



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS

**“BETALACTAMASAS EN ENTEROBACTERIAS EN UN HOSPITAL DE
SEGUNDO NIVEL”**

Presenta:

QFB: Tico Calvario Mariela

DIRECTOR: M. C. María Susana Pérez Fernández

ASESOR: QFB. Carlos León Vazquez Huachina



NOVIEMBRE 2016

INDICE

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Estructura básica de las bacterias	3
2.3 Enterobacterias	5
2.4 Antibióticos	7
2.4.1 Antibióticos betalactámicos	7
2.4.2 Penicilinas	8
2.4.3 Cefalosporinas	9
2.4.4 Carbapenemos	10
2.4.5 Monobactamos	11
2.4.6 Inhibidores de β -lactamasas	12
2.5 Resistencia a Betalactámicos	12
2.6 Betalactamasas	14
2.6.1 Clasificación de Betalactamasas	14
2.7 Betalactamasas de Espectro Extendido	15
2.8 Betalactamasas Ampc	17
2.9 BLEE y Ampc	21
3. Marco de referencia	23
4. Planteamiento del problema	25
5. Justificación	26
6. Objetivos	27
7. Hipótesis	28
8. Diseño del estudio	29
9. Materiales y Metodología	30
9.1 Métodos para la detección de betalactamasas	32
10. Resultados	34
11. Discusión de Resultados	42
12. Anexos	48
13. Bibliografía	51

AmpC: Betalactamasa de tipo AmpC

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentracion Minima Inhibitoria

ESAC: Betalactamasas AmpC de espectro extendido

AMC amoxicilina-ácido clavulánico

FOX cefoxitina

CXM cefuroxima

C3G cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos

C4G cefalosporinas de cuarta generación

NAM: Acido N-acetilmurámico

NAG: Acido N-acetilglucosamina

PBP: Penicillin binding proteins/Proteínas de unión a Penicilina

SMART: Análisis de Seguimiento de Tendencias de Resistencia a los antimicrobianos

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la resistencia antimicrobiana representa un problema de talla mundial en la atención a la salud, tanto en el ámbito ambulatorio como en el de hospitalización. Es importante conocer y estudiar la prevalencia de la resistencia microbiana en nuestra área geográfica y las características epidemiológicas de las infecciones en las que se presentan para poder analizar su evolución.

Estudios recientes reportan el aumento significativo de la resistencia bacteriana, uno de los principales mecanismos de ello, es la producción de enzimas Betalactamasas, su aparición y diseminación ha ido evolucionando de la mano con el desarrollo de los antibióticos betalactámicos. Desde 1995 por su gran diversidad se dieron a conocer diferentes clasificaciones de estas enzimas, entre las más conocidas encontramos la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros y dentro de esta, un grupo de enzimas conocidas como Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), ha tomado cierto grado de importancia a nivel mundial debido a la frecuencia con la que se aísla una bacteria productora de este tipo de enzimas y al espectro de hidrólisis que tiene ya que le confiere resistencia a penicilinas, oximinocefalosporinas y monobactámicos pero no a cefamicinas ni a carbapenémicos y la gran mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico.

La aparición y propagación de las bacterias que producen enzimas BLEE se han descrito en todo el mundo, al presentarse principalmente en las enterobacterias, los patógenos más frecuentes de las infecciones, capaces de causar múltiples padecimientos.

Existen herramientas para la fenotipificación de las enzimas Betalactamasas, tal como es el uso de los antibiogramas usados para la observación de los halos de inhibición que producen los antibióticos. Actualmente se identifican y se reportan a las bacterias productoras de BLEE, para un mejor pronóstico en el tratamiento de una infección.

En los últimos años se sabe que las bacterias productoras de BLEE han ampliado aún más su espectro de hidrólisis a los betalactámicos, se están reportando bacterias con producción de BLEE, además, resistentes a Cefoxitina (cefamicina), que no corresponderían totalmente al perfil de una enzima BLEE. Es como surge la búsqueda de un grupo menos estudiado de betalactamasas; las de tipo AmpC. Las enzimas de tipo AmpC hidrolizan cefalosporinas de primera y segunda generación incluidas también las cefamicinas en menor medida a las

cefalosporinas de tercera generación y generalmente son poco eficaces para cefalosporinas de cuarta generación.

En el presente trabajo se estudió, si existe la posibilidad de bacterias con producción de enzimas BLEE y AmpC coexistiendo al mismo tiempo, confiriéndole así un espectro mayor de hidrolisis y resistencia a los antibióticos betalactámicos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

En la década de los 40 con el uso de la Penicilina, se creía que la lucha contra las bacterias había terminado ya que esta era capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, poniendo así fin a distintas enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Durante la segunda guerra mundial el uso indiscriminado de los antibióticos trajo consigo (1950-1960) los primeros reportes de *E. coli* resistentes a Penicilina, nuevamente esto representaba un peligro epidemiológico, así que el mundo científico se vio obligado a investigar y descubrir un antibiótico que pudiera funcionar contra estas cepas resistentes; y fue así que se obtuvo a la Ampicilina. En respuesta a este nuevo antibiótico que se presentaba como funcional, las bacterias nuevamente evolucionaron y comenzaron a crear mecanismos de resistencia para este antibiótico, en 1965 se reportó la primera *E. coli* resistente a Ampicilina, presentándose así un nuevo reto, crear un antibiótico que funcionara y respondiera frente a este nuevo mecanismo de resistencia que habían desarrollado. Entre 1970 y 1980 se comienzan a usar Cefalosporinas y se muestran efectividad solo 3 años, pues en 1983 se reporta en Alemania la primera cepa de *Klebsiella ozaenae* resistente a Cefalosporinas y desde entonces se ha sabido de una gran cantidad de brotes epidémicos de enterobacterias asociadas a la producción de betalactamasas.

En 1984 en Corea del Sur, describieron una cepa que podía transferir resistencia a Cefoxitina, Cefotetán, penicilinas, oximinocefalosporinas y monobactamicos desde *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. La cepa poseía una enzima a la que fue denominada bla_{CMY-1} por su actividad cefamicinasa, más sensible a la acción del sulbactam que a la del ácido clavulánico, lo que sugería que se podría tratar de una enzima de clase C. Sin embargo, años más tarde se documentó la enzima AmpC de localización plasmídica (pAmpC) ^(18, 22).

Actualmente a nivel mundial se proponen una serie de medidas que conlleven a detener el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos, o a su dispersión como patógenos en el ámbito ambulatorio como en el nosocomial.

2.2 Estructura básica de las bacterias

2.2.1 Citoplasma. Es un gel amorfo compuesto de agua, enzimas, sustancias nutritivas, desechos y gases, y contiene estructuras celulares como ribosomas, cromosoma y plásmidos.

2.2.2 Membrana citoplasmática. El citoplasma de todas las células bacterianas está rodeado por una membrana. La membrana citoplasmática bacteriana se ubica dentro de la capa de peptidoglucano de la pared celular en las bacterias grampositivas y adyacente al espacio periplásmico en las bacterias gramnegativas. La membrana citoplasmática cumple varias funciones que están relegadas a los orgánulos intracitoplasmáticos, contiene también enzimas que son activas en procesos básicos de la bacteria. ^(19, 25)

2.2.3 Pared celular. La pared celular bacteriana provee la rigidez estructural, le confiere la forma a la célula y constituye una barrera física contra el ambiente exterior. El componente rígido de la pared celular de las bacterias se compone de peptidoglucano.

El peptidoglucano consta de un esqueleto de hidratos de carbono alternados de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, a los residuos de N-acetilmurámico se unen tetra péptidos cortos y a su vez los tetra péptidos están unidos entre sí por péptidos que forman entrecruzamientos entre las hebras de peptidoglucano adyacentes.

Algunos antibióticos tienen como blanco a la pared bacteriana por lo que el mecanismo de formación de esta, es uno de los mecanismos más estudiados para el desarrollo de nuevos antibióticos (Figura 1). ^(19, 25, 33)

a) Pared celular de bacterias grampositivas. La pared celular de estas bacterias tiene un espesor de casi 80 nm y está compuesta en su mayor parte por varias capas de peptidoglucano. Atrapadas dentro de esta matriz de peptidoglucano hay diversas proteínas, polisacáridos y ácidos teicoicos.

b) Pared celular de bacterias gramnegativas. La pared de estas bacterias es más delgada que la de las bacterias grampositivas, pero es más compleja desde el punto de vista estructural. (Figura 2)

Inmediatamente afuera de la membrana citoplasmática está el espacio periplásmico. Este espacio contiene enzimas degradativas y proteínas transportadoras y de unión específica para vitaminas, aminoácidos e iones. Una capa única de peptidoglucano gruesa forma el borde externo del espacio periplásmico. ^(24,36)

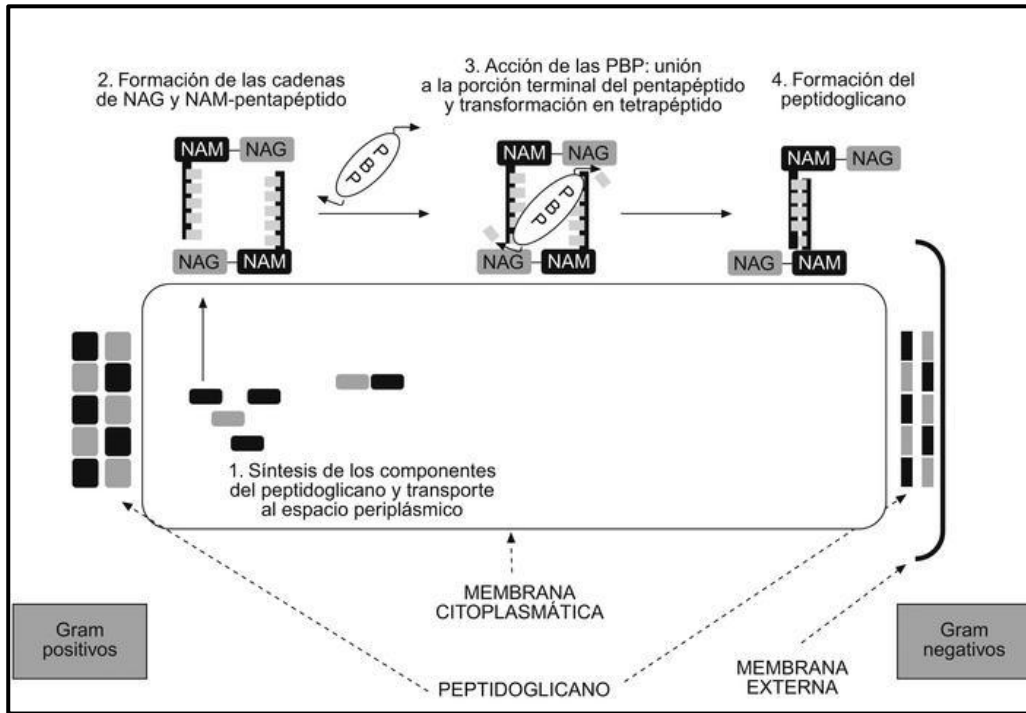


Figura 1. Etapas de formación de la pared

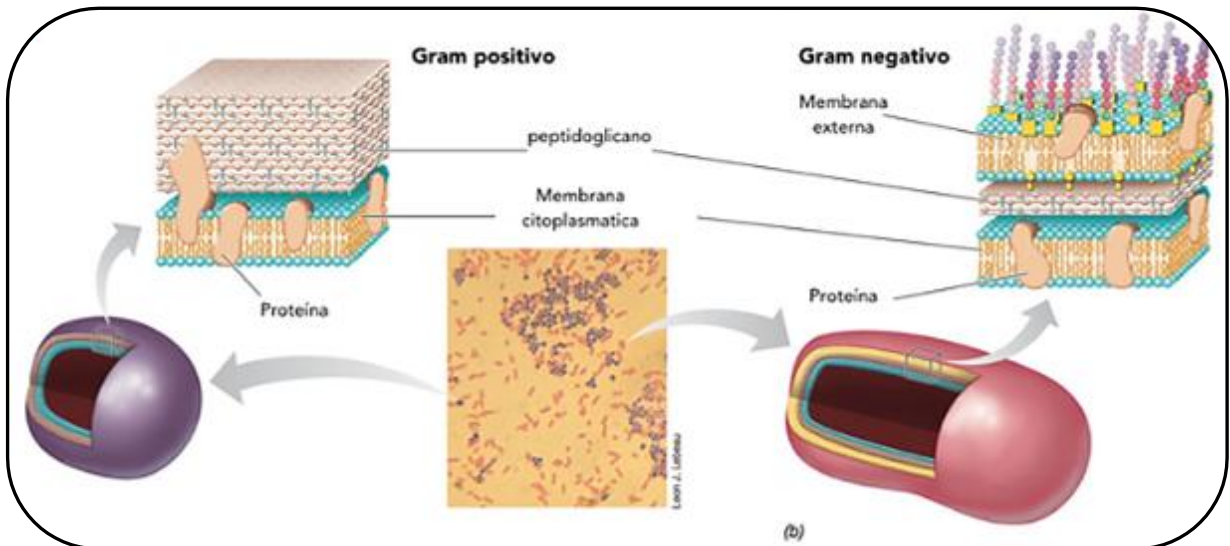


Figura 2. Pared celular bacterias grampositivas y gramnegativas y su tinción de Gram. ⁽²⁴⁾

2.3 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativa. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales incluyendo al ser humano.

Los géneros principales incluidos en esta familia son: *Shigella*, *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia*.⁽²⁵⁾

Antes de la llegada de los antibióticos las enfermedades infecciosas producidas por enterobacterias estaban bastante bien definidas. Se sabía que los síndromes diarreicos y disentéricos, acompañados de fiebre eran provocados por especies de *Salmonella* y *Shigella*. También que los casos de neumonía caracterizados por esputo rojo ladrillo eran causados por *Klebsiella pneumoniae*. *Escherichia coli*, diversas especies de *Proteus* y *Enterobacter* se aislaban de las heridas abdominales luego de intervenciones quirúrgicas gastrointestinales. Por lo tanto, las Enterobacterias pueden estar implicadas en cualquier tipo de enfermedad infecciosa y recuperarse de cualquier muestra recibida en el laboratorio.⁽³⁶⁾

2.3.1 Infecciones extra intestinales por enterobacterias

- **Infecciones urinarias.** Si bien el sitio más importante de colonización normal de las enterobacterias es el tracto gastrointestinal, el sitio más común de infección es el tracto urinario. *E. coli* es la causa más frecuente de infección urinaria. El factor más importante del huésped involucrado en la infección urinaria, es la obstrucción del flujo urinario normal (hipertrofia prostática, anomalías congénitas, etc.) o la presencia de un cuerpo extraño (sondaje vesical). Dada su alta incidencia y el empleo de antibióticos que suponen, las infecciones de tracto urinario tienen gran relevancia socioeconómica y sobre la generación de resistencias antibióticas.
- **Infecciones respiratorias.** Las infecciones del tracto respiratorio suelen ser oportunistas. En los pacientes con enfermedades graves, la alteración de la fisiología permite la colonización de la vía respiratoria y gástrica. El cuadro clínico suele ser el de una bronconeumonía que compromete más a los lóbulos inferiores. La tasa de mortalidad es alta (50% o más) favorecida sobre todo porque afecta a personas inmunocomprometidas.
- **Infecciones del sistema nervioso central.** Los neonatos, durante su primer mes de vida están particularmente predispuestos a la meningitis bacteriana. *E. coli* y los estreptococos del grupo B son responsables de la mayoría de los casos. En la población adulta la meningitis por *E. coli* se observa asociada a inmunodepresión, edad superior a 60 años, manipulación quirúrgica previa.

2.4 Antibióticos

Se define como antibiótico a las sustancias capaces de reconocer ciertos sitios de la estructura bacteriana y al unirse a ellos producen la pérdida de la función correspondiente. ⁽⁹⁾ Atendiendo a su efecto antibacteriano, pueden ser bactericidas (ejercen una acción letal, llevando a la lisis bacteriana) o bacteriostáticos (impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana). ⁽⁴⁾

2.4.1 Antibióticos Betalactámicos

Estructura química

Es una amplia familia de antibióticos bactericidas y uno de los grupos más numeroso y de mayor utilización en clínica, que incluye las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. La presencia del anillo betalactámico (Figura 3) define químicamente a esta familia de antibióticos.

Para que el betalactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales, la asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos. ⁽³¹⁾

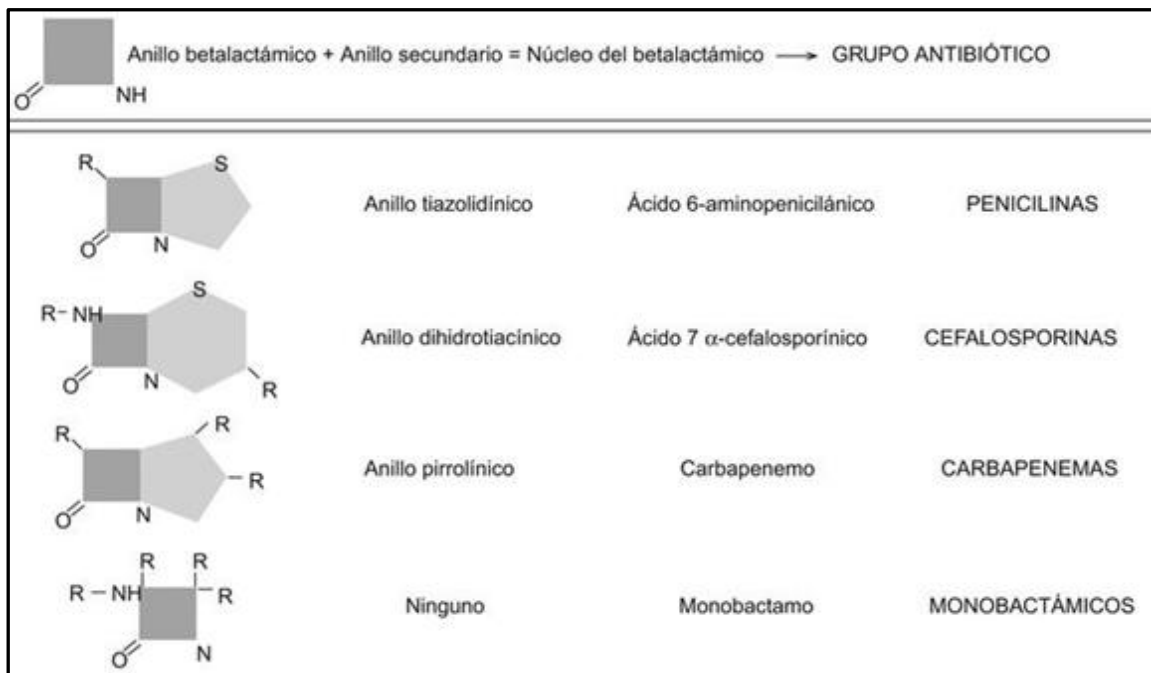


Figura 3. Estructura de los diferentes grupos Betalactámicos

Clasificación de los Betalactámicos

El espectro de los betalactámicos incluye a bacterias que contengan en su estructura a la pared celular, y se pueden clasificar en cuatro grupos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenémicos y Monobactámicos.⁽²⁵⁾

2.4.1.1 Penicilinas

El término penicilina se usa para denominar a un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético, contienen un anillo betalactámico y un anillo tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico que es el núcleo base para el resto de las Penicilinas, (6-APA).

Penicilinas Naturales

- a) Bencilpenicilinas. La bencilpenicilina o penicilina G, madre de la mayoría del resto de las penicilinas, tiene un grupo fenilacetamido enlazado al 6-APA. Es activa contra bacterias grampositivas y *Neisseria spp*^(1,12).
- b) Fenoxipenicilinas. La fenoximetilpenicilina o penicilina V se introdujo en 1954 y es una penicilina semisintética, aunque se considera natural. Tiene un grupo fenoxiacetamido unido al 6-APA y es estable en medio ácido, por lo que se administra por vía oral. Se usa en infecciones moderadas por bacterias grampositivas sensibles⁽¹²⁾.

Penicilinas Sintéticas

- a) Aminopenicilinas. La ampicilina, la cual tiene un grupo D (-)-a-aminofenilacetamido fue descubierta en 1961 y fue la primera aminopenicilina. Su espectro de acción es mayor que el de la bencilpenicilina. Es menos activa contra bacterias grampositivas, pero es activa contra algunas gramnegativas, como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* y *Salmonella spp*.
- b) Carboxipenicilinas. La carbenicilina, la cual tiene un grupo carboxifenilacetamido se introdujo en el mercado en 1969 y fue la primera penicilina antiestafilocócica. Posee una actividad similar a la de la ampicilina (la mayoría de los cocos grampositivos, excepto los estafilococos resistentes a la bencilpenicilina, *E. coli* y *P. mirabilis*).
- c) Isoxazolilpenicilinas. Las isoxazolilpenicilinas, entre las que se hallan la cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina y oxacilina. Son activas frente a *Streptococcus pneumoniae*,

estreptococos del grupo A y *Staphylococcus epidermidis* sensibles; sin embargo, son ineficaces frente a enterococos y bacilos gramnegativos.

- d) Ureidopenicilinas. Las ureidopenicilinas, en general, son más activas frente a los enterococos que las carboxipenicilinas y, al igual que éstas, se deben reservar para las infecciones graves.

2.4.1.2 Cefalosporinas

Las cefalosporinas, al igual que las penicilinas, son estructuras betalactámicas donde el anillo tiazolidínico pentagonal característico de la penicilina, es reemplazado por un anillo hexagonal de dihidrotiazina, que le confiere a la molécula la capacidad de ser resistente a algunas enzimas bacterianas ^{6,3}. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales de este anillo origina las diversas cefalosporinas y estas a su vez se han clasificado dependiendo su espectro antibacteriano, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de Cefalosporinas ⁽¹⁾

GENERACIÓN	EJEMPLOS	ESPECTRO ANTIBACTERIANO	ESTABILIDAD FRENTE A BETALACTAMASAS
PRIMERA	Cefalotina Cefazolina Cefalexina Cefadroxilo	Efectivos exclusivamente para grampositivos	+
SEGUNDA	Cefamadol Cefoxitina Cefaclor Cefuroxima	Menor potencia con grampositivos Mayor acción sobre gramnegativos	++
TERCERA	Cefotaxima Ceftriaxona Ceftizoxima Ceftazidima Cefoperazona	Amplio espectro gramnegativo Moderada actividad y grampositiva	+++
CUARTA	Cefepima	Amplio espectro de actividad gram positivos y negativos	++++

Con el aislamiento del grupo básico, el ácido 7- aminocefalosporínico y con el agregado de diferentes cadenas laterales fueron obteniéndose una gran diversidad de derivados semisintéticos con una actividad antibacteriana mucho mayor que la sustancia madre. Las modificaciones en la posición 7 del núcleo están asociadas a cambios en las propiedades

antibacterianas y las sustituciones en la posición 3 del anillo dihidrotiazínico se asocian a cambios en el metabolismo y farmacocinética del medicamento. Las cefalosporinas son relativamente estables y resistentes a las penicilinasas, ya que tienen una estructura más compleja que le confiere una mayor estabilidad,⁽³⁷⁾. Figura 4

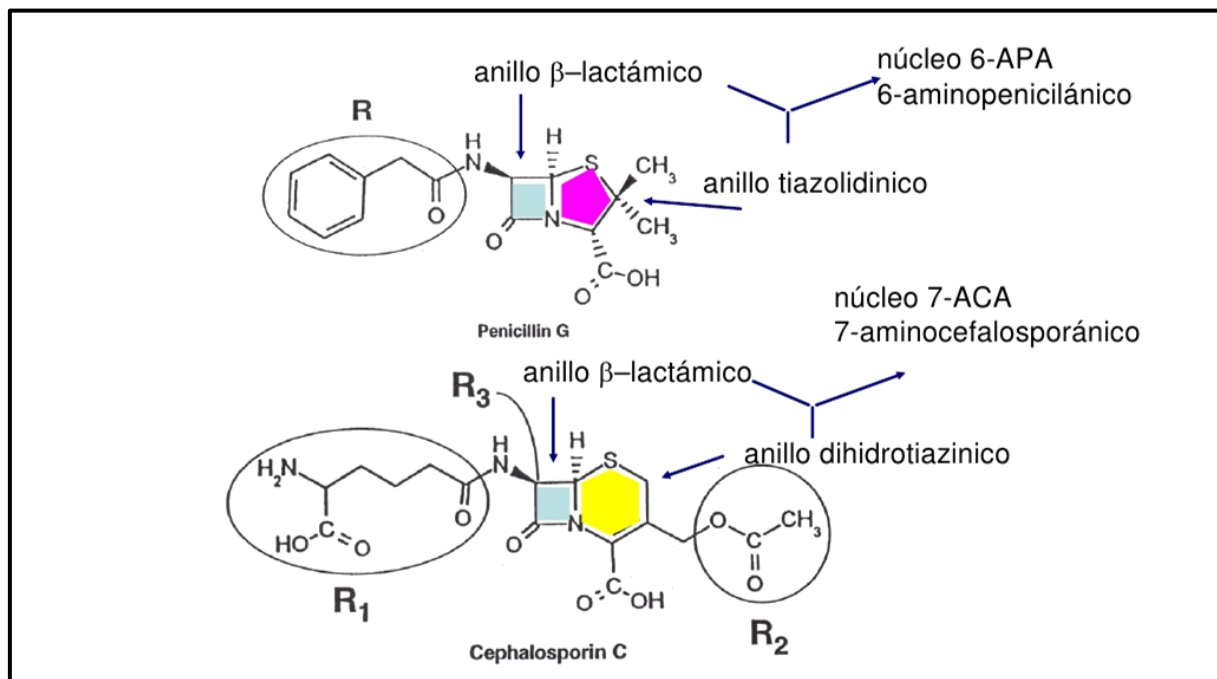


Figura 4. Estructuras de Penicilina y Cefalosporinas.⁽⁷⁾

Como ya se mencionó tenemos; cambios en la posiciones 3 y 7 de la estructura básica de las cefalosporinas, le conferirán características correspondientes a cada una. Por ejemplo: la presencia de un grupo iminometoxi en la posición 7 da como resultado a la cefuroxima, la ceftazidima tiene un grupo propilcarboxil en este sitio que produce mayor actividad frente a la *Pseudomona* pero reduce en grado mínimo su actividad contra microorganismos grampositivos^(4,7).

La cefoxitina y el cefotetán se distinguen por la presencia de un grupo metoxi en la posición 7 que al hablar en sentido estricto las identifica como cefamicinas, este grupo confiere resistencia a las betalactamasas de los gérmenes gramnegativos, aunque reduce la afinidad por las proteínas fijadoras de penicilinas.^(27,37)

2.4.1.3 Carbapenemicos

El Imipenem es la estructura patrón del grupo está formado por un biciclo formado por un anillo Betalactámico y otro pirrolidínico (Figura 3). Los distintos carbapenems son fruto de

sustituciones en 1 y 2. Son resistentes a la hidrólisis de casi todas las Betalactamasas y poseen el espectro antimicrobiano más amplio entre todos los Betalactámicos ^(14, 31).

2.4.1.4 Monobactámicos

Son fármacos que presentan el mismo mecanismo de acción que el resto de los Betalactámicos, son derivados del ácido 3-aminobactámico. Tienen una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario.³⁰

2.4.1.5 Inhibidores de Betalactamasas

Son moléculas que contienen en su estructura un anillo betalactámico. No tienen casi ninguna acción antibiótica, pero presentan una gran afinidad por las betalactamasas, se fijan a ellas inactivándolas, evitando así la destrucción de los antibióticos Betalactámicos por dichas enzimas. ^(7, 12, 30)

Un ejemplo de inhibidor de Betalactamasas es el Ácido Clavulánico que en su estructura química presenta un anillo betalactámico unido a un anillo oxazolidinico. (Figura 5)



Figura 5. Estructura de inhibidor de betalactamasas

Mecanismo de acción

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana (Figura 6) motivo por el cual este tipo de antibióticos funciona cuando la bacteria está en fase logarítmica y no en fase latente. La pared bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias de todos los géneros, excepto los micoplasmas; se sitúa por fuera de la membrana citoplásmica y está compuesta principalmente por un polímero llamado peptidoglucano, el principal componente en las bacterias grampositivas. Las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas, y de una capa interna delgada de peptidoglucano ^(11, 17, 35).

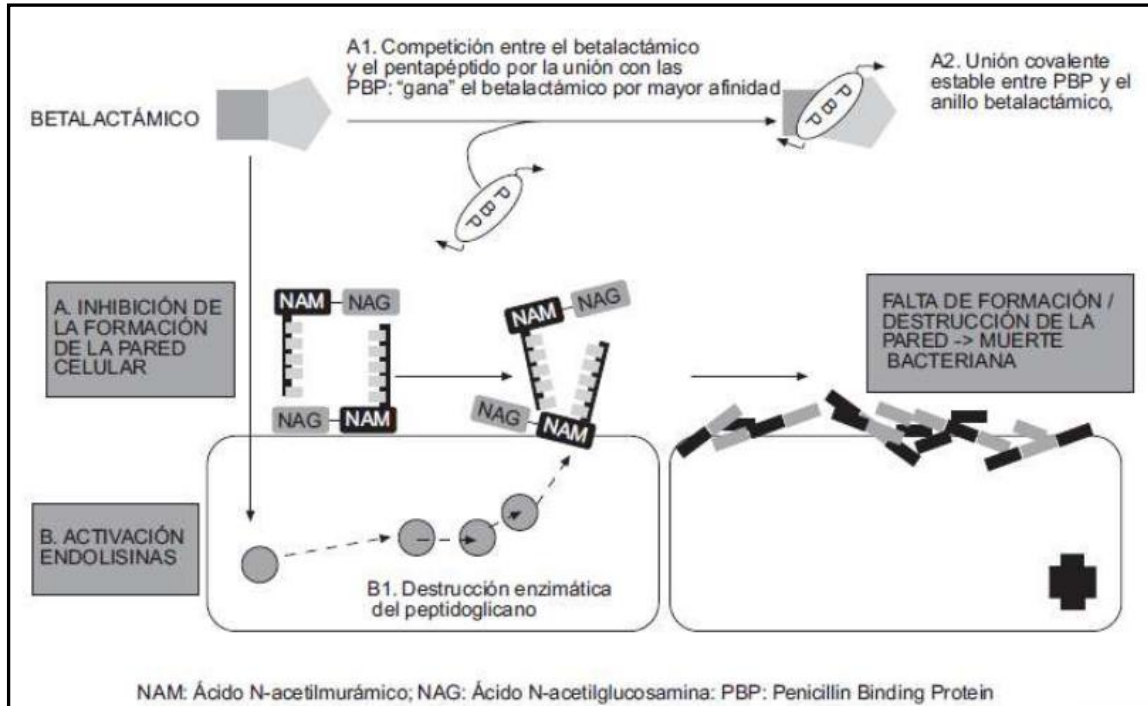


Figura 6. Mecanismo de acción de los Betalactámicos

2.5 RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

2.5.1 Resistencia Natural

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprim sulfametoxazol ⁽³³⁾.

2.5.2 Resistencia adquirida

La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de ésta (plásmidos, trasposones, integrones). En el primero se dan casos tales como la transformación de una Betalactamasa en una Betalactamasa de espectro extendido o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo.

Los plásmidos y trasposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia. Por otro lado los trasposones son secuencias de DNA que pueden ser trasladados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a

un sistema de recombinación propio; esto sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra, durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia ^(3, 33).

2.5.3 Mecanismos de resistencia

Entre los mecanismos de resistencia, a antibióticos betalactámicos, que las bacterias han desarrollado podemos encontrar:

Modificaciones de las proteínas fijadoras de Penicilinas: La modificación de las proteínas PBP disminuye la afinidad de interacción. El sitio blanco de todos los betalactámicos son las PBP, macromoléculas que son parte de la membrana citoplasmática y participan en la síntesis de la pared bacteriana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los betalactámicos.

Inactivación enzimática del antibiótico: La bacteria produce enzimas Betalactamasas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico. Es el mecanismo de resistencia que más utilizan las bacterias contra los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos). La resistencia surge de estímulos naturales o mutaciones en los genes cromosómicos o de la adquisición de elementos genéticos extracromosomales (plásmidos o transposones). ⁽³⁾

Alteración de la permeabilidad por reducción de las porinas en la pared bacteriana: Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de las bacterias gramnegativas que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Los antibióticos betalactámicos llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión dando origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas ^(6, 30).

Mecanismo de eflujo: Las bombas de flujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos, la expulsión del antibacteriano contribuye al aumento de la CMI ^(26, 30, 32).

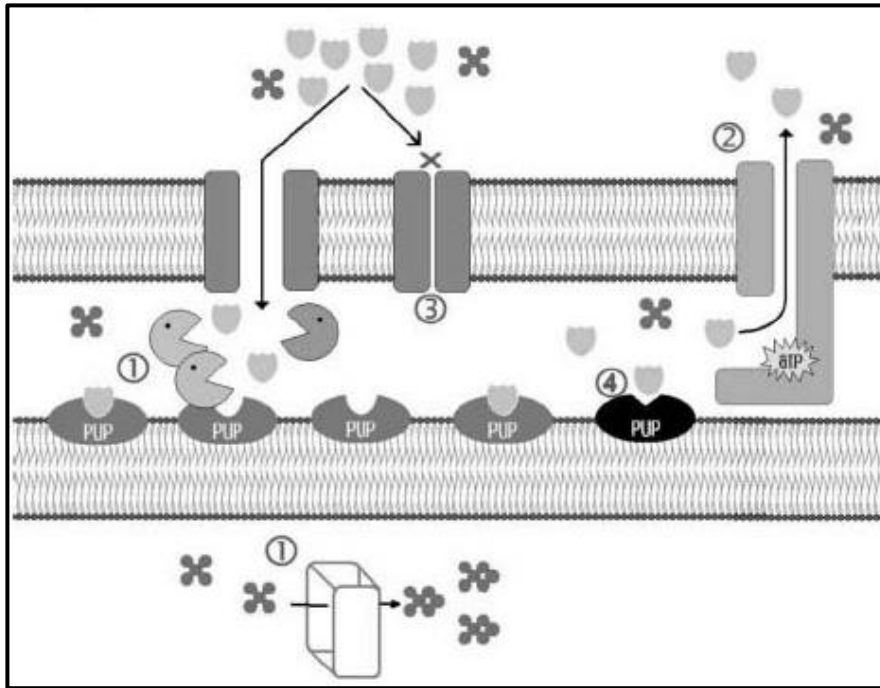


Figura 7. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de eflujo. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas unidoras de penicilinas. ⁽³⁴⁾

2.6 BETALACTAMASAS

De los anteriores mecanismos las betalactamasas son la principal causa de resistencia. Las betalactamasas son enzimas catalíticas que rompen el enlace amídico del anillo betalactámico (Figura 8) haciendo que el antibiótico pierda su capacidad para unirse a las proteínas de unión a la penicilina y su acción bactericida ⁽⁶⁾.

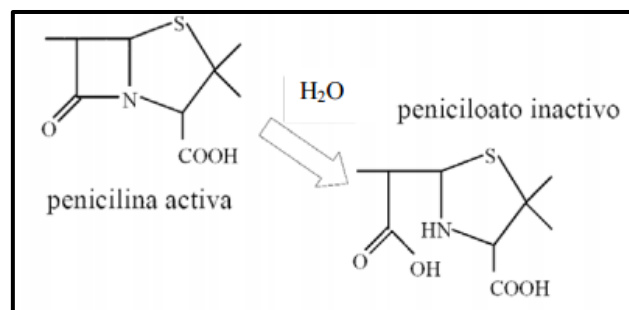


Figura 8. Forma activa e inactiva de Betalactámico

2.6.1 Clasificación de Betalactamasas

Actualmente se cuentan con dos clasificaciones importantes: la clasificación de Ambler que divide las betalactamasas en cuatro clases (A-D). Se basa en la homología de sus proteínas. Las clases A, C y D son serino-betalactamasas que tienen como sitio activo un aminoácido

serina, y la clase B son metalo-betalactamasas, que requieren metales bivalentes como el Zinc para poder activarse ^(6,18)

La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros también consta de cuatro grupos según las características funcionales y a su vez se van distinguiendo subgrupos, teniendo en cuenta distintos criterios como las propiedades bioquímicas, las propiedades físicas, la codificación etc. Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de la clasificación de betalactamasas. ²⁰

Grupo Bush-Jacoby	Clase molecular Ambler	Sustratos preferidos	Principales características
1	C	Cefalosporinas	Serino-betalactamasas. Hidrolisis a cefalosporinas
2^a	A	Penicilinas	Serino-betalactamasas. Mejor hidrólisis de bencilpenicilina que de cefalosporinas
2b	A	Penicilinas,Cefalosporinas	Hidrólisis similar de cefalosporinas y bencilpenicilina
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Hidrólisis incrementada hacia cefatazidima y otros oximinobeta-lactámicos
2c	A	Carbencilinas	Hidrólisis incrementada de la Carbencilina
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Hidrólisis de cloxacilina o oxacilina y oximino-beta-lactámicos
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibido por ácido clavulánico pero no por aztreonam
2f	A	Carbepenems	Hidrólisis incrementada de carbapenems, oximino-beta-lactámicos, cefamicinas
3	B	Carbepenems	Metalobetalactamasas. Hidrólisis de espectro extendido incluyendo carbapenems
4	-	Penicilinas	Serino-betalactamasas. B. cepacia

2.7 Betalactamasas de Espectro Extendido

De entre todas las betalactamasas descritas hasta el momento, las enzimas que más han sido estudiadas son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE); se definen como enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos, pero no las

cefamicinas o los carbapenémicos. Se caracterizan por ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas de clase A; sus determinantes genéticos se encuentran generalmente en plásmidos y derivan de otras betalactamasas con menor espectro hidrolítico^(9, 21).

Las cefamicinas se han mostrado estables frente a las hidrólisis por las BLEE, sin embargo, el riesgo de desarrollo de resistencia durante el tratamiento por la aparición de otros mecanismos de resistencia, como mutación de porinas y emergencia de otras betalactamasas (AmpC), hace que no se recomiende su utilización como primera línea frente a las cepas productoras de BLEE⁽²⁶⁾.

2.7.1 Método de tamizaje para detección de Betalactamasas de espectro extendido

Difusión en agar y micro dilución

La prueba fenotípica de confirmación estandarizada por el CLSI explora la sensibilidad a cefotaxima y ceftazidima con/sin ácido clavulánico mediante difusión en agar con discos o microdilución en caldo. En el primer caso se requieren discos de cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg) y otros con los mismos antibióticos adicionados de ácido clavulánico (10 µg). En el caso de realizar microdilución en caldo, es necesario probar concentraciones de ceftazidima de 0.25-128 µg/ml y de cefotaxima 0.25-64 µg/ml, y concentraciones de ceftazidima/ácido clavulánico de 0.25/4-128/4 µg/ml y de cefotaxima/ ácido clavulánico de 0.25/4-64/4 µg/ml. Se confirma la presencia de una BLEE cuando la sensibilidad a cualquiera de los dos antibióticos en presencia de ácido clavulánico aumenta más de 5 mm el diámetro de inhibición o produce una reducción de más de 3 diluciones en la concentración mínima inhibitoria. Siendo que el CLSI no tiene en cuenta la detección de BLEE en enterobacterias diferentes a *E. coli*, *Klebsiella* y *Proteus*, considerando que la sensibilidad encontrada para enterobacterias productoras de AmpC utilizando estos dos antibióticos es baja, algunos autores recomiendan incluir cefepima/cefepima-ácido clavulánico.^(5, 10)

Prueba de sinergia de doble disco

La prueba de sinergia de doble disco fue el primer método propuesto para el cribado de BLEE. Se lleva a cabo en medio sólido, situando un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20 µg/10 µg), y entorno a éste, separados 30 mm (de centro a centro), se disponen discos de cefotaxima (o ceftriaxona), ceftazidima y aztreonam, con una carga estándar de 30 µg. La ampliación del halo de inhibición de los discos colocados alrededor del de amoxicilina-ácido clavulánico indica la producción de una BLEE.⁽⁵⁾

Confirmación fenotípica mediante Etest

El método de las microdiluciones diseñado por el CLSI puede ser sustituido por el uso de tiras de Epsilon-test (Etest). Para detectar BLEE se utilizan un conjunto de tiras de Etest que contienen una concentración creciente de la cefalosporina correspondiente (cefotaxima, ceftazidima o cefepima), por un lado, y una concentración creciente de la misma cefalosporina asociada a una concentración constante de ácido clavulánico (4 µg/ml), por el otro. Si se observan colonias en los halos de inhibición, el valor de la CMI deberá determinarse observando cuál es la CMI a la que todas las mutantes han sido inhibidas. Si no se siguen estas reglas, la sensibilidad de la técnica disminuye. ^(5, 8)

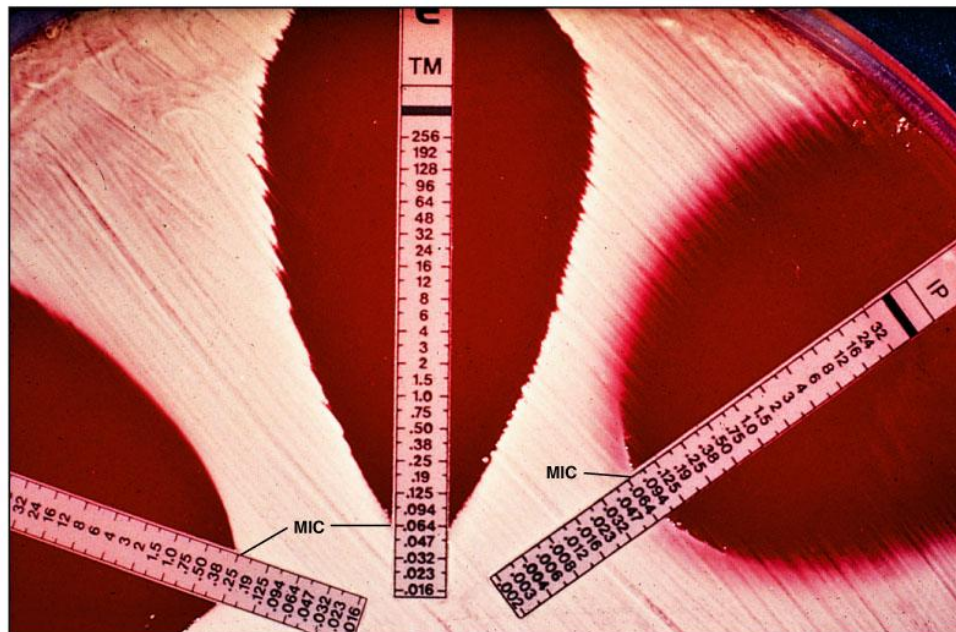


Figura 9. Halos de inhibición Tiras E-test

2.8 Betalactamasas AmpC

El mecanismo principal de resistencia a Betalactámicos en enterobacterias es la producción de enzimas hidrolíticas denominadas Betalactamasas.

Las betalactamasas AmpC pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby- Medeiros y a la clase C de la clasificación estructural de Ambler. Se caracterizan por ser activas frente penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas (cefotaxima y cefotetan), oximinocefalosporinas ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) y monobactams (aztreonam) con la excepción de cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y carbapenémicos. Muchos miembros de la familia Enterobacteriaceae poseen Betalactamasas cromosómicas naturales. ⁽²⁸⁾

Su descubrimiento data tan solo unos años después de la aparición de las Betalactamasas de espectro extendido BLEE, en 1989 en Corea del Sur describieron una cepa que podía transferir resistencia a Cefoxitina, Cefotetan, penicilinas, oximinocefalosporinas y monobactams desde *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*, se dieron cuenta que no pertenecía a las Betalactamasas conocidas. La enzima fue denominada blaCMY-1 por su actividad cefamicinasa, era más sensible a la acción del sulbactam que a la del ácido clavulánico, lo que sugería que se podría tratar de un enzima de clase C. ^(12, 28)

Sin embargo, la primera AmpC de localización plasmídica (pAmpC) fue documentada por Papanicolau y colaboradores que describieron la resistencia transmisible a α -metoxi y oximino- β -lactámicos mediada por una enzima bla, con propiedades químicas propias de β -lactamasas tipo 1 y con una homología del 90% con el gen ampC de *Enterobacter cloacae*. Estudios de la secuencia nucleotídica sugieren que los genes que codifican estas enzimas plasmídicas derivan de genes ampC cromosómicos que poseen algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae y el género *Aeromonas spp*, los cuales han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando su difusión a diferentes microorganismos. ^(28, 29)

2.8.1 Regulación de ampC

Las Betalactamasas AmpC se codifican de manera natural en el cromosoma bacteriano de algunas especies de Enterobacterias, su síntesis es inducible en la mayoría de ellas, bajo alguna inducción pueden hiperproducirse o hiperexpresarse.

La localización de estos genes no solo puede ser cromosómica (cAmpC), si no que el origen también puede ser plasmídico (pAmpC). ⁽¹³⁾

El fenómeno de inducción esta regulado por la presencia del Betalactámico y al menos 5 genes (ampC, ampR, ampD, ampG, ampE), entre los que destacan ampR que es un activador del ampC y por lo tanto se lleva a cabo la síntesis de AmpC, y ampD que metaboliza los productos de degradación que se están produciendo y favoreciendo el reciclaje de la pared bacteriana. ^(13, 28)

2.8.2 Mutaciones e implicaciones

Existen diversas mutaciones que afectan al fenotipo de sensibilidad conferido por las betalactamasas AmpC. Estas mutaciones pueden provocar la sobreexpresión de la enzima, aumentando los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a betalactámicos o incluso aumentar su espectro de hidrólisis. Ciertas sustituciones aminoacídicas, inserciones o deleciones en regiones específicas situadas en la periferia del sitio activo, pueden convertir a

las betalactamasas AmpC en betalactamasas AmpC de espectro extendido (ESAC), lo que implica que la bacteria sea resistente a todo tipo de cefalosporinas, incluso puede ampliar su espectro a Imipenem, de esta manera se puede encontrar la actividad como Carbapenemasa, lo que descartaría completamente la posibilidad de tratamiento con algún Betalactámico a una infección producida por una enterobacteria productora este tipo de enzima. ⁽¹³⁾

2.8.3 Metodos de detección para Betalactamasas AmpC

Resistencia a Cefamicinas

El CLSI no ha reportado un método estandarizado para poder hacer la detección de este tipo de enzimas, señala que el espectro de hidrólisis de antibióticos es similar al de las Betalactamasas de espectro extendido con la diferencia de que las Betalactamasas AmpC inactivan a las cefamicinas, por lo tanto las bacterias con resistencia a Cefoxitina y/o Cefotetán contienen Betalactamasas de tipo AmpC. ⁽¹⁰⁾

Algunos investigadores alrededor del mundo investigan este tipo de enzimas, y es como se tienen distintos métodos para la detección de estas enzimas:

Test tridimensional (3D)

Es una adaptación del test modificado de Hodge, recomendado por primera vez por el CLSI en el año 2009 como test fenotípico de confirmación de presencia de carbapenemasas. Se coloca un disco de cefoxitina 30µg en una placa de agar Müller- Hinton inoculada con la cepa ATCC 25922. Se realiza un corte con bisturí sobre el agar de manera que se haga una rendija de unos 5 mm desde el borde del antibiótico hacia el exterior en dirección radial. Se depositan 30 µl de la suspensión bacteriana con pipeta en la rendija. Se incuba 24h a 35°C. Una distorsión en el halo de Cefoxitina se considera como positiva a la enzima Betalactamasa AmpC. ⁽⁵⁾

Técnica de detección con discos AmpC (Black y col.)

Este método está basado en el uso de Tris-EDTA para permeabilizar la célula bacteriana y liberar las betalactamasas al medio externo. Los discos AmpC se preparan aplicando 20µl de una mezcla 1:1 de Tris-EDTA 100X y solución salina fisiológica estéril (SSFE), a discos de papel de filtro previamente esterilizados. Una vez preparados se dejan secar y se guardan en refrigeración hasta su uso. Seguidamente, se inocula una placa con agar Mueller-Hinton según el método de difusión con discos, con la cepa ATCC 25922 de *E. coli*. Los discos preparados en el paso anterior, se rehidratan con 20µl de SSFE y se le aplican colonias de la cepa a estudiar. Posteriormente, se coloca un disco de cefoxitina (30µg) y, los discos AmpC ya inoculados, se ubican muy cercanos pero sin tocar el borde del disco de cefoxitina. La

aparición de una distorsión de la zona de inhibición, indica inactivación de la cefoxitina por parte de la AmpC (AmpC +), y la ausencia de distorsión representa un resultado negativo (AmpC -). Esta técnica mostró un 100% de sensibilidad y 98% de especificidad. ^(15, 28, 33)

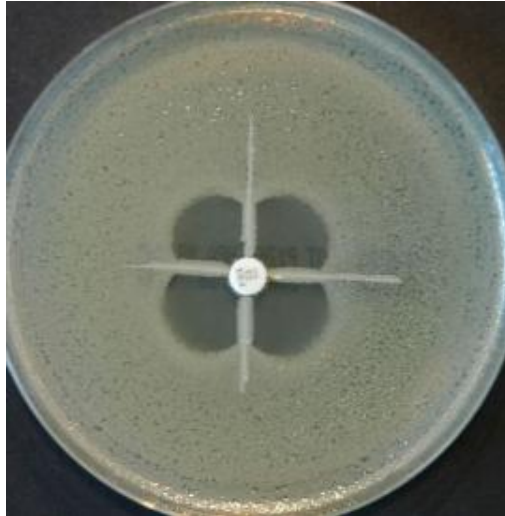


Figura 10. Distorsión en el halo de Cefoxitina por una bacteria productora de AmpC

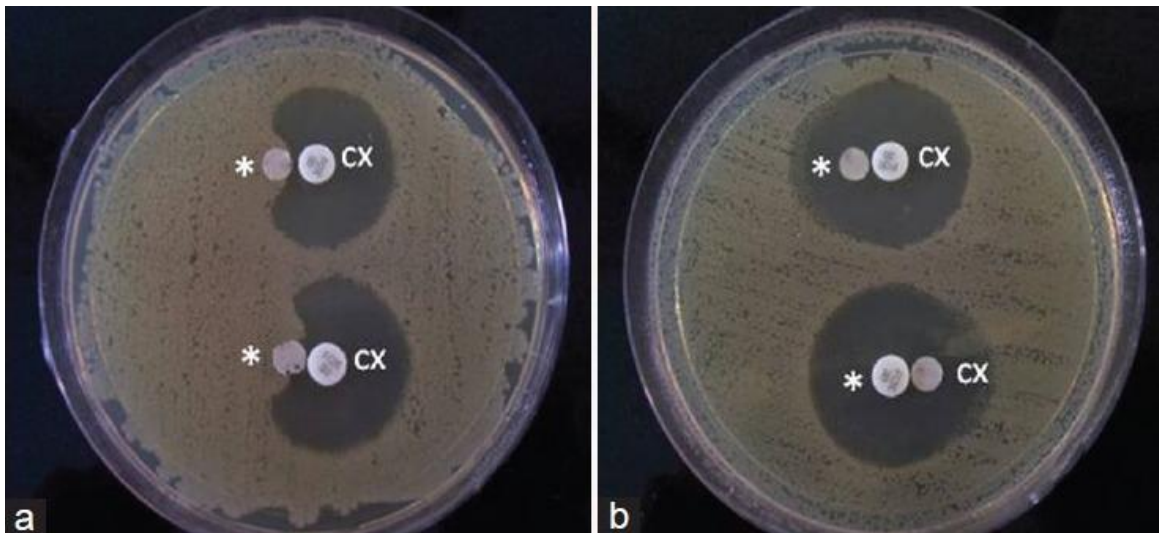


Figura 11. Representación de prueba Tris: EDTA, Betalactamasas tipo *AmpC*. (a) la zona de inhibición muestra resultados positivos. (b) la distorsión del halo no muestra inhibición por lo tanto el resultado es negativo.

Inhibidores de Betalactamasas de clase C

Básicamente, hay moléculas con estructura Betalactámica, como cloxacilina y moléculas con estructura no Betalactámica como los derivados del ácido borónico. La cloxacilina y el ácido borónico, y sus derivados, son los inhibidores de AmpC más utilizados.

Los métodos fenotípicos que utilizan cloxacilina como inhibidor de AmpC se basan en:

- a) métodos de sinergia de doble disco usando discos de cloxacilina 500 µg y discos de cefotaxima o ceftazidima evaluando la distorsión de la zona de inhibición entre los discos.
- b) métodos de discos combinados con inhibidores
- c) método de E-test con una tira que contiene cefotetán/cefotetán más cloxacilina, considerando el test positivo con una reducción de al menos tres diluciones de la MIC en presencia de cloxacilina.

La detección de AmpC también puede llevarse a cabo mediante estos dos métodos utilizando ácido borónico y sus derivados. Se han probado diversos derivados del ácido borónico, siendo el más descrito en la literatura el que utiliza discos de cefoxitina y cefotetán (30 µg) solos y suplementados con 20 µl de una solución de ácido fenil-borónico (400 µg), valorando la ampliación del halo en, al menos, 5 mm. ⁽²⁸⁾

2.9 BLEE y AmpC

A diferencia de los clásicos productores de BLEE, los productores de AmpC son resistentes a cefoxitina. Un problema de importancia clínica potencial en el futuro es la presencia de enzimas BLEE en aislados con productores de AmpC, hecho que ya ocurre en América Latina. El problema de algunas enterobacterias productoras de betalactamasas de tipo AmpC, es que pueden interferir en el diagnóstico correcto de las BLEE, enmascarando su detección al responder de la misma manera al cribado. Es el caso de:

- a) AmpC cromosómica inducible, a veces incluso desreprimida.
- b) AmpC cromosómica hiperproducida por mutaciones.
- c) AmpC plasmídicas, potencialmente presentes en todas las enterobacterias.

En estos casos se puede incluir en la prueba de sinergia un disco de cefepima, cefalosporina de cuarta generación menos afectada por las resistencias de tipo AmpC. ^(28, 29)

A continuación se muestran los patrones de resistencia y sensibilidad las principales bacterias productoras de betalactamasas ^(10, 22, 28).

Tabla 3. Comparación de sensibilidad o resistencia, Betalactamasas de espectro extendido BLEE y Betalactamasas tipo AmpC

Fenotipo	AM	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G	C4G	CARB	Bush-Jacoby/Ambler
BLEE	R	V	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	2be,2de/A,D
AmpC	R	R	R	r/R	R	R	R	r/R	S	S	1/C

AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; TIC, ticarcilina; PIP, piperacilina; C1G, cefalosporinas de primera generación; FOX, cefoxitina; CXM, cefuroxima; C3G, cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos; C4G, cefalosporinas de cuarta generación; CARB, carbapenémicos; V, variable; S, sensible; R, resistente; r, halos reducidos o CMI elevadas con respecto al fenotipo salvaje, pero dentro del rango de sensibilidad.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Epidemiología Betalactamasas de Espectro Extendido

Los primeros casos de enterobacterias productoras de BLEE fueron detectados en Europa en concreto en Alemania e Inglaterra desde el año de 1983.

Actualmente en todo el mundo el aislamiento de enterobacterias productoras de BLEE, difiere según el área geográfica.

En 2008 en Europa y particularmente en España, se investigaron los aislamientos clínicos positivos a enterobacterias, los resultados que obtuvieron positivos para la producción de BLEE son los siguientes: *Escherichia coli* (18%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Enterobacter cloacae* (3%), *Enterobacter aerogenes* (2%).^(5, 15, 17)

Las cifras que se reportan en América dependen de la región, en Estados Unidos el aislamiento de enterobacterias con producción de BLEE oscila entre el 21- 30 %, en particular en América Latina los porcentajes difieren un poco en cuanto a la zona geográfica. Un estudio en 2008 en los países de Argentina, Brasil, Chile y México revelan los porcentajes de aislamientos en enterobacterias productoras de BLEE, para *Klebsiella pneumoniae* el porcentaje oscila entre el 33.3% (México), y 60.4% (Argentina), mientras que para *Escherichia coli* las cifras son; 12.8% (Brasil) y 48.4% (México)^(22,27). El último reporte que se tiene del área es del año 2011 según (SMART) Análisis de Seguimiento de

Tendencias de Resistencia a los antimicrobianos en el que participaron 10 países de América Latina se obtuvo que el 26.8% de *Escherichia coli* y 37.7% de *Klebsiella pneumoniae* fueron productores de BLEE

Por otra parte un estudio realizado en México durante los años 2010-2011 en un hospital de Guerrero. En cuanto al aislamiento de enterobacterias, revela que de 115 cepas de Enterobacterias, *Escherichia coli* fue el principal agente etiológico aislado en un 75 %, *Proteus mirabilis* en un 8%, *Klebsiella sp* se aisló en un 7%, también se aislaron algunas especies de *Citrobacter sp* con un 4%, *Enterobacter sp*, *Morganella morganii*, *Providencia rustgiani* y *Shigella sp* con un porcentaje menor.

El estudio también revela que de las cepas *E. coli* analizadas, el 21% fueron productoras de BLEE⁽⁸⁾.

En la región de Asia y el Pacífico durante el año 2012, se realizó en Corea, un estudio con bacilos gramnegativos, encontrando el 20.3 % de portadores de BLEE. Por otra parte en la

India para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* fueron 79%, 69.4% y 100%, respectivamente, mientras en China las tasas de BLEE para *Escherichia coli* fue de 55% y en Tailandia fue de 50.8%.

En Japón un estudio similar determinó un 69.3% de enterobacterias productoras de BLEE.

Por su parte África en 2012, en un estudio realizado en Túnez y otro en Camerún reportaron un 7.3% y un 6.7% respectivamente para el aislamiento de Enterobacterias con producción de BLEE. ⁽²⁹⁾

3.2 Epidemiología Betalactamasas AmpC

Las betalactamasas de tipo AmpC han sido descritas en todo el mundo, sin embargo no se cuentan con datos exactos de la prevalencia, puesto que no se tiene un método estandarizado de detección.

Desde la primera referencia de Betalactamasas tipo AmpC en Corea (1989), estos aislamientos fueron expandiéndose por todo el país.

En el año de 1994 en New York es detectada por primera vez, la Betalactamasa tipo AmpC; para 2001 se detectaban en hospitales de todo el país y se indicó un aumento del 1.1% al 2.6% de bacterias productoras de AmpC. En un hospital de Seúl en Irlanda, una misma institución sanitaria en un periodo de cinco años, en 2003 reportaba una producción de AmpC en un rango de 2.5% a 2.9%, en 2004 en tres centros hospitalarios del Reino Unido, el 49% de *E. coli* y el 55% de *K. pneumoniae* seleccionados eran productores de AmpC mientras que en Francia, entre 2004 y 2008, del total de *E. coli* estudiadas, el 6% eran resistentes a cefoxitina. En 2005 en un estudio realizado por un programa de vigilancia epidemiológica llamado SENTRY, en el que participaron 30 hospitales norteamericanos, se observó una prevalencia del 0.6% y 0.5%, respectivamente en *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae*, en pacientes no hospitalizados.

El dato que se tiene de América Latina data de Argentina en el que se reportó un porcentaje entre 0.1% y 0.55% de enterobacterias con producción de Betalactamasas tipo AmpC.

En un estudio realizado en Asia para 2008 y 2009 en 5 hospitales, se recabó que la cifra era de 2.6%, en pacientes ambulatorios. ⁽²⁸⁾

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las Enterobacterias son capaces de causar múltiples padecimientos en la población y pueden aislarse de cualquier muestra recibida en el laboratorio. En la última década la aparición y diseminación de enterobacterias resistentes a betalactámicos se ha convertido en una de las principales amenazas para el tratamiento antibiótico de las infecciones, ya que este, es el grupo de antibióticos más utilizado en el tratamiento de una infección. Dicha resistencia se debe a la capacidad de los microorganismos de desarrollar enzimas betalactamasas capaces de hidrolizar a la estructura del anillo betalactámico. El reporte de las Betalactamasas de espectro extendido, ha sido de vital importancia en la orientación del tratamiento antibiótico de una infección.

Actualmente en los aislamientos comienzan a mostrar resistencia a Cefoxitina, y la incidencia con la que se aísla una cepa productora de Betalactamasas, cada vez es más frecuente en el ámbito ambulatorio y en el de hospitalización. Por lo tanto, ¿Existirá la presencia de betalactamasas BLEE y AmpC en una misma bacteria, que confieran mayor resistencia?

5. JUSTIFICACIÓN

Siendo los betalactámicos los antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas, tanto a nivel ambulatorio como a nivel hospitalario es que se plantea hacer el estudio de nuestra población,

En los últimos años se sabe que las bacterias productoras de BLEE han ampliado aun más su espectro de hidrolisis a los betalactámicos, se están reportando bacterias con producción de BLEE, además, resistentes a cefamicina (Cefoxitina), que no correspondería totalmente al perfil de una enzima BLEE. Es como surge la búsqueda de un grupo menos estudiado de betalactamasas; las de tipo AmpC. Las enzimas de tipo AmpC hidrolizan a todos los antibióticos betalactámicos con excepción de cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos.

Por lo antes expuesto no se puede afirmar que con un uso más adecuado de antibióticos las bacterias dejaran de desarrollar mecanismos de resistencia, pero la velocidad con la que lo hacen puede disminuir, además de que el tener el conocimiento de la variedad de Betalactamasa AmpC, brindará un buen diagnóstico de laboratorio y por ende un mejor tratamiento para el paciente.

6. OBJETIVOS:

General:

Búsqueda de la existencia de betalactamasa tipo AmpC asociada a BLEE en Enterobacterias en un hospital de segundo nivel.

Particulares:

- Detectar la prevalencia de las bacterias Betalactamasas de espectro extendido BLEE de los meses: Junio de 2015 a Marzo de 2016
- Determinar la resistencia a cefoxitina, de las cepas proporcionadas por el departamento de Microbiología
- Usar una tecnica de confirmación para la presencia de Betalactamasas tipo AmpC

7. HIPÓTESIS

Hipótesis nula:

Las bacterias productoras de betalactamasas causantes de infecciones, no contienen a la enzima AmpC adicional a las conocidas como BLEE.

Hipótesis alterna:

Las bacterias productoras de betalactamasas causantes de infecciones, si contienen a la enzima AmpC adicional a las conocidas como BLEE.

8. DISEÑO DEL ESTUDIO

8.1 Tipo de estudio

Prospectivo, Observacional, Descriptivo, Transversal.

Universo de estudio

Se recibieron cepas de enterobacterias previamente aisladas por el personal de microbiología del Hospital Universitario Puebla provenientes de Urocultivos, Exudados (vaginales, uretrales, faríngeos, vulvares), Cultivo de sonda, cánulas y catéteres, Cultivos de heridas, Cultivo de secreciones y líquidos corporales; que en el antibiograma reportaron BLEE.

Tamaño de muestra:

Se recolectaron 100 enterobacterias productoras de BLEE en el departamento de Microbiología.

8.4 Sede y lugar del estudio:

Este trabajo se realizó en el Hospital Universitario de Puebla, en el laboratorio de Microbiología

8.5 Criterios de selección:

Se trabajó con cepas de enterobacterias que en el antibiograma presentaron:

Sinergia entre cefalosporinas de 3era generación y ácido clavulánico (Anexo 1)

Bordes de halos de inhibición irregulares en el antibiograma (Anexo 2)

Criterios de exclusión:

Todas las bacterias que no presentaron la sinergia entre cefalosporinas de 3era generación y ácido clavulánico

Bacterias cocos grampositivos y negativos

8.6 Recursos Humanos

En este trabajo fue realizado con la ayuda del personal del área de Microbiología y desarrollado por Mariela Tiego Calvario bajo la supervisión del QFB. Carlos León Vázquez Huachina y M. C. María Susana Pérez Fernández jefa del laboratorio.

8.7 Recursos financieros

Este estudio fue financiado por el Hospital Universitario de Puebla

8.8 Diseño estadístico

El análisis estadístico fue realizado a través de estadística descriptiva (gráficos, tablas), usando el programa de Microsoft Excel.

9. MATERIALES Y METODOLOGÍA

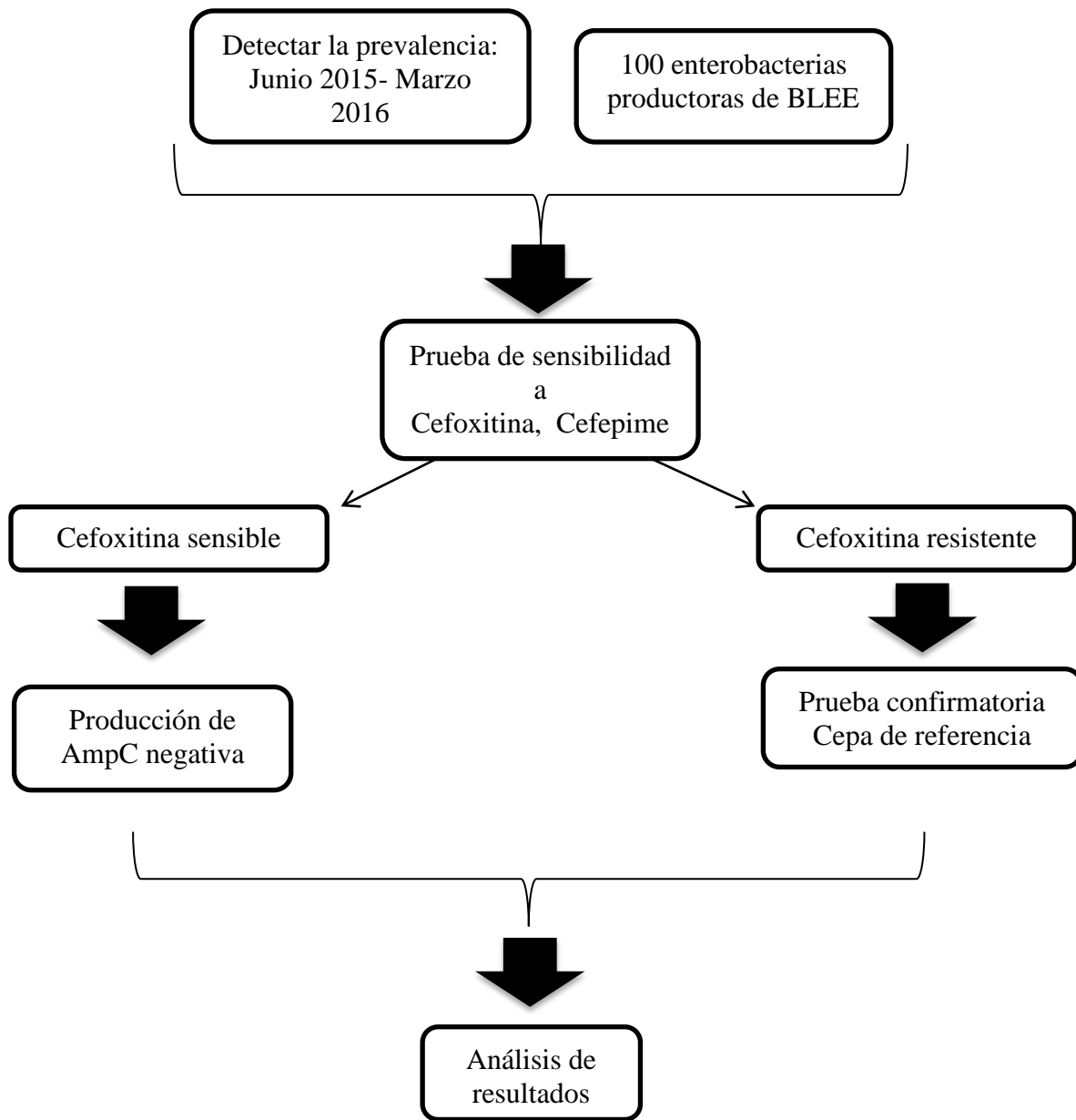
9.1 Material biológico

Cepas de Enterobacterias provenientes de Cultivos de: heridas, secreciones, exudados, sondas, cánulas y catéteres, líquidos corporales, urocultivos, antibióticos utilizados en presentación de unidiscos: Amoxicilina/ácido clavulánico (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Cefuroxima (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Cefepime (30 µg), Meropenem (10 µg), Imipenem (10 µg), cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 (Anexo 3), cepa de referencia *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Anexo 4)

9.2 Metodología

1. Se buscó la información que reveló la prevalencia de las bacterias productoras de BLEE en los meses de Junio de 2015 a Marzo de 2016, en el Hospital Universitario Puebla.
2. Simultáneamente se recolectaron 100 enterobacterias productoras de BLEE, provenientes del área de Microbiología del Hospital Universitario de Puebla.
3. Se usaron los antibióticos Cefepime y Cefoxitina para la sospecha de producción de enzima AmpC.
4. Se seleccionaron aquellas resistentes a Cefoxitina y se procedió hacer la prueba de confirmación para la presencia de Betalactamasa AmpC.
5. Se realizó la prueba de confirmación, inoculando una placa con una cepa sensible a Cefoxitina, colocando un disco impregnado con Tris/EDTA:SSF y la cepa a probar (esquema 2)
6. Simultáneamente se usaron las cepas de referencia, a la que se les realizó el antibiograma como control de calidad de nuestro material (Anexo 5 y 6)
7. Se hizo el análisis de los resultados obtenidos.

Esquema 1. Esquema general de trabajo



Fuente: Diseño del Estudio

9.2 Métodos para la detección de betalactamasas

Prueba de confirmación: sinergia de doble disco

La producción de BLEE se demuestra por la ampliación del halo de inhibición de cualquiera de los indicadores por acción del ácido clavulánico

- a) Seguir el procedimiento estándar para la realización del antibiograma por el método de difusión con discos.
- b) Inocular la placa de agar Mueller Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en el caldo Mueller con una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland.
- c) Situar cefalosporinas de tercera generación a una distancia de 20-25 mm alrededor de un disco de Amoxicilina/Ácido clavulánico.⁶

Obtención y expresión de resultados

Ampliación de halo de inhibición, sinergismo entre las cefalosporinas de tercera generación y el ácido clavulánico, enterobacteria positiva a la producción de Betalactamasas de espectro extendido

No ampliación de halos de inhibición, enterobacteria Negativa a la producción de Betalactamasas de espectro extendido^(20, 30, 37)

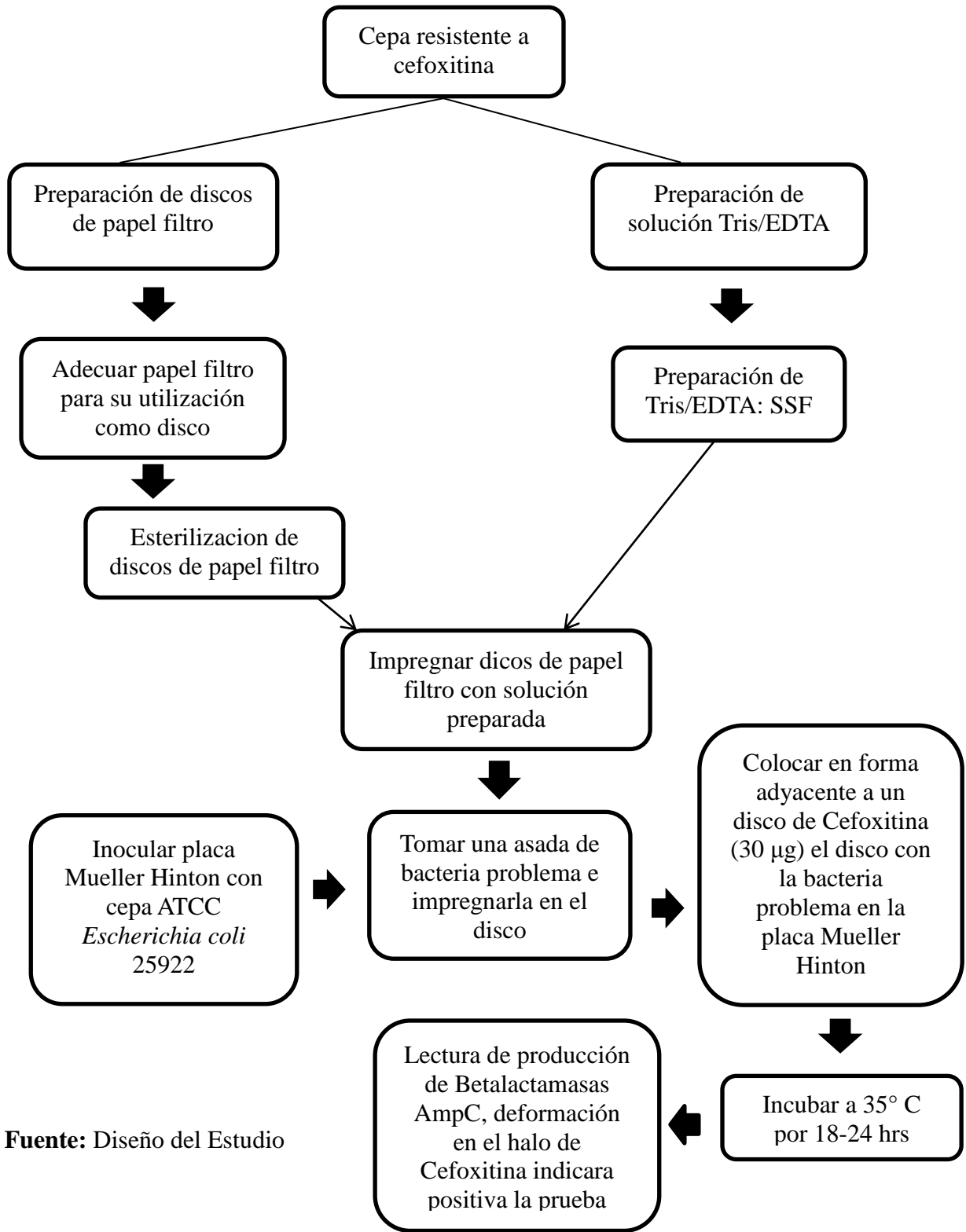
Prueba para la sospecha de producción de AmpC

Se seleccionaron cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido resistentes a Cefoxitina

9.3 Prueba de confirmación de producción de AmpC

Documentado por diversos autores como un test enzimático de gran utilidad, está basada en el uso de Tris-EDTA para permeabilizar la pared celular de la bacteria y liberar así la Betalactamasa al medio. Los discos para la prueba, son preparados en el laboratorio utilizando papel filtro (Anexo 7) conteniendo 20 µl de Tris- EDTA/solución salina (Anexo 8) en proporción 1:1. Colonias de la bacteria a estudiar son aplicadas sobre estos discos (previamente rehidratados), que se colocan de forma invertida sobre una placa de Müller-Hinton, que se ha inoculado antes con una cepa sensible a cefoxitina (*E. coli* ATCC 25922), y situando el disco inoculado adyacente a un disco de cefoxitina 30 µg. Después de la incubación a 35°C, la aparición de una distorsión del halo de inhibición de cefoxitina se considerará como indicativo de inactivación enzimática de la cefoxitina, es decir, presencia de la enzima AmpC (Anexo 9).^(12, 18, 26)

Esquema 2. Prueba de confirmación de producción de AmpC



Fuente: Diseño del Estudio

10. RESULTADOS

Tabla 4. Número de muestras positivas, enterobacterias y enterobacterias productoras de BLEE en pacientes ambulatorios y hospitalizados

	Pacientes ambulatorios	Pacientes hospitalizados
Muestras positivas (cocos, bacilos grampositivo y negativo, levaduras)	1554	330
Enterobacterias	999/1554	143/330
Porcentaje Enterobacterias	64%	43.3%

En un total de 1554 aislamientos reportados en la población ambulatoria, del Hospital Universitario Puebla, durante el periodo de Junio de 2015 a Marzo de 2016, se observó que 999 fueron Enterobacterias, lo que representa el 64% de los aislamientos.

Al analizar la procedencia por cultivo de las Enterobacterias, se encontró al urocultivo como la muestra predominante con 619, seguido del exudado vaginal con 297; espermocultivo; 31, exudado vulvar; 20, exudado faríngeo; 19 y exudado uretral, 13. (Tabla

5)

Tabla 5. Número de Enterobacterias aisladas por cultivo en pacientes ambulatorios

ENTEROBACTERIAS	
Urocultivo	619
E. Vaginal	297
Espermocultivo	31
E.vulvar	20
E.faríngeo	19
E.uretral	13
Total	999

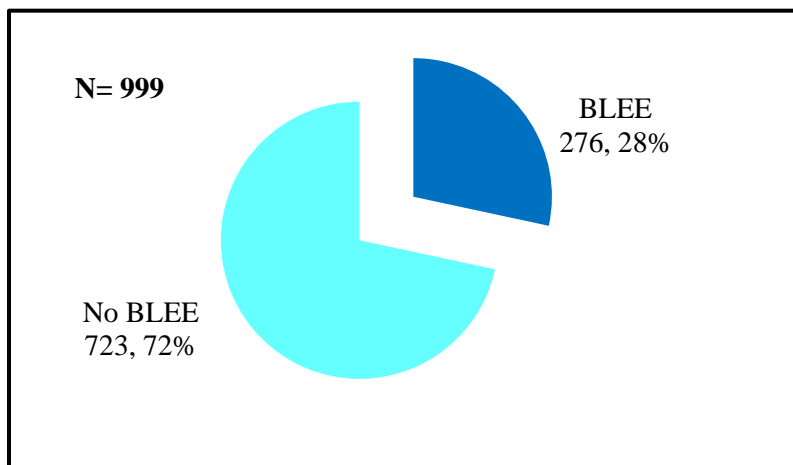


Gráfico 1. Porcentaje de enterobacterias BLEE y no BLEE en pacientes ambulatorios

Tabla 6. Número de BLEE por enterobacteria en pacientes ambulatorios

Bacteria	BLEE	Porcentaje
<i>E.coli</i>	260	94.2%
<i>Klebsiella</i>	11	3.98%
<i>Proteus</i>	3	1.08%
<i>Morganella</i>	0	0%
<i>Enterobacter</i>	1	0.3%
<i>Citrobacter</i>	1	0.3%
Total	276	100%

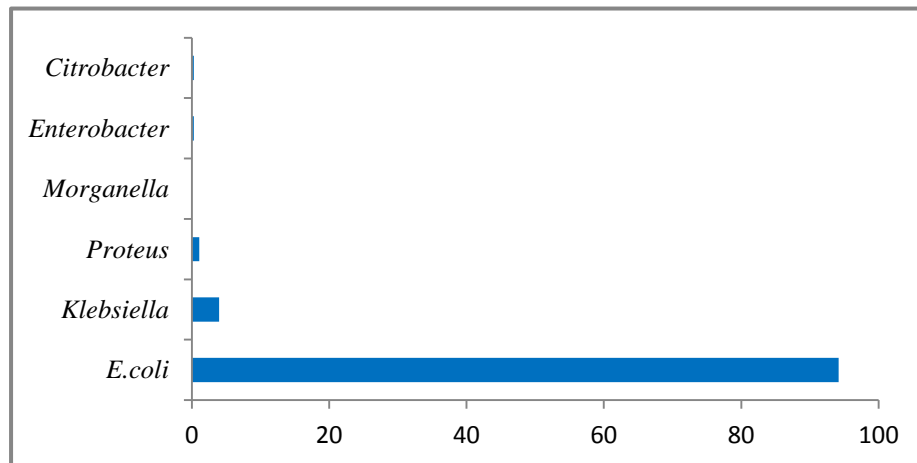


Gráfico 2. Porcentaje de enterobacterias BLEE por género.

Al revisar la producción de BLEE por género se encuentra nuevamente a *Escherichia coli* como el microorganismo del que se obtiene mayor producción de BLEE ya con 260 cepas que corresponden al 94.2%, el siguiente grupo corresponde a *Klebsiella*, con 3.98%, *Proteus* con 1.08%, *Enterobacter* y *Citrobacter* con 0.3%.

En la población hospitalizada en un total de 330 aislamientos, 143 pertenecen a Enterobacterias, lo que representa un 43.3% del total de esta población. (Tabla 4)

Al hacer el análisis de la procedencia por cultivo de las Enterobacterias, se encontró al cultivo de herida como el predominante al contar con 62 aislamientos, seguido del urocultivo con 61, cultivo de expectoración con 55; exudado faríngeo y cultivo de sonda; 26, secreción bronquial; 18, hemocultivo; 17, líquido peritoneal; 15, exudado nasal; 10, cultivo de cánula; 6, exudado uretral; 3, cultivo de penrose, exudado vaginal y vulvar; 2, cultivo de absceso, ulcera y diálisis; 1. (Tabla 7)

Tabla 7. Porcentaje de enterobacterias aisladas en las diferentes muestras de la población hospitalizada.

	Enterobacterias	% de Enterobacterias	No enterobacteria	Total
Absceso	1	100%	0	1
Ulcera	1	100%	0	1
Diálisis	1	100%	0	1
Vaginal	2	100%	0	2
Vulvar	2	100%	0	2
Penrose	2	100%	0	2
Uretral	3	100%	0	3
Cánula	5	83.33%	1	6
Sonda	18	69.23%	8	26
Urocultivo	40	65.57%	21	61
Herida	35	56.45%	27	62
Nasal	5	50%	5	10
Líquido peritoneal	6	40%	9	15
Secreción bronquial	4	28.57%	14	18
Expectoración	14	25.45%	41	55
Hemocultivo	3	17.64%	14	17
Faríngeo	1	3.84%	25	26
total	143		187	330

Al analizar los aislamientos de Enterobacterias por grupos en la población hospitalizada, dependiendo de la procedencia del cultivo, observamos que es posible el aislamiento de enterobacterias en todas las muestras de pacientes hospitalizados, al observar un 100% de aislamiento de enterobacterias en cultivo de absceso, ulcera, penrose, exudado vaginal, exudado vulvar, exudado uretral y diálisis, 83.33% en cultivo de cánula, 69.23% en cultivo de sonda, 65.57% en urocultivo, 56.45% en cultivo de herida, 50% en exudado nasal, 40% en líquido peritoneal, 28.57% en secreción bronquial, 25.45% en cultivo de expectoración, 17.64% en hemocultivo y 3.84% en exudado faríngeo.

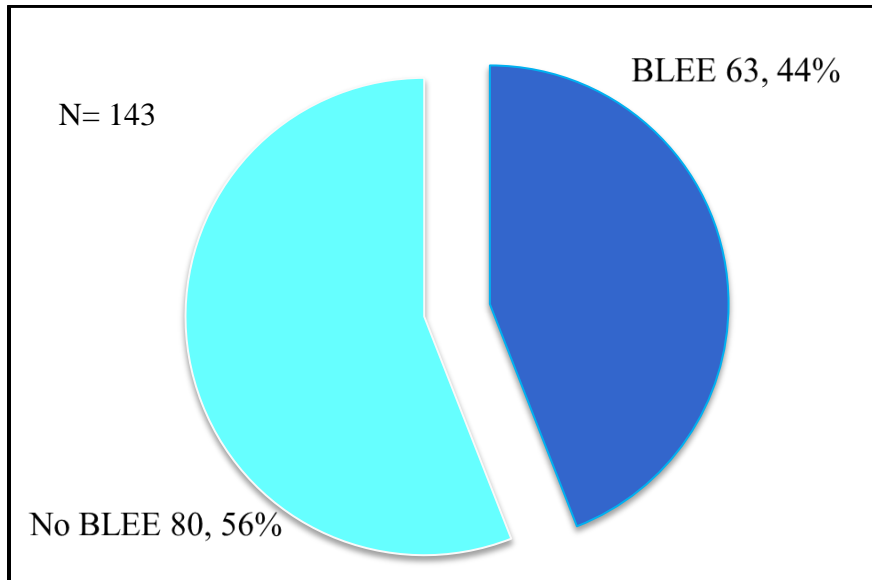


Gráfico 3. Porcentaje de enterobacterias BLEE y no BLEE en pacientes hospitalizados

Del total de los aislamientos de enterobacterias (143), 63 que corresponden al 44%, se identificaron como productoras de Betalactamasas de espectro extendido.

Tabla 8. Número de aislamientos de BLEE en Enterobacterias de pacientes hospitalizados

Bacteria	BLEE	no BLEE
<i>E.coli</i>	50	32
<i>Klebsiella</i>	12	16
<i>Enterobacter</i>	1	3

Al revisar la frecuencia por género de las enterobacterias de los pacientes hospitalizados, se obtiene que el género y en especial *Escherichia coli* es el microorganismo que con mayor frecuencia se aísla tal y como lo fue también en los pacientes ambulatorios, enseguida se encuentra al género *Klebsiella* como segundo patógeno mas importante y por último con un menor número *Enterobacter*.

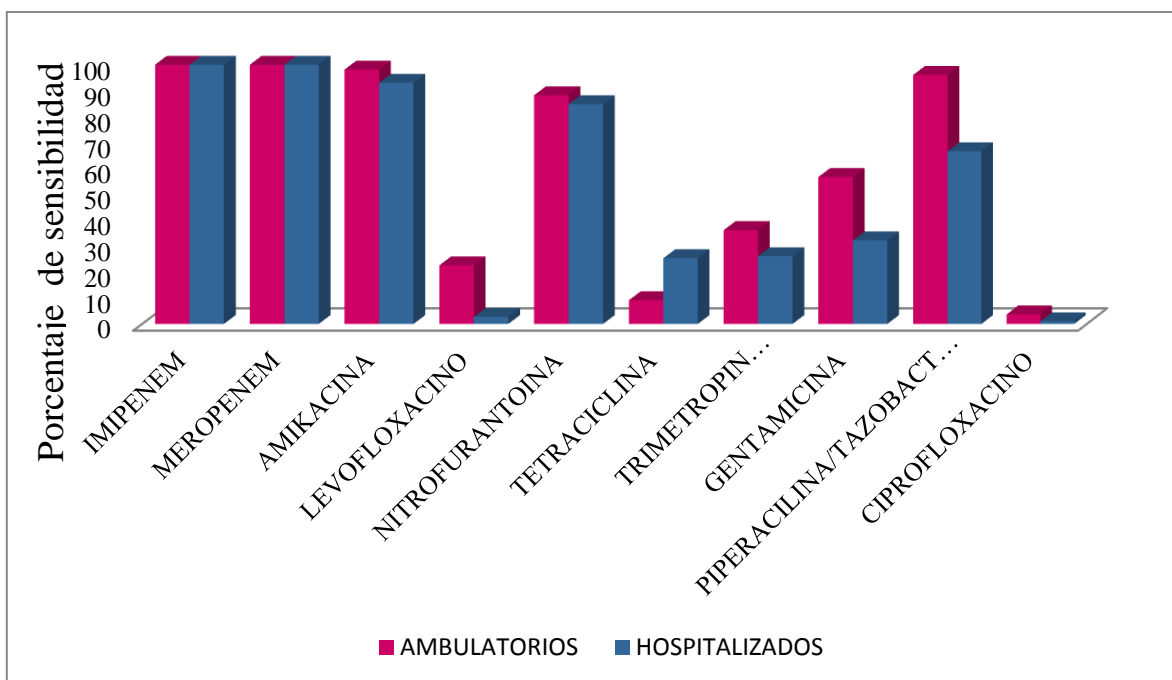


Gráfico 4. Patrón de sensibilidad a los antibióticos en pacientes ambulatorios vs. Pacientes hospitalizados.

Tabla 9. Porcentajes de sensibilidad a los antibióticos en pacientes ambulatorios y Pacientes hospitalizados.

	IMPENEM	MEROPENEM	AMIKACINA	LEVOFLOXACINO	NITROFURANTOINA	TETRACICLINA	TRIMETROPIN SULFAMETOXAZOL	GENTAMICINA	PIPERACILINA/TAZO BACTAM	CIPROFLOXACINO
AMBULATORIOS %	100	100	98.16	22.62	88.23	9.15	36.17	56.7	96.06	3.69
HOSPITALIZADOS %	100	100	93	2.7	84.81	25.35	26.15	32.2	66.6	1

Se obtuvo el patrón de resistencia de las enterobacterias aisladas con producción de BLEE de los pacientes ambulatorios y de hospitalización, obteniendo los resultados que se observan en la gráfica. El 100% de las bacterias se encuentran sensibles a Imipenem, y Meropenem, en el caso de amikacina ambos grupos de pacientes muestran más del 90% de sensibilidad, para Levofloxacin; la sensibilidad se presenta en menos del 25% en pacientes ambulatorios y menos del 5% en pacientes hospitalizados.

Nitrofurantoina; para este antibiótico la sensibilidad es similar para los pacientes de hospitalización y los ambulatorios, al presentar el 84.81% y 88.23% de sensibilidad respectivamente.

Tetraciclina; Los resultados en el patrón de sensibilidad para este antibiótico muestra a las enterobacterias productoras de BLEE, de los pacientes de hospitalización más sensibles con un 25.35% de sensibilidad, que las de los pacientes ambulatorios con un 9.15% de sensibilidad.

Trimetropin/Sulfametoxazol: la sensibilidad, de las enterobacterias productoras de BLEE, se muestran en su mayoría ya resistentes a este antibiótico al presentar 26.15% y 36.17% de sensibilidad.

Gentamicina: las enterobacterias productoras de BLEE en los pacientes ambulatorios presentan 56% de sensibilidad, los pacientes de hospitalización presenta un 32.2% de sensibilidad.

Piperacilina/Tazobactan: esta combinación de antibióticos muestra un resultado favorable para la recomendación del tratamiento antibiótico de las infecciones causadas por enterobacterias con producción de BLEE, al presentar más del 50% de sensibilidad, con un 96.06% para el grupo de los pacientes ambulatorios, y un 66.6% para los de hospitalización.

Ciprofloxacino: ambos grupos tienen una sensibilidad muy mínima al presentar menos de 4% de sensibilidad.

Resultados de estudio experimental en la búsqueda de Betalactamasas AmpC

Se recolectaron 100 enterobacterias productoras de enzimas BLEE para analizar la posibilidad de que estas presenten una enzima Betalactamasa tipo AmpC.

A cada una se le evaluó la resistencia o sensibilidad a Cepepime y a Cefoxitina (Anexo 10), aquellas que fueron resistentes a Cefoxitina se procedió hacer la prueba de la Técnica de detección con discos AmpC, y se obtuvieron los siguientes resultados.

De las Enterobacterias con producción de BLEE, en la búsqueda de Betalactamasas tipo AmpC, 96 corresponden *Escherichia coli* y 4 al género *Klebsiella* (Gráfico 5).

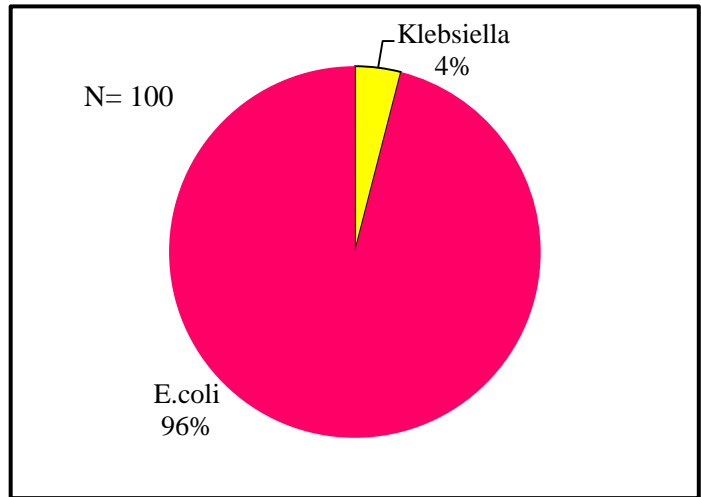


Gráfico 5. Porcentaje de enterobacterias con producción de BLEE

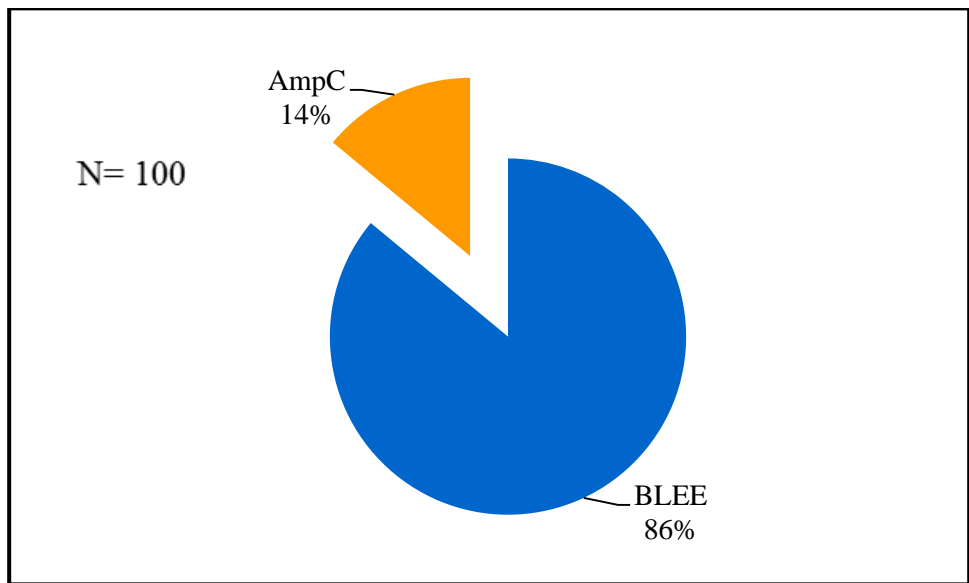


Gráfico 6. Enterobacterias productoras de AmpC

De las 100 enterobacterias productoras de BLEE 14 se muestran resistentes a Cefoxitina.

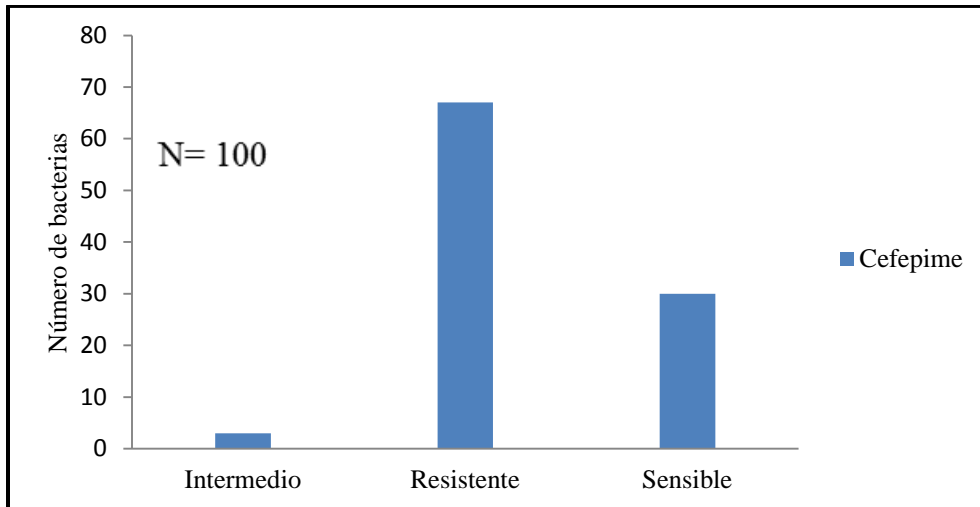


Gráfico 7. Estado de las enterobacterias con respecto a Cefepime

Se evaluó la resistencia y sensibilidad a Cefepime, en nuestra población, se observa que de las 100 bacterias 3 muestran un valor intermedio, 67 se muestran resistentes y tan solo 30 muestran sensibilidad a este antibiótico.

10 Discusión de Resultados

El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar las betalactamasas de enterobacterias productoras de infecciones en nuestra población, toda la investigación se centró en saber si existe la posibilidad de la existencia de betalactamasas BLEE y AmpC asociadas confiriendo una mayor resistencia, el riesgo y la prevalencia que podría existir de esta asociación, en nuestra población.

Al no haber suficientes datos reportados de nuestra area geográfica, se buscó la frecuencia de las enterobacterias productoras de BLEE, para después poder extrapolar los resultados de la posible asociación entre BLEE y AmpC.

En la búsqueda de la frecuencia de las Enterobacterias se decidió separar a la población ambulatoria de la hospitalizada, por motivo de la procedencia de los aislamientos, ya que hay muestras en la población hospitalizada que no se analizan en la población ambulatoria, por lo que al tener separadas a las poblaciones, se obtuvieron los siguientes resultados. En la población ambulatoria, 999 de un total de 1554 aislamientos positivos resultaron ser Enterobacterias, lo que representa un 64%, mientras que en la población hospitalizada los números indican un 43.3% de las mismas, al tener 143 de un total de 330 aislamientos positivos a alguna bacteria, datos que nos indican que en la población ambulatoria se aíslan más a menudo enterobacterias en comparación a la población hospitalizada, pero al revisar la procedencia de los aislamientos se observa como en la población ambulatoria la mayoría de las Enterobacterias provienen de urocultivos y exudados vaginales, es decir provienen de muestras remitidas por pacientes del sexo femenino, aunque no se tiene como objetivo, se buscó el porcentaje de los pacientes por sexo y el resultado fue que el 85% de la población ambulatoria es del sexo femenino por lo que podemos afirmar que los urocultivos provienen en su mayoría de mujeres, sumado a los exudados vaginales y vulvares, datos que nos dicen que las infecciones de vías urinarias y vaginales son producidas por enterobacterias principalmente por la ya conocida contaminación por arrastre de enterobacterias desde la zona perianal. Siguiendo con el análisis de los pacientes ambulatorios, se aislaron también enterobacterias de espermocultivo y exudado uretral por lo que los pacientes del sexo masculino aunque no tienen predisposición a infecciones de este tipo, también existen infecciones en ellos por enterobacterias, y por último en la población ambulatoria, se tiene que también se aíslan enterobacterias de los exudados

faríngeos que aunque no son el principal patógeno en este tipo de infecciones su importancia viene dada por las complicaciones que *Klebsiella pneumoniae* podría desencadenar en vías respiratorias.

El análisis de la población hospitalizada se observó como en ellos al existir muestras que no se analizan en la población ambulatoria, hay patógenos diferentes a las enterobacterias que predominan en los aislamientos como son: secreción bronquial, cultivo de expectoración, hemocultivo, exudado faríngeo, aún así los resultados muestran que se aíslan enterobacterias de prácticamente todas las muestras analizadas por el departamento de Microbiología del Hospital Universitario de Puebla. Se obtuvo porcentajes altos en cultivo de penrose, cánula y sonda, estos al ser dispositivos invasivos al paciente los expone a una posible bacteremia, dato que se discutiría con el aislamiento de enterobacterias en hemocultivos pero se observa un porcentaje bajo al tener un 17.64%, en este tipo de muestras se aíslan patógenos diferentes a las enterobacterias responsables de la infección. Siguiendo con el análisis se tiene también en porcentajes altos a los urocultivos tal y como fue en la población ambulatoria, y al cultivo de herida que como se consultó en la bibliografía son los principales patógenos en este tipo de infecciones. Y mencionaremos nuevamente lo que representa *Klebsiella pneumoniae* como riesgo para vías respiratorias ahora al tener aislamientos en exudado nasal, secreción bronquial, cultivo de expectoración y exudado faríngeo, todos los aislamientos de enterobacterias en estos pacientes son importantes por la relación directa con la morbimortalidad de esta población.

Desde la introducción de los antimicrobianos, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia, mecanismos que se suman a la patogenicidad de la bacteria. Las enzimas betalactamasas son el principal mecanismo de resistencia, y las betalactamasas de espectro extendido BLEE, son de las enzimas más estudiadas. La prevalencia de las BLEE es variable en todo el mundo, las cifras de sus aislamientos oscilan en diferentes valores dependiendo de la zona geográfica en la que se encuentren, lo que coincide a nivel mundial, es que en los últimos años las bacterias con este tipo de patrón de resistencia han incrementado. Nuestro estudio reveló un 28% para los pacientes ambulatorios y un 44% en los pacientes de hospitalización, con producción de BLEE en las Enterobacterias aisladas, cifras que corresponden a ambos datos que se consultaron, y que revelan que un cuarto de

la población ambulatoria, con infecciones producidas por enterobacterias, tendrá una BLEE, y en el caso de los pacientes de hospitalización casi la mitad de la población con una infección producida por enterobacteria, será productora de BLEE.

Los datos que hay para Latinoamérica a fin de comparar los resultados obtenidos, son los realizados por SMART 2011 (Análisis de Seguimiento de Tendencias de Resistencia a los antimicrobianos) que dice que en México el 48.4% de *Escherichia coli* son productoras de BLEE en los pacientes de hospitalización.⁽³⁴⁾ En el caso de los pacientes ambulatorios, corresponde a un estudio más cercano a nuestra población realizado en Guerrero en 2010-2011 que revela el aislamiento de bacterias productoras de BLEE, para los pacientes ambulatorios con un 21%.

En la búsqueda de enzimas Betalactamasas tipo AmpC, obtuvimos un 14% de resistencia a la Cefoxitina, a las que se les hizo la prueba de confirmación de Black y colaboradores, en el que se buscó la distorsión del halo de inhibición de cefoxitina, al usar los discos impregnados con la solución Tris/EDTA:SSFE, las pruebas en este estudio para la búsqueda de Betalactamasas AmpC, no coincidieron con las de referencia para ser positivas, no hubo distorsión en los halos de Cefoxitina, a pesar de las múltiples pruebas que se realizaron, hecho que nos dice que tal vez por eso aún no hay un método estandarizado para la confirmación de esta Betalactamasa, a pesar de tal resultado se tomaron como positivas, al estar señalado por el CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) que con la resistencia a Cefoxitina hay una asociación a Betalactamasas tipo AmpC.

Si extrapolamos el hallazgo de la incidencia del hallazgo de las Betalactamasas de espectro extendido. Del total de enterobacterias aisladas (999), el 1.42% serían productoras de Betalactamasas AmpC, y de las ya reportadas como BLEE (276) la cifra sería de un 3.9% de Enterobacterias BLEE a las que se le sumaría la probable producción de AmpC, lo que representaría una probabilidad 4:10 pacientes con una bacteria con producción de BLEE y además una AmpC.

Resultados que bajo la premisa del aumento de la resistencia microbiana, corresponderían a un estudio de 2005, en Argentina que reportó un porcentaje entre 0.1% y 0.55% de enterobacterias con producción de Betalactamasas tipo AmpC.

Dichos resultados representan una reducción en el posible tratamiento de las infecciones causadas por enterobacterias con producción de BLEE, ya que al revisar el patrón de sensibilidad de los demás antibióticos:

Se obtuvo que los pacientes que están en condición de hospitalización muestran más resistencia y por lo tanto una menor sensibilidad a los antibióticos que se ocupan en el tratamiento de sus infecciones, por causa de que las infecciones de este tipo de pacientes son tratadas con múltiples antibióticos con el fin de eliminar con eficacia sus infecciones. En ambos grupos de pacientes se muestra un 100% de sensibilidad a los carbapenems y Amikacina. Los resultados in vitro señalan también que Nitrofurantoina es un antibiótico en el que se muestra también una elevada sensibilidad con un 88.23% para pacientes ambulatorios y 84.81% para pacientes hospitalizados, así que esté, podría ser la elección para el tratamiento en infecciones del tracto urinario únicamente, ya que no se usa en infecciones de otra procedencia. El siguiente antibiótico que podría ser una opción de tratamiento es Piperacilina/Tazobactam al mostrar resultados de 66.6% y 96.06% para pacientes hospitalizados y ambulatorios respectivamente. Para el resto de los antibióticos su uso como tratamiento en las infecciones debería de ser valorado ya que la sensibilidad, a Levofloxacino, Trimetropin/Sulfametoxazol, Ciprofloxacino y Gentamicina, se muestra muy disminuida en ambos grupos de pacientes, cuando ya son bacterias de este tipo.

Todos las sensibilidades fueron mayores en los pacientes ambulatorios que en los hospitalizados, el único antibiótico que mostró diferencia es Tetraciclina que se observa más sensible en los pacientes hospitalizados que en los ambulatorios, dato que se podría explicar por la frecuencia con la que usa este antibiótico para el tipo de paciente, ya que este es un antibiótico cuya administración debe ser vigilada por un médico, por los efectos secundarios que puede llegar a tener.

Los datos en cuanto a la sensibilidad antibiótica corresponden a los de un estudio realizado en Venezuela en los años 2009-2012. ⁽¹⁶⁾

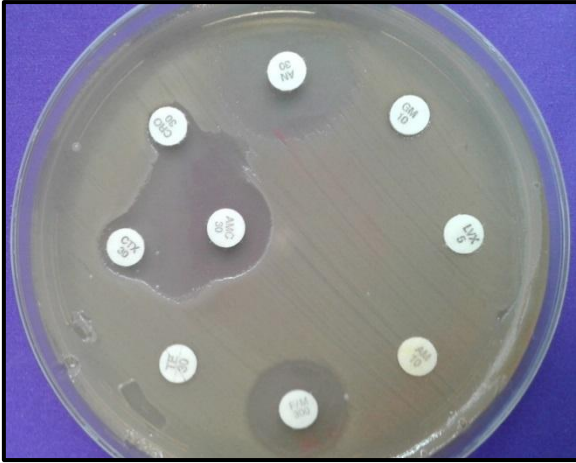
En el que la sensibilidad a ciprofloxacino fue reducida en cepas de *E. coli* productoras de BLEE (menos de 10%), en nuestro estudio la sensibilidad es menor al 5%, en el caso de los antibióticos a los que son más sensibles las bacterias productoras de BLEE, también son; Carbapenems>Amikacina>Piperacilina/Tazobactam, en el mismo orden que lo reporta nuestro estudio.

El dato de la sensibilidad a Cefepime, es de un 30%, en un valor intermedio se encuentra un 3% y el resto (67%) se encuentran como resistentes, que si bien se recuerda a la definición de las Betalactamasas de tipo AmpC, estas por si solas no podrían hidrolizar a este antibiótico, pero si contienen esta propiedad, las Betalactamasas de espectro extendido, una vez más mostrando la asociación que puede haber en este tipo de enzimas con el fin de la supervivencia de la bacteria.

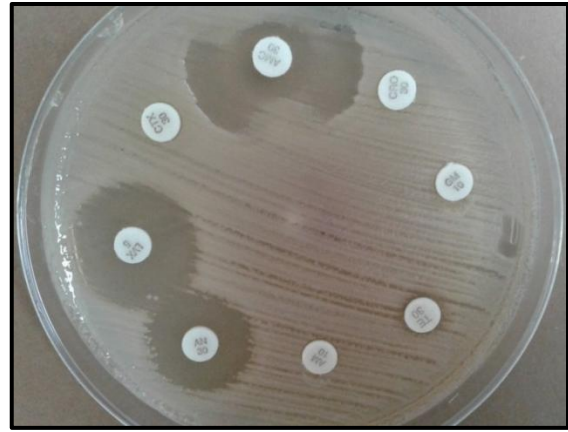
11 CONCLUSIONES

- La asociación de Betalactamasas BLEE y AmpC es un fenómeno presente en las bacterias.
- En la población total de Hospital Universitario Puebla en el 29.68 % de las enterobacterias hay producción de BLEE
- La población ambulatoria presenta un 28% de BLEE en las enterobacterias, mientras que la población hospitalizada muestra un 44%.
- Dentro de los mismos datos se obtuvo que el 14% de las bacterias productoras de BLEE producen también Betalactamasa AmpC.
- Del total de enterobacterias aisladas, el 1.42% serian productoras de Betalactamasas AmpC
- De las Enterobacterias productoras de BLEE, un 3.9% tiene producción de Betalactamasas tipo AmpC, lo que representa una probabilidad de 4:10 pacientes con una bacteria con producción de BLEE y además una AmpC.
- Al hacer la comparación entre la población ambulatoria y la hospitalizada de los patrones de sensibilidad muestran ambas poblaciones una tendencia a la baja de sensibilidad pero se observó que la población hospitalizada tiene cifras superiores en la resistencia.
- En el presente trabajo, no se encontraron enterobacterias productoras de carbapenemasas.

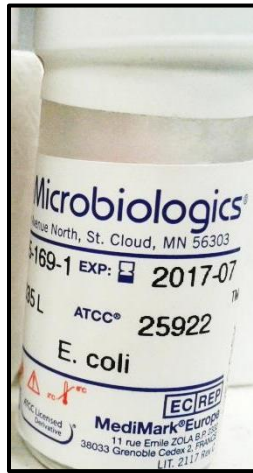
12 ANEXOS



Anexo 1. Sinergismo entre cefalosporinas de 3era generación y ácido clavulánico



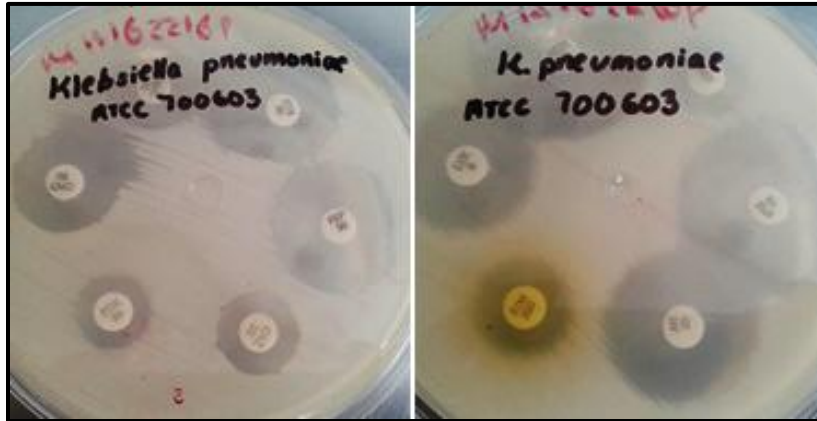
Anexo 2. Halos de inhibición irregulares



Anexo 3. *Escherichia coli* ATCC 25922



Anexo 4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



Anexo 5. Antibiograma de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



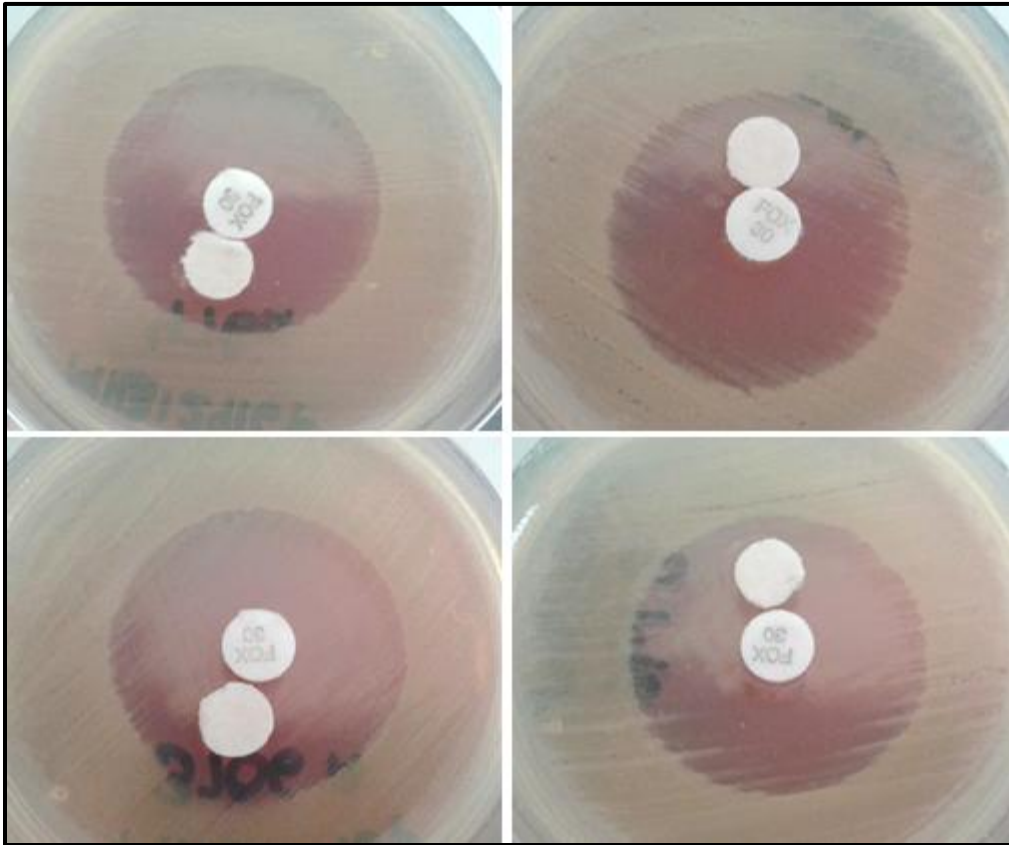
Anexo 6. Antibiograma de *Escherichia coli* ATCC 25922



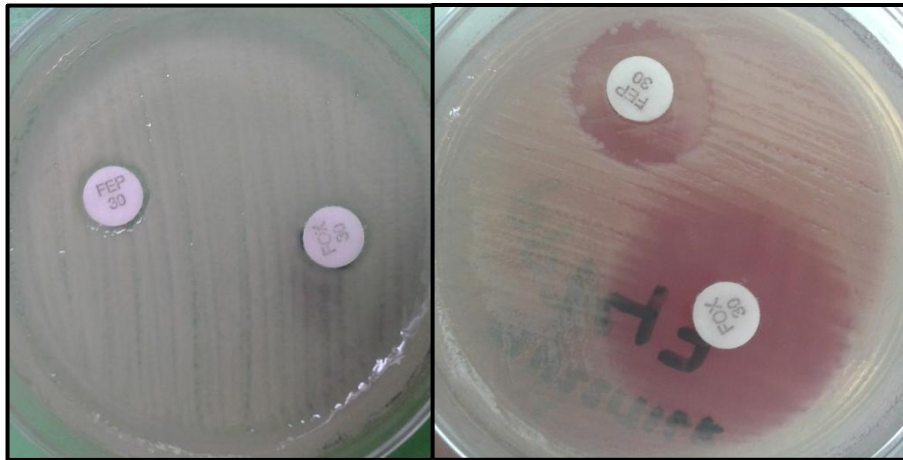
Anexo 7. Discos de papel filtro estériles



Anexo 8. Discos impregnados con Tris/EDTA:SSF



Anexo 9. Prueba de producción de Betalactamasa AmpC, técnica Tris: EDTA



Anexo 10. Prueba de sensibilidad a Cefoxitina y Cefepime

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca, G., Herrera, L. (2009). *Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio*. Revista médica hospitalaria nacional (en línea). Vol.36 San José Costa Rica
2. Black, J. A., Moland, E. S., & Thomson, K. S. (2005). *Prueba de disco para la detección de AmpC mediada por plásmidos en enterobacterias* (original en inglés). Journal of Clinical Microbiology, 3110–3113.
3. Cabrera, C., Gómez, R., Zuñiga, A. (2008). *La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación* Colombia Médica Vol 38 No. 2. Bogotá, Colombia.
4. Calvo, J., Martínez, L. (2009) *Mecanismos de acción de los antimicrobianos*. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Vol. 27, Elsevier Santander, España.
5. Cantón, R., Valverde, A., Novais, A., Baquero, F., Coque, T. (2007) *Infecciones por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): un desafío epidemiológico y terapéutico* Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Elsevier Madrid, España.
6. Carrillo, A., García, B. (2007) *Betalactamasas de espectro extendido importancia clínica*. Asociación Española de Biopatología Médica vol. 2 España.
7. Casellas, J. (2011) *Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología*. Asociación Panamericana de Infectología (API) Revista Panamericana Salud Pública.
8. Castro, N., Salgado, J., Ocampo, R., Sánchez, J., Ruiz, M. (2014) *Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por Escherichia coli de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México*. Revista Tlamati Guerrero, México.
9. Cercenando, E., Cantón, R., (2011) *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos* Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Barcelona, España.

10. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2016) *Normas de funcionamiento para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos*. USA (en línea). Recuperado de: www.clsi.org.
11. Cordiés, L., Machado, A., Hamilton, M. (2000) *Principios generales de la terapéutica antimicrobiana*. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", Ciudad de La Habana, Cuba.
12. Cué, M., Morejon, M. (2000). *Antibacterianos de acción sistémica. Parte 1. Antibióticos Betalactámicos* Revista Cubana. La Habana, Cuba
13. Del Valle, D. (2009) *Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica*. Revista Scielo. Vol. 29. Caracas, Venezuela.
14. Fresnadillo, M., García, M., García, E., García, J. (2010) *Clínica Carbapenems disponibles: propiedades y diferencias*. Revista de enfermedades infecciosas y Microbiología Elsevier, (Vol 28) Salamanca, España.
15. García, A., García, E., Hernández, A., Ruíz, J., Yague, G., Herrera, J., Gómez, J. (2011) *Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales*. Revista Española Quimioter. Madrid, España.
16. Guevara, N., Guzmán, M., Merentes, A., Rizzi, A., Papatzikos, J., Rivero, N., Oranges, C., Villarroel, H., Limas, Y. (2013) *Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias gramnegativas aisladas de infecciones del tracto urinario en Venezuela: Resultados del estudio SMART 2009-2012*. Revista Chilena de infectología vol.32. Caracas, Venezuela.
17. Hernández, E., Rodríguez, C., (2010) *Escherichia coli productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria*. Universidad Complutense de Madrid. España.
18. Mendoza M., A. (2011). Revista de la Facultad de Medicina UNAM. *El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos* (vol.54) México.
19. Moliendo, M., Gonzáles, C. (2014) *Bacterias Gram Negativas*. Revista de Actualización Clínica. Bolivia.
20. Morejón, M. (2013) *Betalactamasas de espectro extendido* Revista Cubana de Medicina. (vol 52). La Habana Cuba.

21. Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J.L., Ochoa, T.J. (2011) *Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea*. Revista Perú Medicina Experta Salud Pública.
22. Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B. (2010). *Lectura interpretada del antibiograma de enterobacteria*. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (en línea) Vol.28 Barcelona, España.
23. Ojeda, M. (2014) *Bacterias Gram positivas y Gram negativas*. Revista Microenergetics. California, USA.
24. Paredes, R. (2012) *Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en la clínica Good Hope durante el periodo marzo- agosto de 2012*. Tesis publicada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
25. Puerta, A., Mateos, F. (2010) *Enterobacterias*. Revista Medicine Actualizacion Albacete España.
26. Rivera, J., Rodríguez, U., Huayán, D., Dávila, G., Martínez, P.(2011) *Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en Enterobacteriaceae aisladas de reservorios ambientales de un hospital general en Cajamarca*. Revista Médica Herediana, Perú.
27. Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Lanchipa, P., Zegarra, R. (2004) *Antibióticos Sistémicos: Betalactámicos, Carbapenems, Aminoglucósidos, Macrólidos* Educación Médica Continua. Vol 14. Perú
28. Seral, C., Gude, M., Castillo, F.J. (2012). *Emergencia de Betalactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas*. Revista española de quimioterapia Zaragoza, España.
29. Seral, C., Pardos, M., Castillo, F. (2010) *Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella*. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Elsevier. Zaragoza, España.
30. Sorlózano, A. (2007) *Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio: Aportaciones científicas* Editorial de la universidad de Granada.
31. Suárez, C., Gudiol, F. (2009) *Antibióticos Betalactámicos*. Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Bellvitge. Hospitales de Llobregat, Barcelona: Elsevier, (vol. 02) España

32. Suárez, C., Kattán, J., Guzmán, A., Villegas, M. (2006) *Mecanismos de resistencia a carbapenems en P. aeruginosa, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control*. Revista de la Asociación Colombiana de Infectología. Vol 10 No. 2 Infectio Bogotá, Colombia.
33. Sussman, O., Mattos, L., Restrepo, A. (2010) *Resistencia Bacteriana*. Hospital Universitario San Ignacio. Unidad de Infectología. Bogotá, Colombia.
34. Tabur, J., Torres, J., Villegas, M. (2008) Revista Infectio. *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*. Cali, Colombia.
35. Vives, E., Medvedosky, D., Rothlin, R. (2004) *Inhibidores de la pared bacteriana*.
36. Washington, C., Stephen, D., William, M., Elmer, W., Gary, W., Paul, C., Gail, L. (2006). *Diagnóstico microbiológico* (6ta edición) Editorial medica Panamericana.
37. Zamora, R., Areu, A., Gundián, J., Manresa, R., Morales, R. (1998) Acta Medica Vol. 8 *Cefalosporinas*. Ciudad de La Habana, Cuba.