIAS NO BLEE



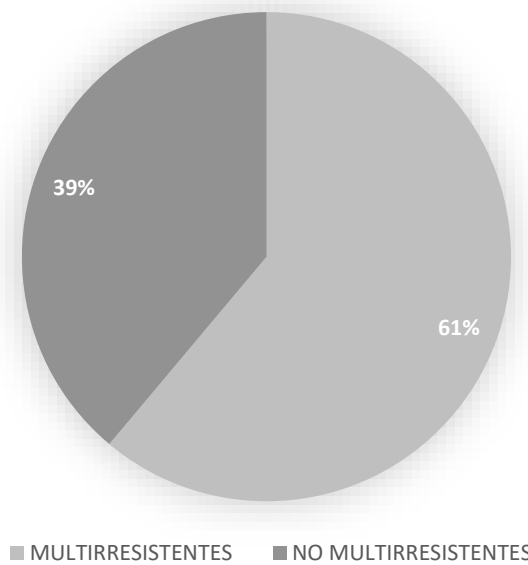
**Gráfica 4.** Esta gráfica muestra el porcentaje de resistencia por familia de antibióticos de las bacterias BLEE en comparación con las no BLEE.

## PORCENTAJE DE CEPAS EBSL CON PERFIL DE MULTIRRESISTENCIA

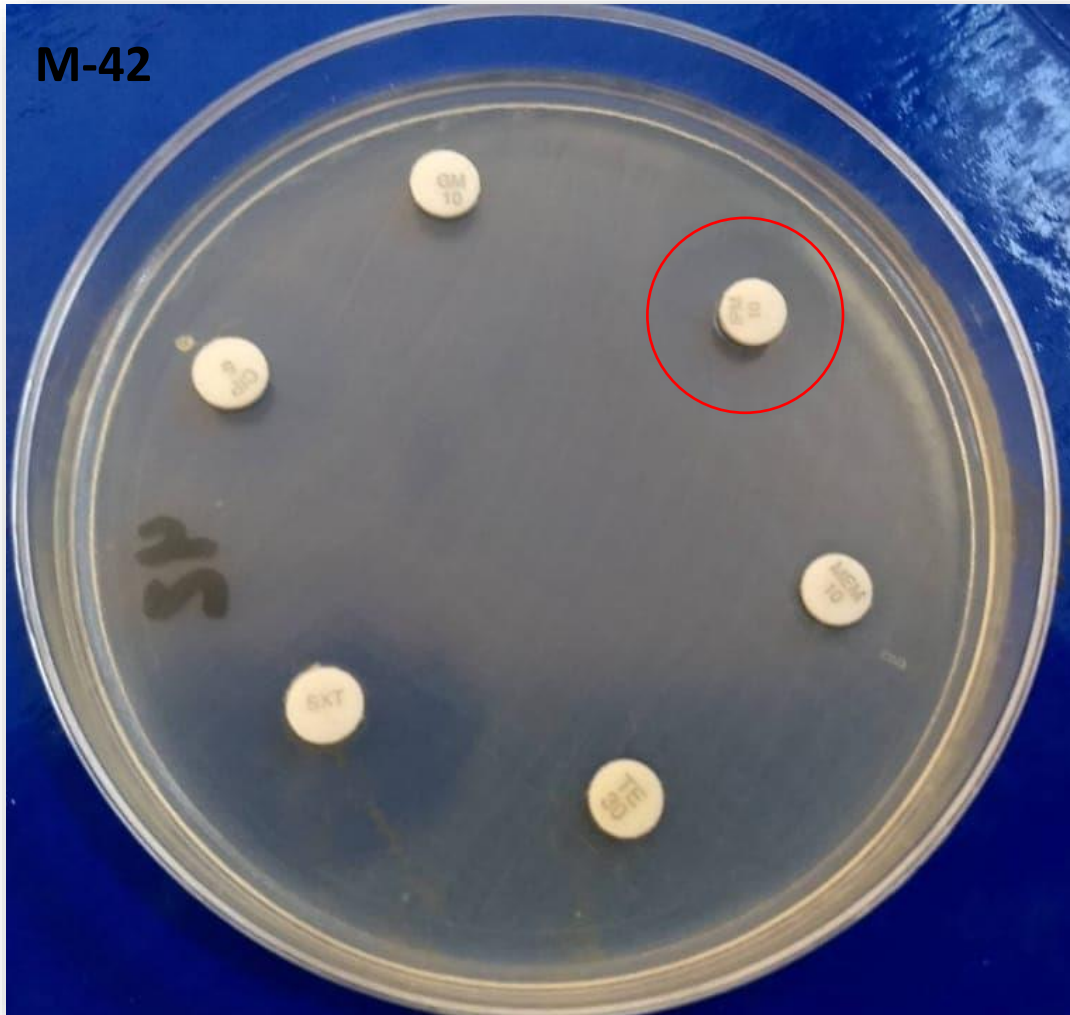


**Gráfica 5.** Se observa el porcentaje de las cepas BLEE con características de multirresistencia antibiótica.

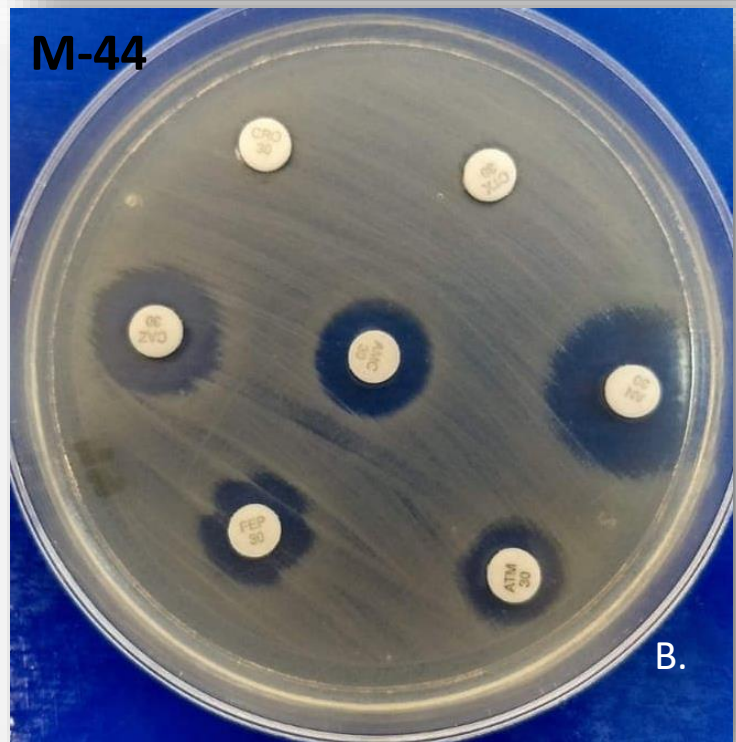
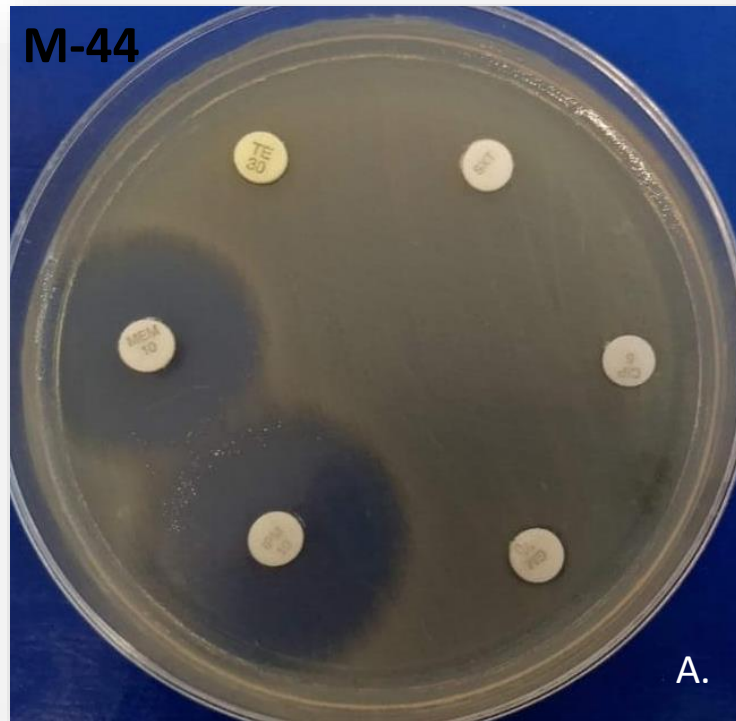
## PORCENTAJE DE CEPAS NO EBSL CON PERFIL DE MULTIRRESISTENCIA



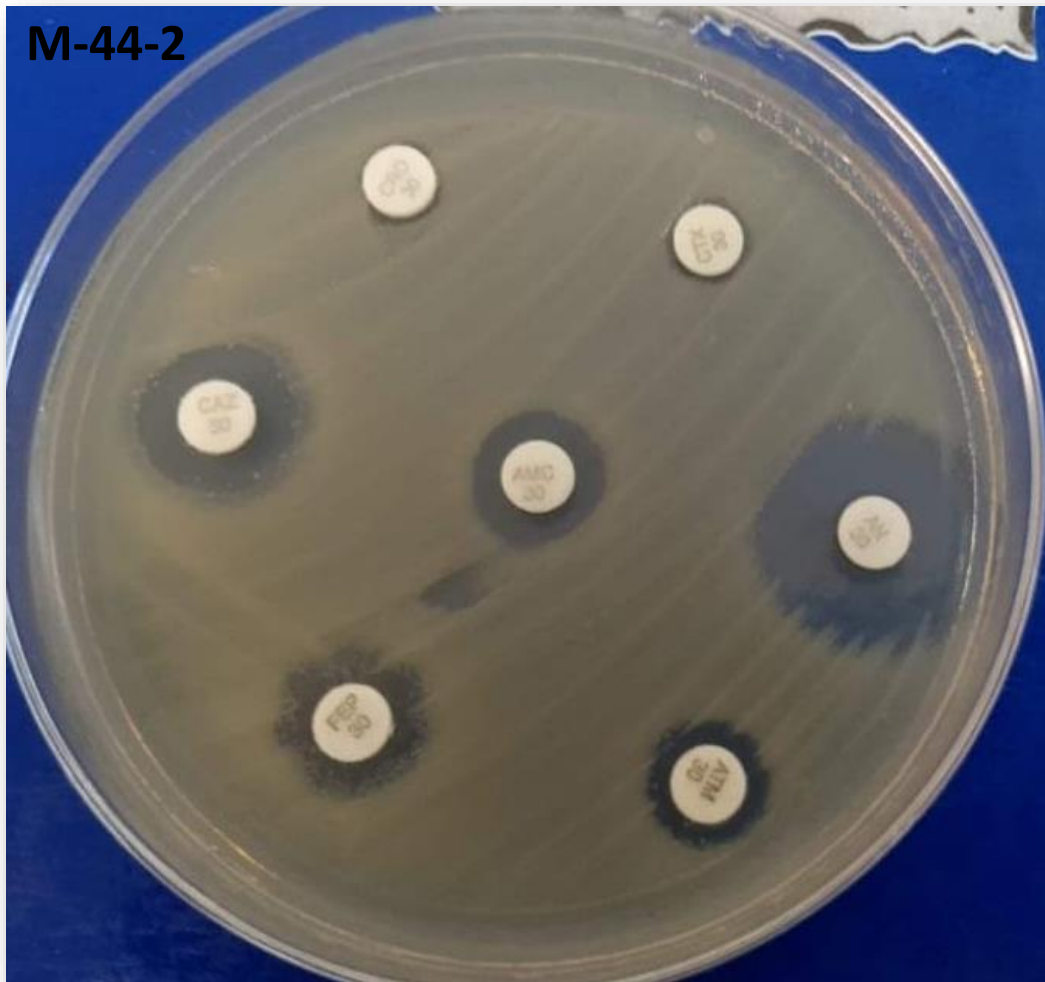
**Gráfica 6.** Se observa el porcentaje de las cepas No BLEE con características de multirresistencia antibiótica.



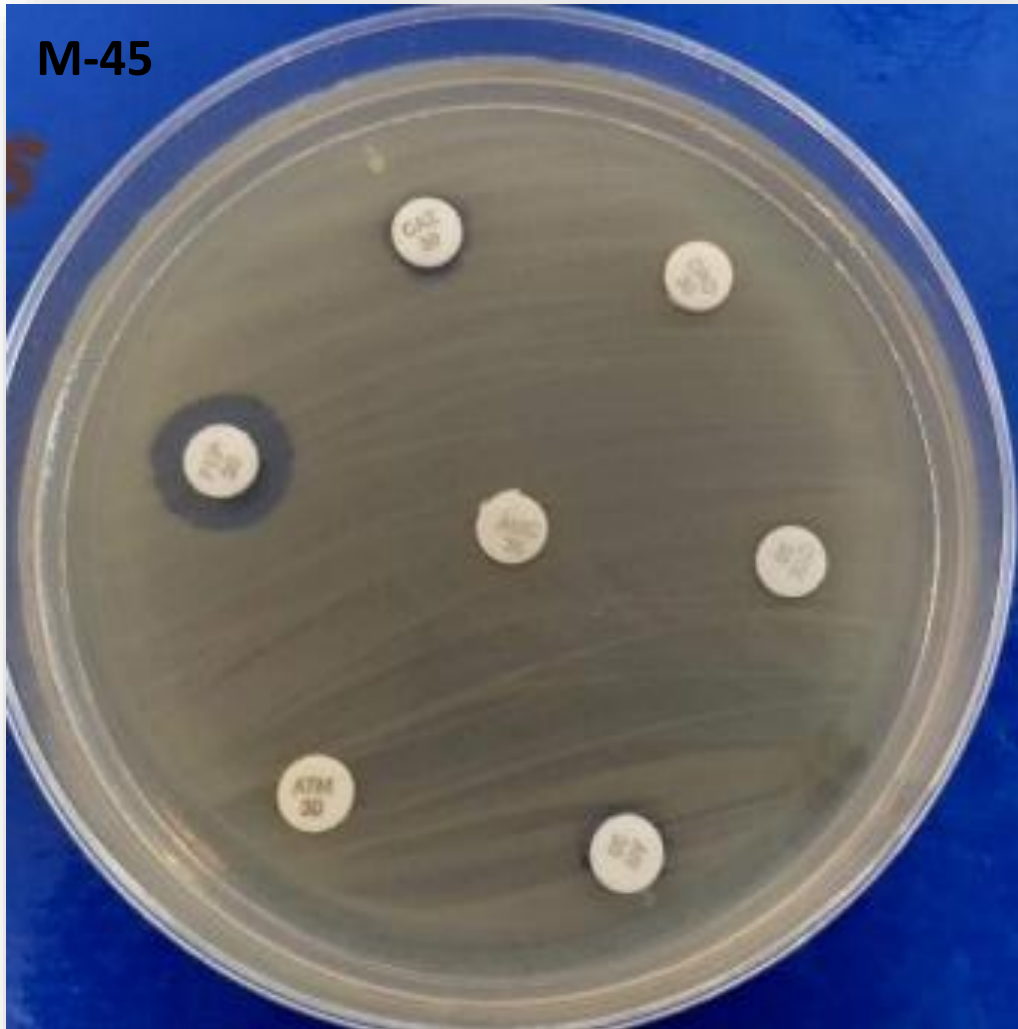
**Figura 16.** Muestra M-42. Podemos apreciar un alto nivel de resistencia, incluso en los carbapenémicos probados, donde es resistente a Meropenem (MEM) e intermedio a Imipenem (IPM) círculo rojo).



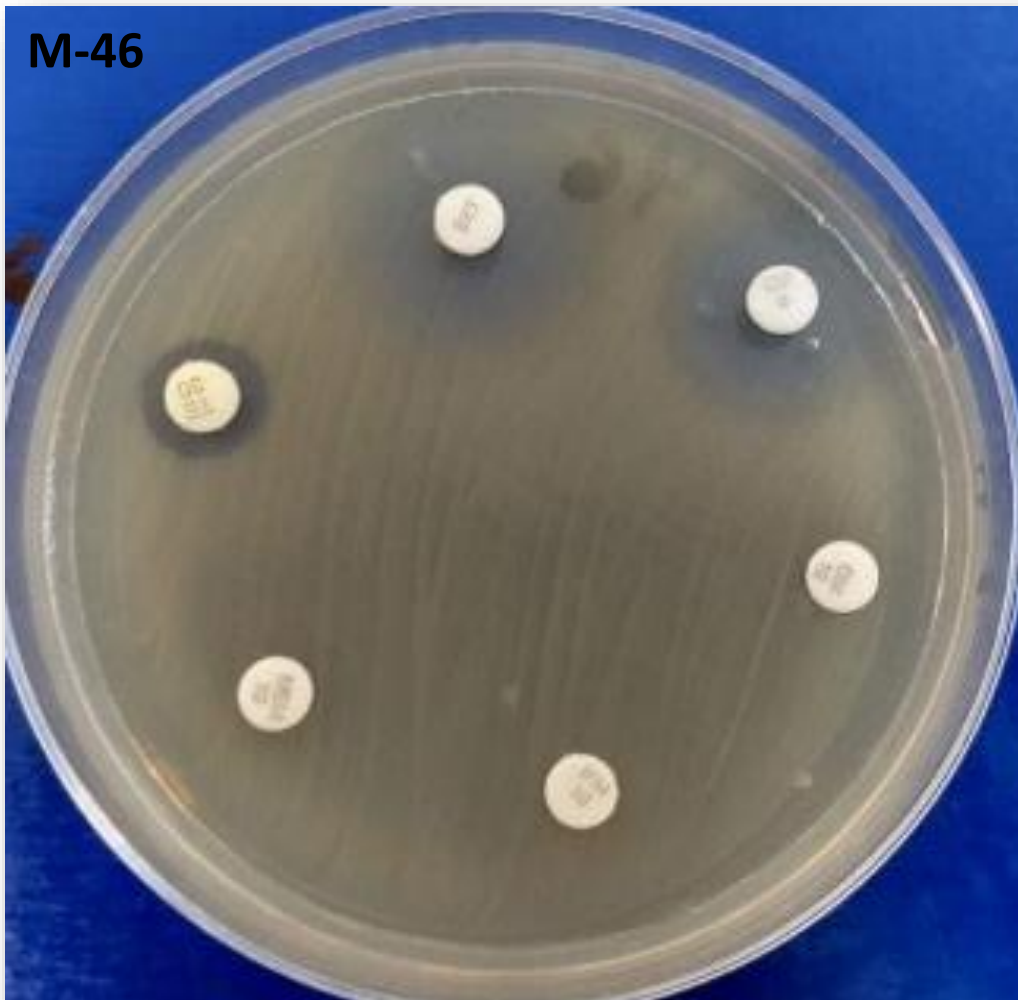
**Figura 17.** A. Muestra M-44 se pueden observar 2 halos de inhibición pertenecientes a Imipenem (IPM) y Meropenem (MEM) que muestran sensibilidad, además se puede notar la evidente ausencia del halo de inhibición en los otros discos. B. Misma muestra, diferente set donde se visualiza sensibilidad al disco de Amikacina (AN) y una reacción intermedia al disco de Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), y una clara resistencia para los demás antibióticos.



**Figura 18.** Muestra M-44-2. En este antibiograma se puede observar sensibilidad únicamente a la Amikacina (AN).



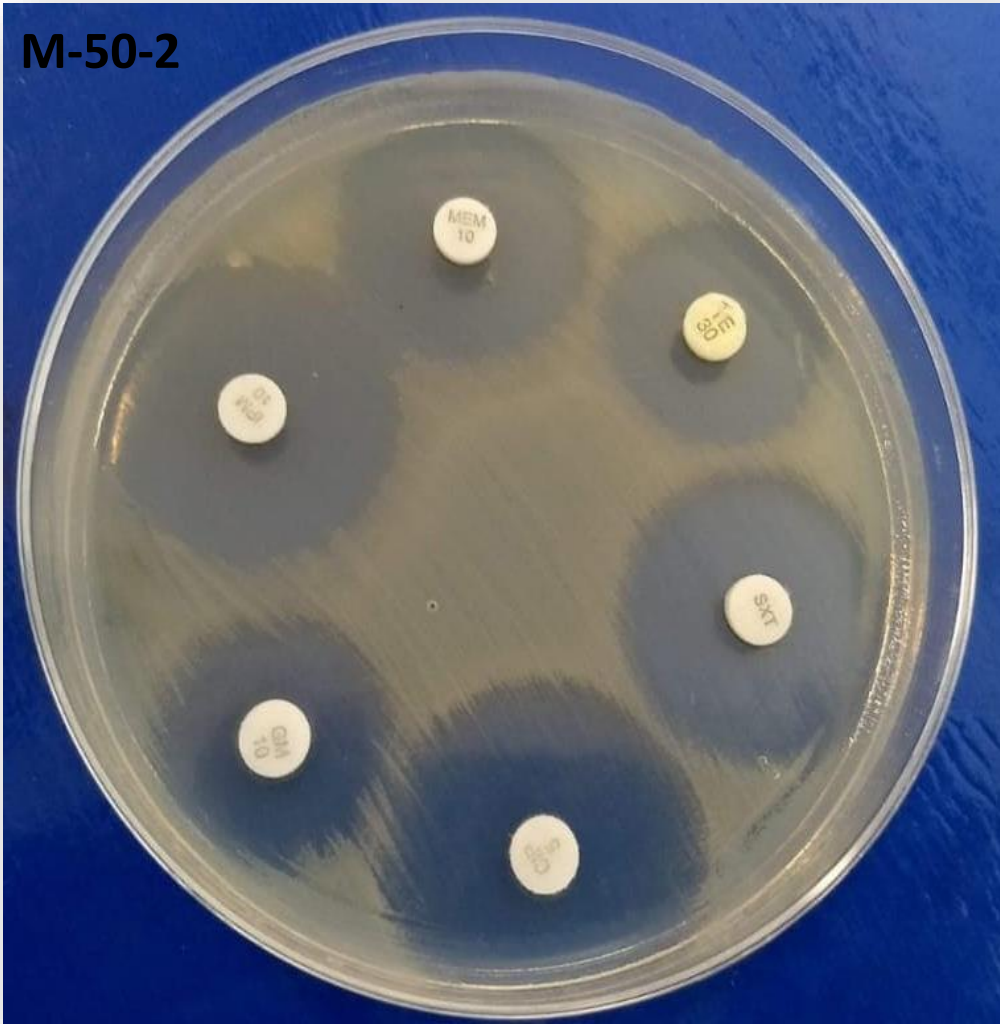
**Figura 19.** En este set la muestra M-45 presenta resistencia a todos los antibióticos observados Ceftriaxona (CRO), Amikacina (AN), Aztreonam (ATM), Cefepime (FEP), Ceftazidime (CAZ), Cefotaxima (CTX) y Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC).



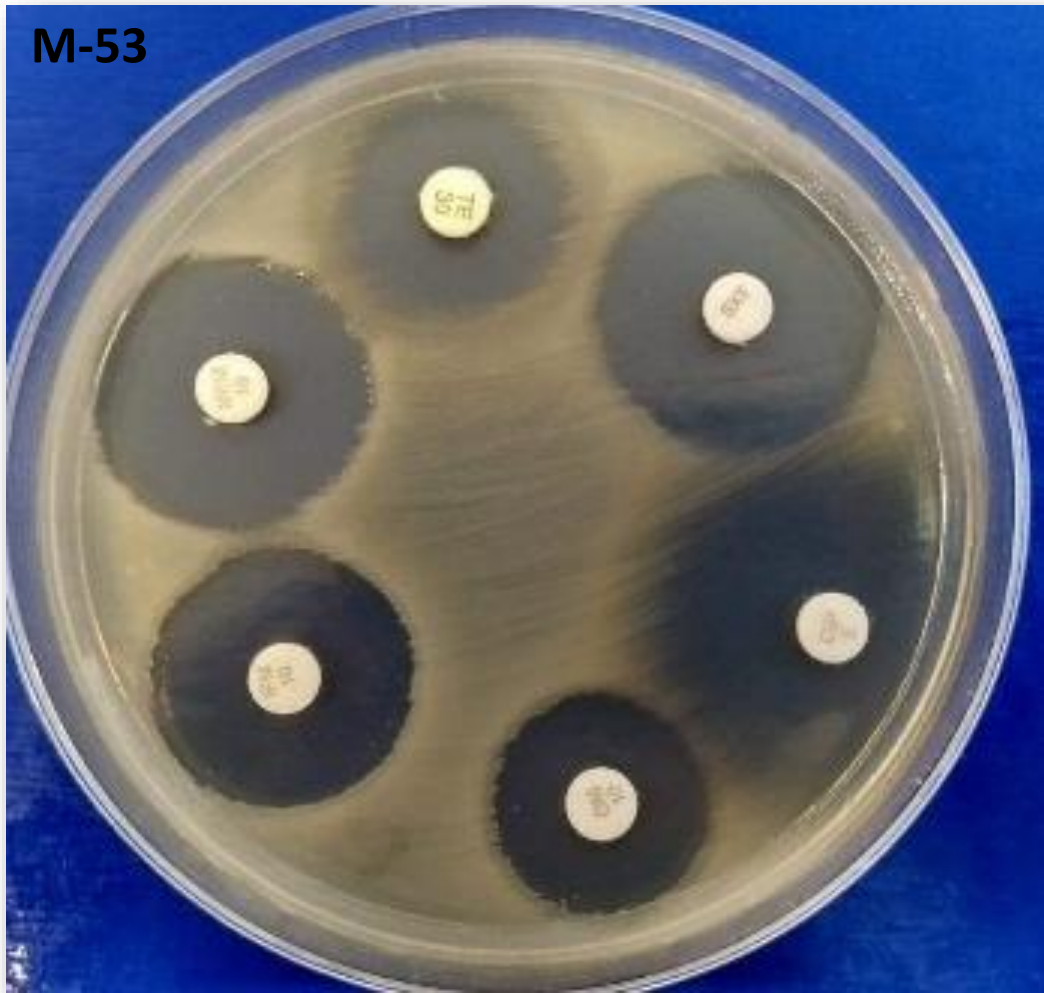
**Figura 20.** Muestra M-46. En este antibiograma podemos observar únicamente Sensibilidad a Sulfa+Trimetoprima (SXT) y Ciprofloxacino (CIP). Presenta Resistencia a Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Gentamicina (GM) y Tetraciclina (TE).



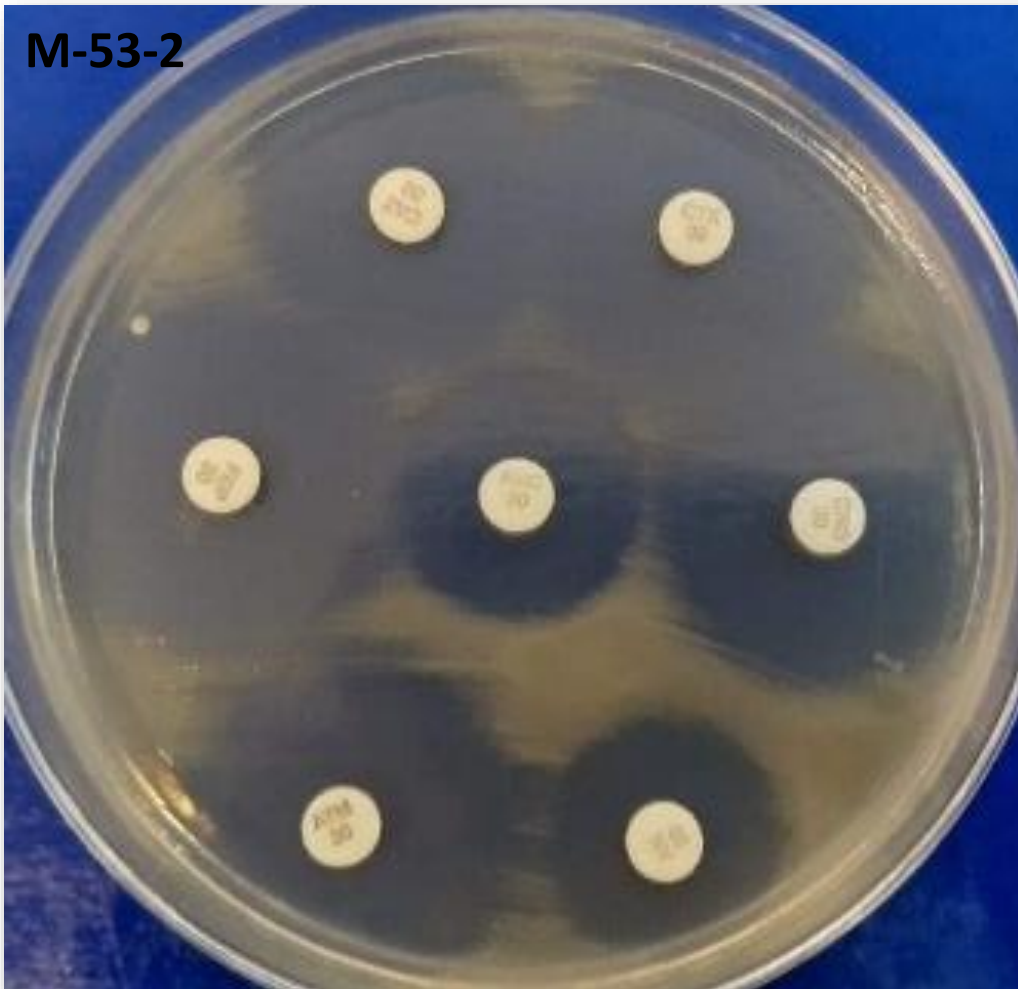
**M-50-2**



**Figura 22.** Muestra M-50-2. Se pueden observar halos de inhibición de gran tamaño. Esta cepa presenta sensibilidad a todos los antibióticos de este set.



**Figura 23.** Muestra M-53. Los halos de inhibición de esta muestra indican Sensibilidad a la mayoría de los antibióticos a excepción de una reacción Intermedia a Imipenem (IPM).



**Figura 24.** Muestra M-53-2. Se aprecian halos de inhibición de gran tamaño. Esta cepa presenta sensibilidad a todos los antibióticos de este set.

**M-64**



**Figura 25.** Muestra M-64. Esta muestra presenta Sensibilidad únicamente a la Amikacina (AN)

## VIII. DISCUSIÓN

Este estudio identificó una cantidad notable del 29.4% (15/51) de enterobacterias productoras de BLEE derivadas de la colección de muestras rectales de 75 pacientes felinos clínicamente sanos obtenidas durante 6 meses en el Hospital de pequeñas especies de la BUAP.

Durante el análisis de las bacterias aisladas, se identificaron 15 bacterias BLEE por medio de la prueba fenotípica, es decir el 29.4% (15/51); de las cuales el 20% (3/15) pertenecen a *Proteus vulgaris*, el 20% (3/15) a *Klebsiella oxitoca*, el 13% (2/15) a *Escherichia coli*, el 13% (2/15) *Escherichia adecarboxylata*, otro 13% (2/15) a *Providencia stuartii*, el 6% a *Citrobacter diversus*, y otro 6% a *Enterobacter aerogenes* y *Serratia odorifera* respectivamente.

Este porcentaje es mayor en comparación al encontrado en estudios similares, que también se realizaron en animales de compañía, preferentemente de perros y gatos.

En Suiza durante el año 2012 al año 2016 el 20,8 % (72/346) de las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* de procedencia clínica, aisladas de perros y gatos eran productoras de BLEE (3).

Un estudio del año 2016 en aislados fecales de *E. coli* en animales de compañía sanos en Algeria muestreo a 171 animales sanos, donde 20 (11,7 %) dieron positivo para la producción de BLEE (27).

En otra investigación realizada en India se recuperaron un total de 33 aislamientos de *Klebsiella* y 29 de *Enterobacter*. Se detectó resistencia fenotípica a betalactamasas en el 66,6 % y el 25 % de los aislados de *Klebsiella* y *Enterobacter*, respectivamente, de perros sanos y en el 66,6 % y el 60 % de los aislados de *Klebsiella* y *Enterobacter*, respectivamente, de perros con diarrea. En general, se encontró que la incidencia del fenotipo de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) fue del 21,2 % (7/33) en los aislamientos de *Klebsiella*, mientras que ninguno de los aislamientos de *Enterobacter* exhibió el fenotipo de BLEE (28).

Por otra parte, un estudio en Japón mostró porcentajes elevados de BLEE en aislamientos clínicos de Enterobacteriaceae productoras de BLEE y/o pAmpC de animales de compañía de muestras tracto urinario, pero estas fueron tomadas de animales enfermos incluyendo perros y gatos. La prueba fenotípica reveló que 78 aislados, incluidos 59 *E. coli*, 17 *K. pneumoniae* y 2 *P. mirabilis* se confirmó que eran productores de BLEE, y 21 aislamientos, incluidos 19 *E. coli* y 2 *K. pneumoniae*, eran productores de pAmpC (29).

En otro estudio realizado también en Suiza entre 2012 y 2016, se recolectaron 205 cepas de *E. coli* (41 en 2012, 121 en 2013, 17 en 2014, 17 en 2015 y 9 en 2016) muestras de perros y gatos. Durante estos años se detectaron productores de BLEE en 10 (24,4%), 12 (9,9%), 4 (23,5%), 6 (35,3%) y 3 (33,3%) de los aislamientos, respectivamente (30).

Un estudio realizado en Argentina donde el total de 216 aislamientos recuperados de mascotas enfermas (perros y gatos), aproximadamente la mitad se identificaron como *Enterobacteriales*; 54 de 101 de los aislamientos fueron identificados como *E. coli*.

Por prueba fenotípica de susceptibilidad *in vitro*, la mayoría de *E. coli* resistente a TGC 65% (13/20) se clasificaron como productores de AmpC y el resto 35% (7/20) como productores de BLEE. Los trece aislados productores de AmpC se caracterizaron como portadores de blaCMY-2, mientras que 7 aislados productores de BLEE se caracterizaron como blaCTX-M-2(4/7), blaCTX-M-15 (2/7) y blaCTX-M-. 14(1/7) productores (31).

En algunos trabajos anteriormente mencionados, a pesar de que las muestras fueron obtenidas de perros y gatos, el porcentaje de bacterias BLEE se encuentra por debajo del valor encontrado en este estudio. En el caso de las muestras provenientes únicamente de gatos, la mayoría de los aislamientos se obtuvieron de animales enfermos, en comparación con el porcentaje de identificación de bacterias BLEE encontrado en esta investigación donde en las muestras de gatos clínicamente sanos se identificó el 29.4% (15/51) de BLEE. El hallazgo de bacterias provenientes de la microbiota de perros y gatos con este fenotipo no es raro, y se ha utilizado como un marcador de resistencia no solo para betalactámicos, sino también para otras familias de antibióticos (32).

El porcentaje alto de cepas BLEE encontrado en este estudio puede explicarse por diversas razones. La primera tiene que ver con las limitaciones del método utilizado para la identificación de las cepas productoras. La detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica, y está condicionado por la cantidad de enzimas producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia. A pesar de que el método descrito anteriormente es considerado como patrón de oro por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); el método de Jarlier de difusión en discos depende de la habilidad y precisión en el desarrollo de la prueba y de la correcta interpretación de la sinergia. Ya que en algunas cepas con problemas de permeabilidad o con resistencia simultánea a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas puede verse mermada la capacidad de detección de esta prueba. Asimismo, pueden producirse falsos positivos en cepas hiperproductoras de SHV-1, o que presenten  $\beta$ -lactamasas cromosómicas sensibles a los inhibidores (*K. oxytoca*, *Proteus vulgaris*). En estos casos, lo ideal es confirmar la identificación por medio de métodos moleculares (PCR), las cuales son más específicas, permitiendo la caracterización de la enzima, la identificación del elemento genético móvil involucrado en la transmisión de el genotipo de resistencia y permite además la confirmación de la presencia de genes adicionales de resistencia (26).

Otra de las razones de la discrepancia entre el porcentaje obtenido en este trabajo podría deberse al número de muestras procesadas en comparación con los otros estudios, ya que en la mayoría se tomaron muestras de 2 especies, tanto felinos como caninos, y en algunos estudios se reportaron los porcentajes de BLEE como población en conjunto.

Es posible que el aspecto más importante que explique la gran cantidad de cepas BLEE sea el uso inadecuado de antimicrobianos, ya sea utilizado en el ámbito veterinario o en la práctica humana. Estudios previos han encontrado las mismas cepas de bacterias BLEE en humanos y sus perros. Aunque existe evidencia que respalda que los humanos y los animales de compañía comparten cepas bacterianas resistentes, pocos estudios se han enfocado en este aspecto tan importante.

Sin embargo, se cree que lo mismo sucede con las bacterias pertenecientes al microbioma. Debido a que los reservorios de bacterias multirresistentes son ubicuos y pueden fusionarse con el microbioma intestinal a través de dos mecanismos: en primer lugar, el huésped puede adquirir bacterias exógenas y colonizar el epitelio intestinal; en segundo lugar, las bacterias previamente susceptibles pueden volverse resistentes a través de la selección o inducción de mutantes resistentes a los antibióticos mediada por la presencia de antibióticos o por eventos de transferencia de genes.

El término resistoma ejemplifica lo que podría llegar a suceder con los pacientes que han adquirido poblaciones bacterianas con un alto grado de resistencia sin ser directamente expuestos al efecto adicional de la presión selectiva relacionada con la administración de antimicrobianos (administración a los animales con fines terapéuticos y los utilizados en la industria ganadera). Debido a que el resistoma se define como un grupo de genes de resistencia que se encuentra en el medio ambiente.

Toda la gama de genes de resistencia a los antibióticos se puede encontrar tanto en bacterias patógenas como no patógenas, como es el caso de las bacterias del microbioma. En este sentido, es probable que los genes resistentes conocidos de las bases de datos disponibles hasta la fecha representen solo una pequeña fracción de la “verdadera” población de genes. Además, el resistoma se puede definir en múltiples niveles. A nivel mundial, el resistoma se refiere a un gran reservorio de genes de resistencia a los antibióticos que se encuentran en el medio ambiente. A nivel local, el resistoma intestinal se refiere a los genes de resistencia a los antibióticos que se encuentran en la microbiota intestinal y, finalmente, a nivel bacteriano, se refiere a los genes de resistencia portados por una especie bacteriana específica.

Aunque las dosis terapéuticas de antibióticos están diseñadas para alcanzar concentraciones inhibitorias de los objetivos bacterianos, es plausible que se puedan encontrar concentraciones sub inhibitorias de antibióticos para algunas bacterias en algunos órganos/tejidos, incluidos los ecosistemas intestinales de los animales.

La selección y persistencia de la resistencia impulsada por los antibióticos en las bacterias comensales crea una reserva de adquisición de resistencia tanto para los patógenos bacterianos, por lo tanto, se pueden seleccionar mutantes resistentes a los

antibióticos, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de una bomba de expulsión y la producción de resistencia a múltiples patógenos.

Asimismo, el uso extensivo de antibióticos ha llevado a la expansión de especies bacterianas resistentes a los antibióticos y a una mayor abundancia de genes de resistencia a los antibióticos dentro de las bacterias comensales que pueden transferirse a los patógenos invasores. Es posible que al diseñar estudios que comparen el impacto de un antibiótico para indicaciones específicas en la microbiota intestinal, podamos determinar el grado de disbiosis asociado con una clase particular de antibiótico. En este contexto, describir el potencial disbiótico podría convertirse en un nuevo parámetro a tener en cuenta a la hora de desarrollar nuevos antibióticos (13).

Los hallazgos de nuestro estudio sugieren un porcentaje mayor de resistencia a antimicrobianos, en comparación con los resultados de estudios provenientes de Europa y Asia; al considerar los estudios realizados en Latinoamérica, se puede inferir que los porcentajes de resistencia son mayores.

Incluso en algunos estudios no se evalúan o reportan niveles de resistencia a Carbapenémicos; en esta investigación de las muestras evaluadas positivas a BLEE solamente se encontró que el 20 % de las cepas mostraron sensibilidad intermedia a Meropenem y sólo el 6% a Imipenem. Por el contrario, en las cepas no productoras de BLEE se obtuvo para Imipenem una resistencia del 44% y Meropenem del 50%, un resultado interesante, siendo estos 2 antibióticos de uso extralimitado y poco común en la terapéutica de pequeñas especies.

Cabe destacar que en este estudio solo se realizaron hisopados rectales de pacientes felinos sanos, obteniendo un mayor porcentaje de bacterias productoras de BLEE que en otras investigaciones, siendo el único estudio realizado exclusivamente de pacientes felinos en México hasta ahora.

El porcentaje de bacterias productoras de BLEE con perfil de multirresistencia obtenido fue de 53%; es de vital importancia considerar que la concomitancia con otros factores genéticos que confieren resistencia a otros antimicrobianos es muy frecuente como ya se mencionó con anterioridad. Diferentes estudios confirman el papel de la transferencia

genética con plásmidos y transposones en la multirresistencia de las bacterias, también en la diseminación natural de algunos determinantes de resistencia. En los últimos años se comprobó el rol de participación de los *cassettes* genéticos de resistencia y de los integrones en el proceso evolutivo de los plásmidos de resistencia. En la mayoría de los casos la resistencia se transfiere de manera conjunta con el gen de BLEE, incluso en el mismo transposón, integrón o plásmido, sin tener en cuenta la posible presión selectiva.

## **XI. CONCLUSIONES**

- 1) Este estudio informa sobre la identificación de bacterias productoras de BLEE a partir de microbiota de felinos clínicamente sanos.
- 2) La tasa de detección de aislamientos productores de BLEE en el presente estudio fue más alta que la investigada en estudios similares alrededor del mundo.
- 3) El concepto de resistencia bacteriana es conocido entre los colegas veterinarios, pero no había sido expuesto de tal manera en México, ya que no existen parámetros que midan la resistencia, la regulación del uso de antibióticos en medicina veterinaria, y menos aún el monitoreo en animales sanos, incluyendo a los felinos domésticos.
- 4) Se debe prestar especial atención en la educación de los veterinarios, la necesidad de propagación de estudios de diagnóstico y de la documentación adecuada para justificar el tratamiento con antibióticos. El desarrollo de antibióticos de espectro limitado en el mercado, para una aplicación conveniente y manejo Cat friendly son de particular importancia en los gatos, ya que la vía de aplicación es un factor importante en la elección de los antimicrobianos en esta especie.
- 5) El presente estudio enmarca la necesidad de promover la administración antimicrobiana responsable en la medicina de pequeños animales y de implementar estrategias de intervención efectivas.
- 6) El establecimiento de programas de vigilancia en países de bajos y medianos ingresos permitirán monitorear la extensión del problema de BLEE en animales de compañía, así como evaluar la implementación de diferentes estrategias para limitar la propagación de BLEE, incluyendo a los responsables del uso de antibióticos en animales (veterinarios y propietarios).

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Scott G. Antibiotic resistance. Vol. 37, *Medicine*. 2009. p. 551–6.
2. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(12):1057–98.
3. Nüesch-Inderbinen M, Zogg AL, Simmen S, Zurfluh K, Schmitt SN, Stephan R. High Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Enterobacteriaceae Among Clinical Isolates From Cats and Dogs Admitted to a Veterinary Hospital in Switzerland. *Front Vet Sci*. 2018;5(March):1–8.
4. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2015;22(1):90–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
5. Bush K. The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy* [Internet]. 2013;19(4):549–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>
6. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2017;133:63–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.003>
7. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. Vol. 109, *Pathogens and Global Health*. Maney Publishing; 2015. p. 309–18.
8. Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: What, why, where, when and how? Vol. 116, *British Medical Bulletin*. Oxford University Press; 2015. p. 105–13.
9. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. Vol. 12, *Microbiología* (Madrid, Spain). 1996. p. 9–16.

10. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2014;78:14–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.027>
11. Hiltunen T, Virta M, Anna-Liisa L. Antibiotic resistance in the wild: An ecoevolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2017 Jan 19;372(1712).
12. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med* [Internet]. 2016;22(6):458–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.003>
13. Casals-Pascual C, Vergara A, Vila J. Intestinal microbiota and antibiotic resistance: Perspectives and solutions. Vol. 9, *Human Microbiome Journal*. Elsevier Ltd; 2018. p. 11–5.
14. Villa F, Ex-Hacienda El Canadá CC, Escobedo G, León N, Garcia-Mazcorro J, Minamoto Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review *Microorganismos gastrointestinales en gatos y perros: una revisión breve*. REVIEW ARTICLE *Arch Med Vet*. 2013;45:111–24.
15. Pumarola A, Rodriguez-Torres A, Garcia-Rodriguez JA. *Microbiología y parasitología medica*. 2ªed.
16. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica*. 7ªed. 2013.
17. Madigan M, Martinko J, Parker J. *Biología de los microorganismos (Brock)* - 10ed.
18. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037–50.
19. Pool K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria; 2001. *Current Opinion in Microbiology*2001, 4:500–508.
20. Hoffman SB. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 2001 May;23(5):464–72.

21. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1451–70.
22. Bush K. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. Vol. 62, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 2018.
23. Adler A, Katz DE, Marchaim D. The Continuing Plague of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Enterbacterales Infections: An Update. Vol. 34, *Infectious Disease Clinics of North America.* W.B. Saunders; 2020. p. 677–708.
24. Hussain HI, Aqib AI, Seleem MN, Shabbir MA, Hao H, Iqbal Z, et al. Genetic basis of molecular mechanisms in  $\beta$ -lactam resistant gram-negative bacteria. *Microb Pathog.* 2021 Sep 1;158.
25. Pereckaite L, Tatarunas V, Giedraitiene A. Current antimicrobial susceptibility testing for beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical settings. Vol. 152, *Journal of Microbiological Methods.* Elsevier B.V.; 2018. p. 154–64.
26. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro extendido [Internet]. Available from: [www.lahey.org/studies/webt.htm](http://www.lahey.org/studies/webt.htm)
27. Yousfi M, Mairi A, Touati A, Hassissene L, Brasme L, Guillard T, et al. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2016;22(7):431–5.
28. Mohammad Sharif N, Sreedevi B, Chaitanya RK, Sreenivasulu D. Beta-lactamase antimicrobial resistance in *Klebsiella* and *Enterobacter* species isolated from healthy and diarrheic dogs in Andhra Pradesh, India. *Vet World.* 2017;10(8):950–4.
29. Koide S, Ohsaki Y, Osaka S, Taniguchi Y, Nagano N, Nagano Y, et al. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and feline clinical specimens in Japan. *Vet Microbiol* [Internet]. 2018;216(February):183–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.020>

30. Zogg AL, Zurfluh K, Schmitt S, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. *Vet Microbiol.* 2018;216(February):79–84.
31. Rumi MV, Mas J, Elena A, Cerdeira L, Muñoz ME, Lincopan N, et al. Co-occurrence of clinically relevant  $\beta$ -lactamases and MCR-1 encoding genes in *Escherichia coli* from companion animals in Argentina. *Vet Microbiol.* 2019 Mar 1;230:228–34.
32. Ramos CP, Kamei CYI, Viegas FM, de Melo Barbieri J, Cunha JLR, Hounmanou YMG, et al. Fecal Shedding of Multidrug Resistant *Escherichia coli* Isolates in Dogs Fed with Raw Meat-Based Diets in Brazil. *Antibiotics.* 2022 Apr 1;11(4).