

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**“ANÁLISIS DE PERFILES PLASMÍDICOS DE
Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae
PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE
ESPECTRO EXTENDIDO AISLADAS EN
UROCULTIVOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
SALUD DEL NIÑO”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio
Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Carlos Josemaría Suárez Rojas

ASESOR

Mario Monteghirfo Gomero

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

A mi abuelita que ya no está

ALICIA ALEJOS

Por todos los años que estuvo al cuidado de mi hermano y yo, siempre pendiente de nosotros sobre todo en los años en que mi madre estuvo lejos, por lo que siempre le estaré agradecido y la llevaré siempre en mi mente.

A mi madre

ALICIA ROJAS

Por su gran ayuda, cariño y comprensión; por motivarme a ser mejor cada día y a seguir siempre adelante ante cualquier adversidad, y por su valioso ejemplo demostrado de independencia personal.

A mi padre

VICTOR SUÁREZ

Por su continuo interés en cada paso que daba creciendo como persona y ahora como profesional, a pesar de no haber podido compartir tanto como él hubiese querido.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Mario Monteghirfo

Docente de la Facultad de Medicina de San Fernando y miembro del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición; por la oportunidad que me dio, siempre brindándome todas las facilidades y la ayuda necesaria para poder realizar este proyecto bajo su asesoría.

Al Lic. Edgar Gonzales

Personal del Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño; por la gran y valiosa ayuda que me dio para llevar a cabo este proyecto, pero sobre todo por las invalorable enseñanzas y por transmitirme, tal vez mediante un plásmido, la gran pasión que tiene por la Microbiología y poder tomarlo con un modelo a seguir en mis inicios en esta hermosa carrera.

Un agradecimiento especial para

Todas esas personas que de alguna u otra manera me apoyaron y pusieron su grano de arena, ya sea con algún consejo, recomendación para poder mejorar este trabajo o simplemente con alguna palabra de aliento que me ayudase a no bajar los brazos y poder culminar esto y dar un paso hacia adelante en mi vida, y espero poder retribuirles en algún momento de la misma forma que ellos lo hicieron conmigo

ÍNDICE

Dedicatoria	
Agradecimientos	
Resumen	
Abstract	
I. Introducción	1
Objetivo general	2
Objetivos específicos	2
II. Marco teórico	3
2.1 Infección del tracto urinario.....	3
2.1.1 Epidemiología.....	3
2.2 Urocultivo.....	4
2.2.1 Aislamiento de patógenos.....	4
2.3 Enterobacterias.....	5
2.3.1 <i>Escherchia coli</i>	5
2.3.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.4 Resistencia bacteriana.....	6
2.4.1 Mecanismos de resistencia.....	7
2.4.1.1 Modificación del sitio de acción.....	7
2.4.1.2 Alteración de la permeabilidad por porinas.....	7
2.4.1.3 Bombas de eflujo.....	8
2.4.1.4 Inactivación enzimática.....	8
2.5 β -lactamasas.....	9

2.6 β -lactamasas de espectro extendido.....	
2.6.1 BLEE tipo TEM.....	11
2.6.2 BLEE tipo SHV.....	11
2.6.3 BLEE tipo CTX-M.....	12
2.7 Plásmidos.....	12
2.7.1 Análisis de plásmidos.....	13
III. Materiales y métodos.....	15
3.1 Tipo de investigación.....	15
3.2 Población.....	15
3.3 Muestra.....	15
3.4 Variables.....	15
3.5 Técnicas e instrumentos.....	15
3.6 Plan de procedimientos.....	15
3.6.1 Conservación de los aislamientos.....	16
3.6.2 Extracción de ADN plasmídico.....	16
3.6.3 Corrida electroforética.....	17
3.7 Análisis de datos.....	18
3.8 Consideraciones éticas.....	18
IV. Resultados.....	19
V. Discusiones.....	30
VI. Conclusiones.....	32
VII. Recomendaciones.....	33
VIII. Referencias bibliográficas.....	34
VII. Anexos.....	39

RESUMEN:

Introducción: El aumento progresivo de las tasas de resistencia en bacterias uropatógenas, así como su propagación se ha convertido en un gran problema a nivel mundial, cobrando mayor importancia la diseminación de aislamientos resistentes productores de β -lactamasas de espectro extendido, por lo que son útiles la caracterización molecular de plásmidos y otros elementos genéticos de las bacterias para establecer la relación genética que existe entre ellas y tener datos epidemiológicos relevantes que nos puedan sugerir la dirección de propagación de este tipo de resistencia. **Objetivo:** Describir los perfiles plasmídicos en aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido recuperados de urocultivos en el servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN). **Diseño:** Estudio descriptivo, observacional de corte transversal. **Institución:** Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición CIBN-UNMSM; Instituto Nacional de Salud del Niño **Participantes:** Aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* durante Noviembre y Diciembre del 2012 en el servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN). **Intervenciones:** Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* y de *K. pneumoniae*, detección de perfiles plasmídicos mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y tinción con bromuro de etidio. **Principales medidas de resultados:** Análisis de los patrones de huella de los perfiles plasmídicos obtenidos usando el programa NTSYSpc 2.1 y el algoritmo de agrupamiento UPGMA. **Resultados.** En las muestras analizadas se detectaron diferentes patrones electroforéticos obteniéndose de 1 hasta 7 bandas por muestra y en total 15 bandas de distinto tamaño, las cuales variaron desde 1.5 kb hasta más de 20 kb. Teniendo en cuenta los patrones de similitud, los aislamientos estudiados se distribuyeron en diferentes agrupamientos o ramas. **Conclusión:** No se encontró una similitud genética marcada entre los aislamientos de origen comunitario y de origen hospitalario, por lo que no se podría establecer una relación significativa y determinar un origen común entre los mismos.

Palabras clave: Perfiles plasmídicos, *E. coli*, *K. pneumoniae*, β -lactamasas de espectro extendido

ABSTRACT:

Background: The progressive increase in resistance rates in uropathogenic bacteria and their spread have become in a significant worldwide public health, becoming more important the spread of resistant isolates producing of extended spectrum β -lactamases, which are useful the molecular characterization of plasmids and other genetic elements of the bacteria to establish the genetic relationship between them, to have relevant epidemiological data that we can suggest the direction of propagation of this type of resistance. **Objective:** Determine the plasmid profiles in isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing of extended spectrum β -lactamases recovered from urine cultures in the service of Microbiology of National Institute of Child Health (NICH). **Design:** Descriptive, observational cross-sectional study. **Institution:** Biochemistry and Nutrition Investigation Center CIBN-UNMSM; National Institute of Child Health. **Participants:** Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during November and December of 2012 in the service of Microbiology of National Institute of Child Health. **Interventions:** Extraction of plasmid DNA from *E. coli* and *K. pneumoniae*, detection of plasmid profiles by electrophoresis gel of 0.8% agarose and staining of DNA fragments was carried out using ethidium bromide and they were visualized by UV-Trans illumination, the analysis of fingerprint patterns of plasmid profiles obtained using the NTSYSpc 2.1 program and the UPGMA clustering algorithm. **Results:** Were detected different electrophoretic patterns in the samples, obtained from 1-7 bands per sample and a total of 15 bands of different sizes, which varied from 1.5 kb to more than 20 kb. Considering the patterns of similarity, the isolates analyzed were distributed into different clusters or branches. **Conclusion:** The determination of plasmid profiles proved to be a sensitive and reliable technique for the analysis of genetic diversity isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* from the National Institute of Child Health.

Key words: Plasmid profiles, *E. coli*, *K. pneumoniae*, extended spectrum β -lactamases.

I. INTRODUCCIÓN

Desde su primer reporte en Alemania en 1983; la tasa de aislamientos de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido en infecciones urinarias, especialmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, ha ido en aumento y se ha convertido en un gran problema a nivel mundial, por lo que implica una gran necesidad de estudiar los patrones de resistencia, presentes en estos organismos; además de determinar los factores responsables de la transferencia de esta característica a otros organismos tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario y determinar si existe alguna relación genética entre ambos tipos.

Uno de los principales objetivos que se plantean al abordar este tipo de estudio es averiguar si el brote epidémico se trata de una situación producida por una misma cepa o si, por el contrario, se tratan de cepas similares de una misma especie pero no idénticas; por lo que se hace necesario estudiar la identidad o no entre cepas aisladas de los enfermos y del sitio que se sospecha pueda ser el foco de contaminación.

Para lo antes mencionado pueden emplearse métodos de caracterización fenotípica y técnicas de biología molecular, dentro de las cuales está el estudio de los perfiles plasmídicos, con la finalidad de establecer la relación epidemiológica existente, tanto en los aislamientos procedentes de la comunidad así como los de origen hospitalario, y de esta manera obtener datos epidemiológicos relevantes que nos puedan sugerir la dirección de propagación de este tipo de resistencia y aplicar las medidas control necesarias según sea el caso.

OBJETIVO GENERAL:

Describir los perfiles plasmídicos de aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido recuperados de urocultivos en el servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Realizar la detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* recuperados de urocultivos en el Instituto Nacional de Salud del Niño.

- ❖ Determinar los perfiles plasmídicos de aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido recuperados de urocultivos en el Instituto Nacional de Salud del Niño.

- ❖ Evaluar la similitud genética a partir de los perfiles plasmídicos obtenidos en los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido de acuerdo a su procedencia, ya sea comunitaria u hospitalaria.

- ❖ Evaluar la relación entre los perfiles plasmídicos y los perfiles de susceptibilidad obtenidos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO

La infección del tracto urinario (ITU) es considerada como la existencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas¹, se define como la presencia y proliferación de gérmenes en el tracto urinario que habitualmente es bacteriana y excepcionalmente micótica o vírica a cualquier nivel, desde el extremo distal de la uretra hasta el corte renal (uretra, vejiga, próstata, uréteres, pelvis renal o riñones), englobando diferentes entidades clínicas que requieren su catalogación mediante la correlación clínica-laboratorio.²

Una ITU se pone en evidencia mediante el cultivo de la orina en medios de crecimiento apropiados; si hay bacterias, crecerán formando colonias que pueden ser contadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)³. El origen bacteriano de la ITU es el más frecuente (80%-90%).

Varios estudios han establecido que un tercio o más de los pacientes, mayoritariamente mujeres sintomáticas, tiene recuentos por debajo de 10^5 UFC/mL y presentan ITU⁴⁻⁷; en los hombres sintomáticos, ya que tienen menor probabilidad de contaminación, se considera como sugerente de infección una cifra de 10^3 UFC/mL.⁸

2.1.1 Epidemiología

Entre las infecciones más importantes del ser humano, la ITU constituye un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año. Es la segunda causa de infección más frecuente en los humanos, es solo superada por las infecciones del tracto respiratorio.⁹

La infección del tracto urinario es mucho más frecuente en mujeres que en varones. La mitad de las mujeres tienen al menos un episodio de infección urinaria a lo largo de su vida, casi siempre en forma de cistitis no complicada; 20-30% de esas mujeres presentan episodios recurrentes, que la mayoría de las veces son consecuencia de reinfección. La pielonefritis no complicada es mucho menos frecuente que la cistitis, pero su incidencia es difícil de precisar porque puede cursar sin otros síntomas que los propios de una infección de vías bajas, y porque la mayoría de las veces se trata ambulatoriamente.¹⁰

En la población infantil la ITU es muy frecuente; a los 7 años, aproximadamente el 8% de las niñas y 2% de los varones han tenido al menos un episodio de ITU.^{11,12} El riesgo de que la ITU recurra es de 10% a 30%, en los siguientes 6 a 18 meses.¹³

2.2 UROCULTIVO

El cultivo de orina es empleado para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática en pacientes con riesgo de infección. La piuria, junto con la bacteriuria, es un dato muy importante para el diagnóstico de infección del tracto urinario, ya que prácticamente está presente en todas las infecciones urinarias. Una excepción es la bacteriuria asintomática en la que la piuria puede estar ausente.

El aparato genital urinario normal no suele contener bacterias, con la excepción de la mucosa uretral que presenta microbiota. El 95% de las infecciones urinarias son causadas por una sola bacteria, aunque en algunos casos (sondaje prolongado, vejiga neurógena, fístula del tracto urinario con el tracto gastrointestinal o con el tracto genital), pueden ser polimicrobianas; pero, como la orina puede contaminarse fácilmente con bacterias del conducto vaginal y del perineo, o con la flora bacteriana propia de la uretra (*Streptococcus* α hemolíticos, especies de *Bacillus*, *Staphylococcus* coagulasa negativos, Difteroides y especies de *Lactobacillus*), el aislamiento de varias especies bacterianas debe interpretarse como contaminación.^{14, 15}

2.2.1 Aislamiento de patógenos

Los patógenos potenciales del aparato urinario son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus agalactiae* (mujeres embarazadas), *Staphylococcus saprophyticus* (mujeres jóvenes), *Corynebacterium urealyticum*, *Staphylococcus epidermidis* (hombres ancianos) *Serratia marcescens* y *Morganella morganii*.^{16, 17}

Para su aislamiento se requieren medios selectivos y no selectivos, casi siempre es suficiente una combinación de agar sangre de carnero al 5% y de agar MacConkey.

La inoculación se hace con un asa calibrada de 0.001 mL, luego de inocular con el asa calibrada la superficie de cada placa de agar, esta debe sembrarse por completo en estrías sobre todos los cuadrantes, de modo que se pueda realizar el recuento semi-cuantitativo de las colonias después de la inoculación. El criterio más utilizado para determinar si se debe realizar las pruebas de identificación y el antibiograma de un aislamiento determinado es un recuento de colonias mayor o igual a 10^5 UFC/mL. Algunos utilizan 10^4 UFC/mL como punto de corte, ya que las asas calibradas tienden a subestimar el recuento de colonias. Los recuentos de colonias de bacilos entéricos gramnegativos tan bajos como 10^2 UFC/mL pueden ser significativos en mujeres con síndrome uretral agudo.¹⁵

2.3 ENTEROBACTERIAS

Los bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* son las bacterias que se recuperan con mayor frecuencia en muestras clínicas. Ampliamente dispersos en la naturaleza, y como indica el nombre de la familia, en el tubo digestivo de seres humanos y de animales. Antes de la aparición de los antibióticos, la quimioterapia y las medidas inmunosupresoras, las enfermedades infecciosas producidas por *Enterobacteriaceae* estaban bien definidas. Los miembros de *Enterobacteriaceae* pueden estar implicados en casi cualquier tipo de enfermedad infecciosa y recuperarse de cualquier muestra recibida en el laboratorio. Los pacientes inmunodeprimidos o debilitados son muy sensibles a las infecciones adquiridas en el hospital, ya sea después de la colonización con aislamientos ambientales o luego de procedimientos invasores, como cateterismos, broncoscopia, colposcopia o biopsias quirúrgicas, en los cuales se traumatizan o seccionan las mucosas.¹⁵

La identificación definitiva de la enterobacterias puede requerir una serie de pruebas bioquímicas. Se puede evitar un tiempo considerable y una posible identificación errónea si se efectúan algunas observaciones preliminares para asegurarse que el microorganismo que se evaluará sea de este grupo.

2.3.1 *Escherichia coli*

Es la especie bacteriana recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido asociada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido y sistema orgánico humano. Los aislamientos virulentos de *Escherichia coli* pueden causar gastroenteritis, infecciones urinarias y meningitis neonatal. En casos más raros, los aislamientos virulentos son también responsables del síndrome hemolítico urémico, septicemia, peritonitis, mastitis y neumonía. Pero son las tres primeras condiciones las de más relevancia clínica.¹⁷

Es un bacilo Gram negativo no esporulado, móvil con flagelo peritrico, anaerobio facultativo, capaz de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentador y oxidativo en medios con glucosa y carbohidratos, catalasa positivo, oxidasa negativo y reductores de nitrato a nitrito. *Escherichia coli* se serotipifica sobre la base de sus antígenos de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular); en la actualidad se conocen más de 170 serogrupos diferentes de antígenos O, la combinación de antígenos O y H define un serotipo de un aislado; por ejemplo *Escherichia coli* O157:H7 es un serotipo de un cepa virulenta de *Escherichia coli* asociado a colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Poseen también fimbrias o pilis que le permiten adherirse a las células epiteliales de la pared vesical y unirse a otras bacterias, formando congregaciones bacterianas que dificultan su eliminación.^{15, 18}

2.3.2 *Klebsiella pneumoniae*

Bacilo Gram negativo inmóvil que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, los aislamientos de este microorganismo fermentan la lactosa y la mayoría producen colonias sumamente mucoides en medios sólidos debido a la producción de una cápsula de abundante polisacárido, lo que diferencia a estos microorganismos de otros géneros de esta familia.¹⁵

Klebsiella pneumoniae es un patógeno importante capaz de originar infecciones del tracto urinario (ITU) y neumonías en personas sanas. Sin embargo, casi todas las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* se adquieren en el hospital y/o en pacientes debilitados por otras enfermedades subyacentes.¹⁹

Los aislados nosocomiales suelen ser resistentes a numerosos antibióticos debido a la adquisición de plásmidos con resistencia a múltiples fármacos; *Klebsiella pneumoniae* es uno de los microorganismos que más frecuentemente transportan plásmidos que codifican β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y estas se aíslan cada día con más frecuencia. La presencia de estas β -lactamasas de espectro extendido limitan las opciones de tratamiento al uso de carbapenémicos. Los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* producen enzimas de tipo SHV y tienden a presentar clonalidad relacionada. Adicionalmente, miembros de un mismo clon epidémico pueden portar diferentes plásmidos con diferentes genes codificadores de β -lactamasas de espectro extendido y aislamientos no relacionados genotípicamente pueden producir la misma β -lactamasas de espectro extendido debido a la transferencia de un plásmido de una estirpe a otra.²⁰

2.4 RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana es la condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico.²¹

Se conoce como resistencia natural o intrínseca a la característica de determinados grupos de bacterias, siendo específica de especie o género, y delimita el espectro de actividad de los antimicrobianos, como ejemplo tenemos *Enterococcus* resistentes a cefalosporinas y *Klebsiella* resistente a ampicilina; en la resistencia adquirida las bacterias obtienen resistencia por diferentes mecanismos genéticos, que puede ser mediante mutación o transferencia de material genético entre células bacterianas de la misma especie o diferentes, y la adquisición de estos genes de resistencia, esto está dado por plásmidos, transposones e integrones; la transferencia de este material genético se realiza a través de diversos mecanismos como son la transformación, conjugación y transducción.^{22, 23}

2.4.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana tanto natural como adquirida se puede abordar desde el punto de vista molecular y bioquímico de tal forma que se pueden clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales los aislamientos bacterianos pueden adquirir resistencia a los antibióticos. Los mecanismos de resistencia son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad (porinas o bombas de eflujo). Cabe resaltar que estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.²⁴

2.4.1.1 Modificación del sitio de acción del antibiótico

Los antibióticos se unen a sitios específicos en la bacteria. Si este sitio fuera alterado, el antibiótico no puede efectuar la unión y se torna ineficiente contra la bacteria, esta alteración es físico-química, disminuyendo la afinidad de la droga por el lugar de acción y produciendo pérdida de la actividad antimicrobiana. Este mecanismo es, principalmente usado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas de unión de la penicilina, como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.^{21, 25}

El cambio de la estructura terciaria del sitio donde los antibióticos ejercen su acción es el otro mecanismo de resistencia. Los sitios de acción se pueden encontrar en diferentes componentes bacterianos que involucran actividades celulares vitales como la síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas y síntesis de ADN.²⁶

2.4.1.2 Alteración de la permeabilidad de la membrana mediante porinas

Este mecanismo de resistencia se ve fundamentalmente en bacterias Gram negativas, donde la membrana externa de la envoltura celular rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas, como los antibióticos β -lactámicos, lo que dificulta su paso a través de esta. De este modo dichas sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembrana, que reciben el nombre de porinas.^{27, 28}

Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales y están presentes en la membrana externa de las bacterias Gram negativas que funcionan como filtros que regulan la entrada de algunos elementos como los antibióticos, además de cumplir otras funciones vitales. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico. Los antibióticos β -lactámicos deben penetrar a través de estos canales; cuando se pierde una porina por mutaciones, aumentan la concentración mínima inhibitoria del antibiótico. Las porinas pueden ser específicas o

inespecíficas dependiendo de su selectividad para las moléculas que dejan pasar, como por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* que mediante la pérdida de actividad de la porina OprD puede generar resistencia al imipenem.²⁸

2.4.1.3 Bombas de eflujo

La resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que lleguen a su sitio de acción, este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas. Dentro de los múltiples sistemas de eflujo, los más conocidos son MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN. Estos sistemas así constituidos exportan moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa.^{22, 28}

Se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas, entre ellas los antibióticos; para ello utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de co-transporte iónico como sustrato energético. Las bombas pueden ser específicas para un antibiótico (codificadas en un plásmido y por lo tanto transmisibles) o inespecíficas (presentes en el cromosoma bacteriano). Si se aumenta la expresión de una bomba inespecífica puede generarse resistencia cruzada a múltiples clases fármacos empleándose un solo mecanismo. Usualmente las bombas de eflujo causan pequeños aumentos en las concentraciones mínimas inhibitorias; sin embargo cuando aparecen simultáneamente varios mecanismos de resistencia, se produce una resistencia clínicamente visible.²⁹

2.4.1.4 Inactivación enzimática

Es un mecanismo bastante frecuente, es un proceso molecular relacionado con la producción de diferentes tipos de enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad. Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las β -lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo β -lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Entre las enzimas que se encargan de la modificación de la estructura podemos mencionar a la cloranfenicol acetiltransferasa y también a las enzimas que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasa).^{24, 27}

Las enzimas pueden ser constitutivas las cuales son producidas independientemente de la presencia del antibiótico que, cuando está presente, pasa a ejercer un efecto selectivo; también pueden ser inducibles en la que determinados antibióticos, cuando entran en contacto con la bacteria, desencadenan o estimulan la producción de enzimática que protegerá a la bacteria de los efectos del antibiótico.²¹

2.5 β -LACTAMASAS

Las β -lactamasas son enzimas que inactivan los antibióticos β -lactámicos al hidrolizar el anillo β -lactámico de los mismos. La mayoría de β -lactamasas inactivan ya sea penicilinas o cefalosporinas; pero algunas son capaces de inactivar ambos tipos de antibióticos. La mayoría de bacterias Gram positivas secretan sus β -lactamasas, que inactivan los agentes antimicrobianos β -lactámicos extracelularmente, en el medio que las rodea.

En contraste, las β -lactamasas de las bacterias Gram negativas permanecen dentro de la célula e inactivan los β -lactámicos en el espacio periplásmico, esto es, en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplasmática.

El número de β -lactamasas actualmente descrito es sumamente elevado, incrementándose de manera continua, se han caracterizado más de 1000 β -lactamasas, las familias de los genes más comunes dentro de las enterobacterias son: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{CARB}.³⁰

Actualmente se encuentran en uso dos esquemas de clasificación: la clasificación de Ambler basada en la estructura molecular, distingue cuatro clases de β -lactamasas en función de sus secuencias de aminoácidos. Las clases A, C y D son serina β -lactamasas y la clase B metalo- β -lactamasas dependientes de zinc. Por su parte, la clasificación de Bush-Jacoby, modelo funcional, separa las β -lactamasas en función de los sustratos que hidroliza y de sus perfiles de inhibición, distingue tres categorías y múltiples subgrupos: grupo 1 (clase C de Ambler) cefalosporinasas, grupo 2 (clases A y D de Ambler) representan el mayor grupo de β -lactamasas y el grupo 3 (clase B de Ambler) corresponden a las metalo- β -lactamasas. La clasificación de las β -lactamasas se resume en la **Tabla 1**.³¹

Tabla 1. Clasificación de β -lactamasas de Bush-Jacoby

Bush-Jacoby Grupo 2009	Clase molecular Ambler	Sustrato	Inhibidor		Enzima representativa
			AC	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	No	No	ACT-1,CMY-2,FOX-1,MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Si	No	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	Si	No	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be*	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	Si	No	TEM-3,SHV-2,CTX-M-15,PER-1,VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30,SHV-10

2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Si	No	PSE-1,CARB-3
2ce	A	Carbenicilina	Si	No	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1,OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido,	Variable	No	OXA-11,OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23,OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	CepA
2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenémicos	No	Si	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B	Carbapenémicos	No	Si	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1

Fuente: (Bush, Jacoby *et al.*2010) ³¹

AC: Acido Clavulánico (Inhibidor de β -lactamasas)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

* β -lactamasas de espectro extendido

2.6 β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

En los últimos 20 años la presión ejercida por el uso de antibióticos β -lactámicos de amplio espectro, tales como las oximino-cefalosporinas, ha generado la aparición de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas representan la segunda mayor amenaza mediada por plásmidos que tienen la capacidad de hidrolizar y causar resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y a la vez a monobactámicos, pero no a cefamicinas ni carbapenémicos, siendo inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. ^{32, 33}

Estas β -lactamasas pertenecen a la clase molecular A de Ambler. Derivan de las β -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1), pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush y Jacoby; cuando estas sufren mutaciones en su centro activo, en el que se produce un cambio de uno o más aminoácidos que implica una apertura del sitio activo de la enzima permitiendo un mayor acoplamiento de la gran cadena lateral del β -lactámico, dan lugar a estas otras β -lactamasas de espectro extendido, que hidrolizan a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos, clasificándose en el subgrupo 2be de la clasificación de Bush y Jacoby. Muchas variantes se han descrito solamente una vez o dos veces, pero SHV-2, SHV-5, SHV-11, y SHV-12 y TEM-3, TEM-10, TEM-26, TEM-52 Y TEM-116 están dispersas en muchos países. ^{31, 34}

Existen otras menos prevalentes como PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, incluidas todas ellas en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby. No todas las β -lactamasas de espectro extendido pertenecen al grupo 2be, ya que algunas oxacilinasas, que pertenecen al grupo 2de (clase molecular D), son β -lactamasas de espectro extendido.^{35, 36}

2.6.1 BLEE tipo TEM

Las β -lactamasas de espectro extendido tipo TEM son derivadas de las β -lactamasas de amplio espectro TEM-1 y TEM-2, por modificación en la secuencia de aminoácidos lo que provoca cambios en la estabilidad de la enzima y en el perfil hidrolítico.

La primera enzima de este grupo se reportó en Francia en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*, que contenía una β -lactamasa mediada por plásmidos, esta enzima fue inicialmente denominada CTX-1 porque tenía mayor actividad frente a cefotaxima, pero luego se le denominó TEM-3. Todas las enzimas caracterizadas como β -lactamasas de espectro extendido debido a mutaciones puntuales en el gen bla_{TEM-1} tienen un número limitado de posiciones, y cada una de estas enzimas presenta un sustrato y punto isoeléctrico concreto. Hoy se conocen 217 variantes de TEM, la mayoría de ellas β -lactamasas de espectro extendido, se encuentran preferentemente en aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y también en otras especies de enterobacterias como *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Salmonella sp.*, y otros microorganismos.^{30, 31, 37}

2.6.2 BLEE tipo SHV

En 1983 se reportó en un aislamiento de *Klebsiella ozaenae* en Alemania, una β -lactamasa que difería de SHV-1 por la sustitución de la glicina por serina en la posición 238 (Gly-238→Ser). Esta mutación confiere actividad frente a cefalosporinas de amplio espectro y está asociada con un gran incremento de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a cefotaxima y un incremento moderado en la CMI de ceftazidima respecto a las concentraciones mínimas inhibitorias de SHV-1 para estos antibióticos, y fue denominada SHV-2. El residuo de serina en la posición 238 es fundamental para una hidrólisis eficaz de ceftazidima, y el residuo de lisina en la posición 240 para la hidrólisis eficaz de cefotaxima.^{30, 31, 38}

Varias mutaciones puntuales del gen bla_{SHV-1} que producen sustituciones en aminoácidos críticos en el centro activo de la enzima es lo que provoca el aumento del espectro de acción, estos cambios de aminoácidos provocan un agrandamiento del centro activo de la enzima permitiendo el acoplamiento de la larga cadena lateral R de las cefalosporinas de amplio espectro. Existen 183 variantes para SHV, y la mayoría de las β -lactamasas de espectro extendido de tipo SHV se han encontrado en *Klebsiella pneumoniae*, aunque también se han descrito en *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.^{37, 39}

2.6.3 BLEE tipo CTX-M

A principios de 1989, en Alemania se informó un aislamiento clínico de una *Escherichia coli* resistente a cefotaxima, la cual era productora de una β -lactamasas de espectro extendido no TEM, no SHV denominada CTX-M-1, debido a que hidrolizan preferentemente a la cefotaxima, todas estas enzimas presentan un residuo de serina en la posición 237, el cual juega un papel muy importante en su espectro ampliado de sustrato. Existen 150 enzimas tipo CTX-M y se clasifican filogenéticamente en cinco grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25).^{31, 40}

Estas enzimas tan solo muestran el 40% de similitud con las β -lactamasas tipo TEM y SHV, sin embargo los genes bla_{CTX-M} poseen un alto grado de similitud con los genes cromosómicos bla_{KLUVA} que codifican las β -lactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*.^{30, 41}

Presentan mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima y ceftriaxona que frente a ceftazidima; además estas β -lactamasas son más activas frente a cefepime que el resto de las β -lactamasas de espectro extendido, presentando concentraciones mínimas inhibitorias para cefepime más altas. Se han descrito en varias especies de enterobacterias, destacando *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y *Escherichia coli*, además un mismo organismo puede contener β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX junto con SHV o junto β -lactamasa tipo AmpC, lo que implica un cambio en su fenotipo de resistencia.⁴²

2.7 PLÁSMIDOS

Son moléculas de DNA bacteriano extra-cromosómicos de doble cadena circular o lineal, con longitud variable y constituyen entre el 1% y >10% del genoma de muchas especies bacterianas. Su tamaño varía desde uno hasta varios cientos de kilobases (Kb). Su número también puede variar, desde una sola copia hasta cientos por célula; en general los plásmidos más pequeños tienen un número elevado de copias y los plásmidos de gran tamaño se encuentran en número muy reducido (uno o dos). En cepas de igual origen los plásmidos se encuentran en idéntico número, tamaño y peso molecular.^{38, 43}

Se replican intracelularmente de manera autónoma y, aunque en la mayoría de las ocasiones no son esenciales para la viabilidad de la célula, contienen genes que confieren distintas propiedades como la resistencia a antibióticos, virulencia o actividades metabólicas; están constituidos por una región constante que incluye determinantes genéticos para sus funciones esenciales (replicación, mantenimiento y transferencia) y una región variable de ADN heterólogo (genes de resistencia).⁴⁹ Estos elementos juegan un papel crucial en la evolución y adaptación bacterianas, ya que son mediadores del intercambio de material genético entre estas poblaciones; y la transferencia de la información genética contenida en el plásmido de una bacteria donadora a una receptora se conoce con el nombre de conjugación.⁴⁴

Los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia, y desde el punto de vista de Salud Pública son las estructuras de mayor relevancia epidemiológica.⁴⁵ Los transposones son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser traslocados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, esto gracias a un sistema de recombinación propio que, 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, facilitando la expansión de la resistencia. Algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una cepa multirresistente. Los antibióticos afectados particularmente por este mecanismo son los β -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfamidas.^{30, 34}

2.7.1 Análisis de perfil plasmídico

Se define como perfil plasmídico al contenido total de plásmidos presente en un microorganismo representado por un patrón de bandas, donde cada banda representa un plásmido. Este perfil plasmídico varía dependiendo de la cantidad y el tamaño de los plásmidos presentes en el microorganismo en cuestión.⁴⁶

El análisis de este contenido total plasmídico es el primer método genotípico de tipificación para el estudio de un brote epidémico y por su mediana complejidad, fue una de las técnicas epidemiológicas moleculares más utilizadas en los años 70 y 80. Posee un alto poder de discriminación sobre todo cuando se usa en combinación con otros métodos de tipificación y una misma metodología puede ser aplicada a distintos géneros y especies bacterianas. En la actualidad existen otras técnicas, y las indicaciones de mayor utilidad para el uso del estudio de los perfiles plasmídicos serían establecer la relación epidemiológica entre diferentes plásmidos obtenidos de la misma o diferente especie bacteriana y ayudar a la localización de otros elementos extracromosómicos (transposones, integrones). La aplicación adicional de enzimas de restricción al estudio del ADN plasmídico es útil sobre todo en aquellas cepas con un único plásmido o cuando existan perfiles plasmídicos similares.^{46, 47}

Para análisis de plásmidos primero es necesario partir de un cultivo bacteriano adecuado, centrifugar el cultivo, aplicar un método de extracción y purificar el ADN plasmídico obtenido. Posteriormente podremos medir el tamaño de los plásmidos y establecer las relaciones epidemiológicas. Existen muchos métodos para aislar ADN puro de plásmidos a partir de lisados celulares bacterianos, pero el método más popular para extraer y purificar el ADN plasmídico es el de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly en 1979.⁴⁸

La cantidad y calidad de ADN plasmídico final obtenido vienen determinadas por diferentes factores como el número de copias, el tamaño del ADN heterólogo y la cepa hospedadora. Los plásmidos de alto peso molecular o con grandes

secuencias en su región variable suelen estar en bajo número de copias y el rendimiento de su extracción puede optimizarse modificando el volumen, el medio de cultivo y la técnica de lisis. Los medios de cultivo suelen ser líquidos y con suplemento antibiótico para lograr amplificar las células que portan el plásmido. El más utilizado es el medio Luria Bertani (LB). La obtención de perfiles plasmídicos idénticos o muy similares en diferentes aislados debe ser interpretada con precaución ya que no siempre refleja una relación epidemiológica entre los mismos. Hay que tener presente que especies bacterianas próximas evolutivamente adquieren con frecuencia plásmidos similares y que determinados patrones plasmídicos pueden ser muy estables en determinadas especies como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.⁴⁶

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Tipo de investigación: Descriptivo observacional de corte transversal.

3.2 Población: Durante el año 2012 se tuvieron 2142 urocultivos positivos, de los cuales 1585 correspondieron a aislamientos de *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*, de los que se tomaron los realizados durante los meses de Noviembre y Diciembre del 2012 en los cuales se obtuvieron 280 aislamientos positivos para *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*.

3.3 Muestra: Un total de 77 aislamientos de *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido fueron recuperadas de muestras de orina con solicitud de urocultivo enviadas al Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño durante Noviembre y Diciembre del 2012.

3.4 Variables

- ❖ *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido.
- ❖ Perfiles plasmídicos.

3.5 Técnicas e instrumentos

La información de cada aislamiento fue obtenida de las fichas elaboradas de recolección de datos para cada aislamiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido obtenidas en los meses de Noviembre y diciembre del 2012. (Anexo 1)

3.6 Plan de procedimientos

El aislamiento bacteriano y las pruebas de susceptibilidad se realizaron en el laboratorio de Microbiología del INSN durante los meses de Noviembre y Diciembre del 2012, de acuerdo a los protocolos del Instituto Nacional de Salud del Niño. (Anexo 2)

3.6.1 Conservación de los aislamientos:

Los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido que se fueron recuperando de urocultivos fueron conservados dentro de viales que contenían caldo tripticasa de soya con glicerol al 20 % y mantenidos en refrigeración a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

3.6.2 Extracción de ADN plasmídico:

La extracción de plásmidos se realizó usando el kit GeneJET™ Plasmid Miniprep de Thermo Scientific – Molecular Biology, siguiendo los pasos establecidos en el manual del kit. (Anexo 3)

La extracción del ADN se empezó en Noviembre del 2013; los aislamientos conservados en caldo tripticasa de soya con glicerol al 20 % se repicaron en agar MacConkey y se incubaron a 37 °C por 24 horas y a partir de los cultivos frescos del medio selectivo se tomó una colonia para inocular en 5 mL de Caldo Luria y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Una vez observado el crecimiento bacteriano en el medio mediante la presencia de turbidez, para obtener las células bacterianas, se centrifugó el medio a 8000 rpm durante 2 minutos, luego se desechó el sobrenadante haciendo uso de una micropipeta y se removió los restos del medio hasta que solo nos quedáramos con el sedimento de células bacterianas.

Se adicionó 250 μ L de la solución de resuspensión (previamente se le adicionó la RNAsa A) al sedimento y se hizo uso de un vórtex para su homogenización hasta que no quedara ningún resto celular, para luego transferir la suspensión bacteriana a un tubo para microcentrifuga; después se agregó 250 μ L de la solución de lisis y se mezcló intensamente por inversión el tubo de 4 a 6 veces hasta que la solución se tornase viscosa y ligeramente clara. Luego se procedió a adicionar 350 μ L de la solución de neutralización y se mezcló de manera inmediata invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces hasta que la solución se torne viscosa y ligeramente turbia, luego se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm para sedimentar los restos celulares y el ADN cromosómico.

Después de la centrifugación, por decantación se transfirió el sobrenadante a las columnas GeneJET™ provistas por el kit de extracción, se evitó transferir el precipitado blanco que se formó luego de la centrifugación, se volvió a centrifugar durante 1 minuto a 14,000 rpm y se descartó el flujo que pasa a través de la columna y que se deposita en el tubo de colección; se agregó 500 μ L de la solución de lavado previamente diluida con etanol al 96 % (20 mL más 35 mL respectivamente) y se centrifugó durante 60 segundos a 14,000 rpm y se descartó nuevamente el flujo que pasa a través de la columna, este paso se repitió una vez más para posteriormente centrifugar durante 1 minuto más para eliminar cualquier resto de la solución de lavado. Luego se transfirió la columna GeneJET™ a un

tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregó 50 µL del buffer de elución (previamente calentado a 70 °C) en el centro de la columna para eluir el ADN plasmídico; y finalmente se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente para luego centrifugar por 2 minutos a 14,000 rpm y obtener en el tubo de microcentrífuga los plásmidos purificados para poder conservarlos a -20 °C.

3.6.3 Electroforesis

Una vez finalizada la extracción del ADN plasmídico de todos los aislamientos se continuó con la realización de las corridas electroforéticas a partir de finales de Abril del 2014; durante dos semanas se realizaron electroforesis de prueba para ajustar tiempos, voltajes y volúmenes de la cantidad de ADN extraído a usar.

Para la preparación del gel de Agarosa al 0.8% primero se pesó 0.160 gramos de Agarosa y se adicionó 20 mL del buffer de corrida (1x Tris acetato-EDTA) para luego ser disuelto mediante calor en un microondas durante 40 segundos y ser colocado en la cámara electroforética y esperar hasta su solidificación.

Una vez solidificado el gel se le sumergió en el buffer de corrida, se mezcló 10 µL de la muestra de ADN plasmídico de cada aislamiento con 2 µL del buffer de carga (6x DNA Loading dye) y se colocó cada muestra en el pocillo correspondiente del gel de agarosa al 0.8 % teniendo mucho cuidado de que la muestra no se traspase a los pocillos próximos; cada gel contaba con 8 pocillos, 7 pocillos para las muestras y un pocillo en el que paralelamente se cargó 5 µL del DNA Ladder plus de 1 Kb; todas las corridas se realizaron a un voltaje constante de 100 V por 45 minutos para permitir la migración de los diferentes plásmidos que pudiesen estar presentes en cada aislamiento; una vez finalizada cada corrida electroforética el gel era pasado de la cámara electroforética a un envase con bromuro de etidio para realizar la tinción del gel sumergiéndolo durante 10 minutos para luego visualizar los patrones de bandas obtenidos haciendo uso de un transiluminador ultravioleta. De los 77 aislamientos de los cuales se realizó la extracción de ADN plasmídico solo 62 mostraron algún patrón de bandas, ya sea porque la extracción no se realizó de manera correcta en algún paso o porque la conservación del aislamiento no fue la óptima haciendo que la cantidad de ADN recuperado fuera muy baja o nula; finalmente se obtuvo una imagen de cada corrida realizada mediante el uso de una cámara fotográfica.

3.7 Análisis de datos

La información obtenida de las fichas de recolección de datos de los diferentes aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β-lactamasas de espectro extendido y que cumplieran los criterios de inclusión* planteados, pertenecientes a pacientes hospitalizados y de consultorio externo colectados durante el periodo de Noviembre a Diciembre del 2012, fueron ingresados en una base de datos, para lo cual se utilizó Microsoft Excel XP Profesional 2010.

*** Criterios de inclusión:**

- ❖ Aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* obtenidos en pacientes entre 0 y 14 años de edad en el Instituto Nacional de Niño.
- ❖ Aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido obtenidas de urocultivo en el Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño.
- ❖ Para aislamientos procedentes de comunidad se considerarán aquellos obtenidos en pacientes que acudan por consulta externa o hayan ingresado por emergencia y no tengan más de 48 horas hospitalizados.
- ❖ Para aislamientos de origen intrahospitalario se considerarán aquellos obtenidos en pacientes que se encuentren hospitalizados como mínimo 48 horas.

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 18.0. Se realizó el análisis descriptivo univariado, bivariado de datos, para construir tablas simples de doble entrada, gráficos de barras.

Para la elaboración de los dendrogramas se generó una matriz de presencia o ausencia de bandas representadas por 0 y 1 (0; ausencia y 1: presencia) para lo cual se utilizó Microsoft Excel XP Profesional 2003 y se analizó mediante una matriz de similitud haciendo uso del software de análisis taxonómico multivariado NTSYS-PC versión 2.1; el cual calculó un coeficiente de similitud entre pares de conjuntos variables, transformando estos coeficientes en las distancias y haciendo un agrupamiento utilizando el algoritmo UPGMA. Se elaboraron dendrogramas tanto de los aislamientos de origen intrahospitalario así como de origen comunitario, tanto de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y un dendrograma en conjunto de todos los aislamientos obtenidos para proceder al análisis de los mismos y de esta manera poder establecer la posible relación genética existente entre ellos.

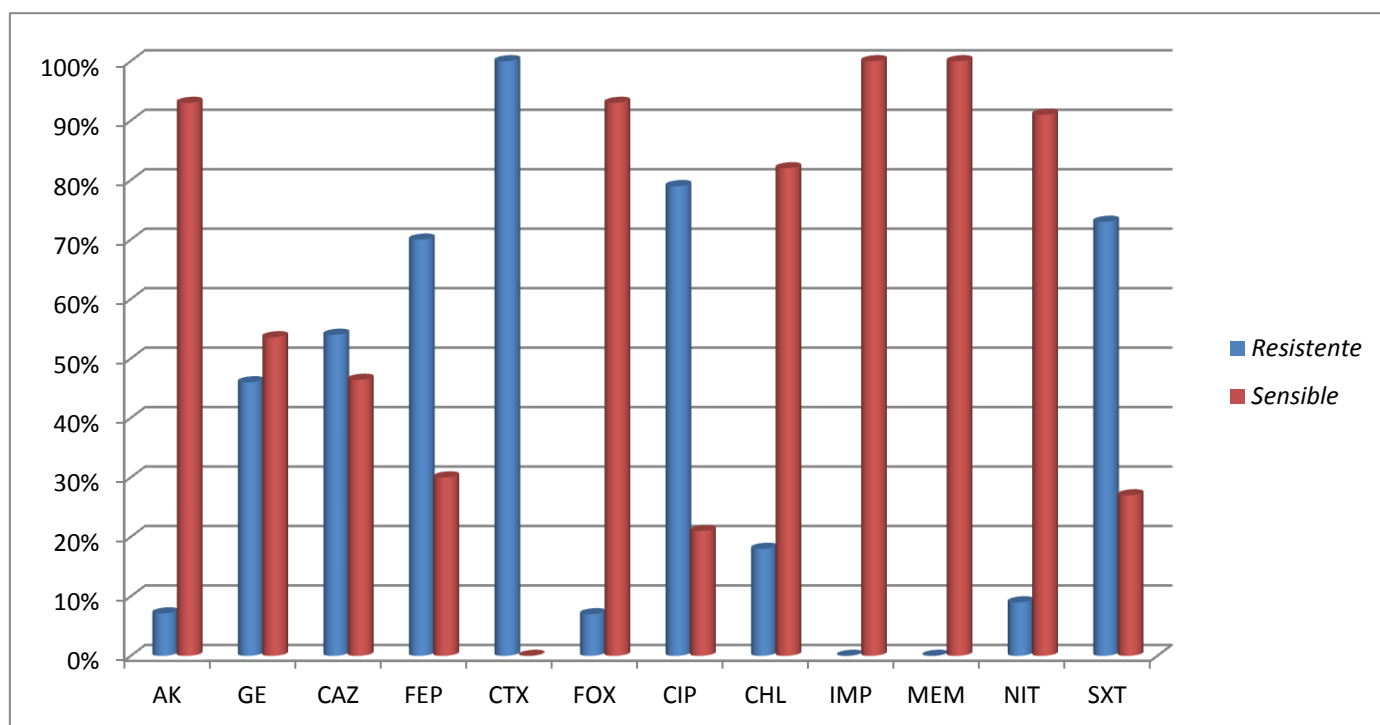
3.8 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos del presente estudio preservaron la integridad y los derechos fundamentales de los pacientes sujetos a investigación, de acuerdo con los lineamientos de las buenas prácticas clínicas y de ética en investigación biomédica. Se garantiza la confidencialidad de los datos obtenidos.

IV. RESULTADOS

El 100 % de los aislamientos de *Escherichia coli* mostraron resistencia a la Cefotaxima, otros antibióticos que presentaron una alta tasa de resistencia fueron la Ciprofloxacina y el Trimetoprim-Sulfametoxazol (78.57 % y 73.21 % respectivamente) entre los más significativos; caso contrario presentado con respecto al Imipenem y Meropenem en el que el 100 % de los aislamientos mostraron sensibilidad ante estos antibióticos.

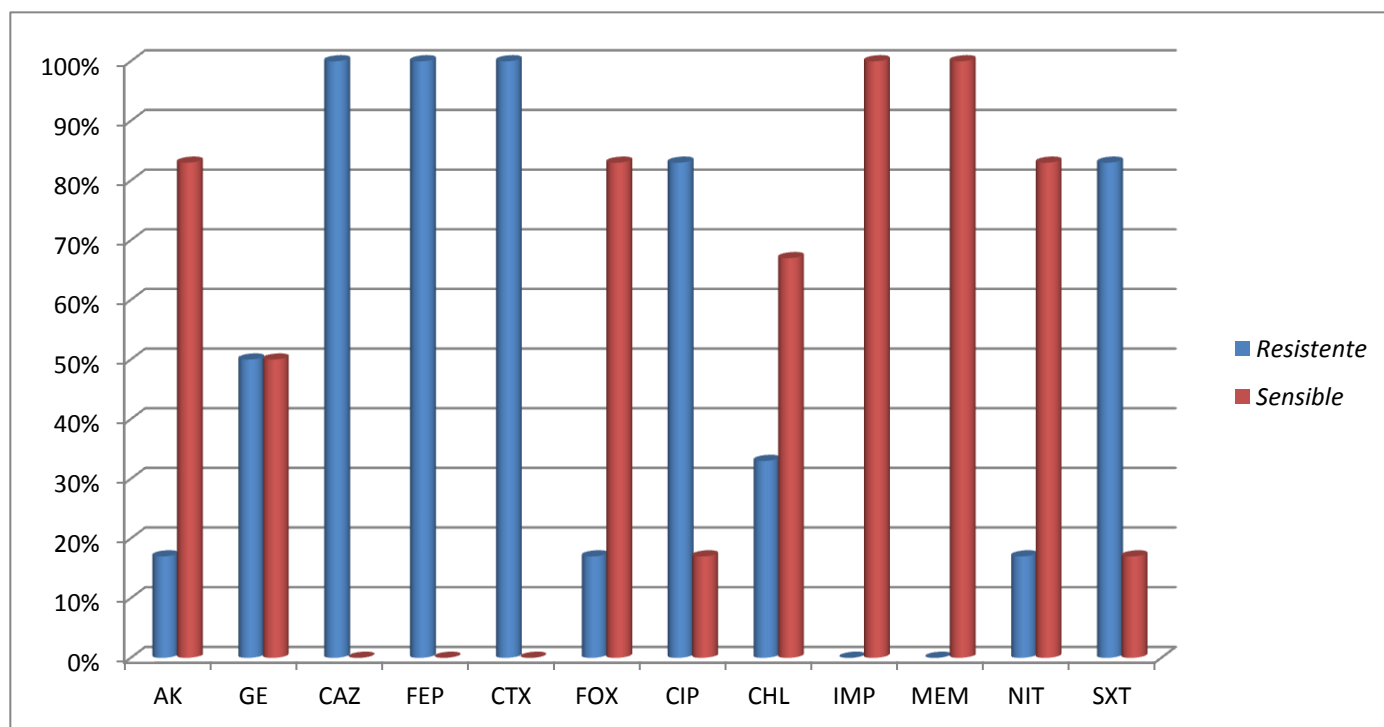
Grafico 1. Patrón de susceptibilidad de *Escherichia coli* (%)



Ak: Amikacina GE: Gentamicina CAZ: Ceftazidima FEP: Cefepime CTX: Cefotaxima
 FOX: Cefoxitina CIP: Ciprofloxacina CHL: Cloranfenicol IMP: Imipenem
 MEM: Meropenem NIT: Nitrofurantoína SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol

El 100 % de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* mostraron resistencia tanto a la Cefotaxima como a la Ceftazidima, seguidos también al igual que con los aislamientos de *Escherichia coli* por la Ciprofloxacina y el Trimetoprim-Sulfametoxazol (83.33 % en ambos casos); el 100 % de los aislamientos mostraron sensibilidad ante el Imipenem y el Meropenem caso también similar al de los aislamientos de *Escherichia coli*.

Grafico 2. Patrón de susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* (%)



Ak: Amikacina GE: Gentamicina CAZ: Ceftazidima FEP: Cefepime CTX: Cefotaxima
FOX: Cefoxitina CIP: Ciprofloxacina CHL: Cloranfenicol IMP: Imipenem
MEM: Meropenem NIT: Nitrofurantoína SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol

Figura N°1

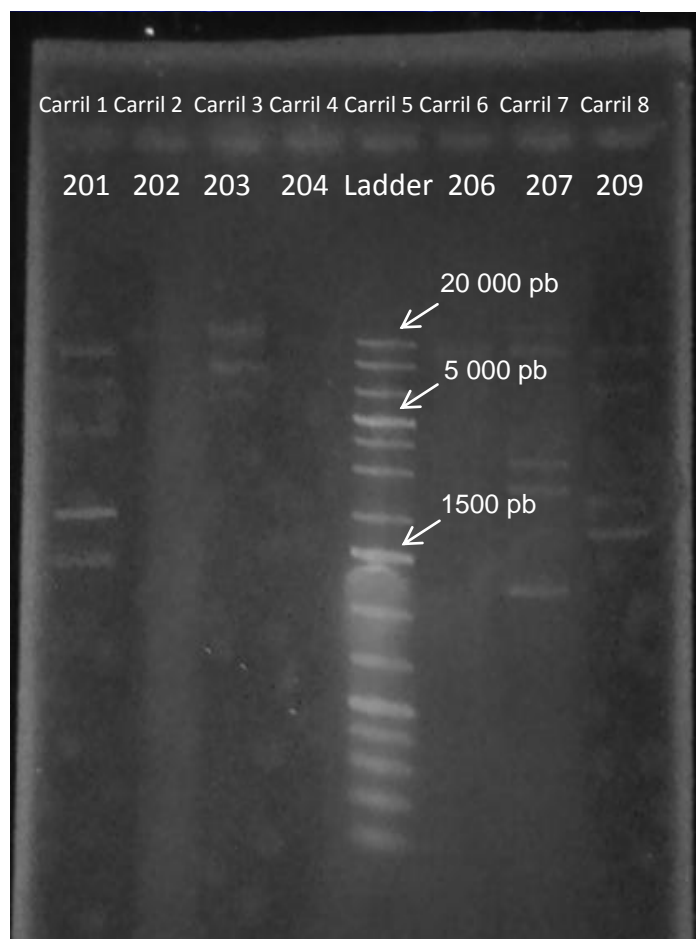


Figura N° 1: Patrones de bandas obtenidos. Carril 1: Mx 201, carril 2: Mx 202, carril 3: Mx 203, carril 4: Mx 204, carril 5: Ladder: 1 Kb plus, carril 6: Mx 206, carril 7: Mx 207, carril 8: Mx 209.

Mx 201: 5 bandas

Mx 202: 1 banda

Mx 203: 3 bandas

Mx 204: 1 banda

Mx 206: 1 banda

Mx 207: 5 bandas

Mx 209: 5 bandas

Figura N°2

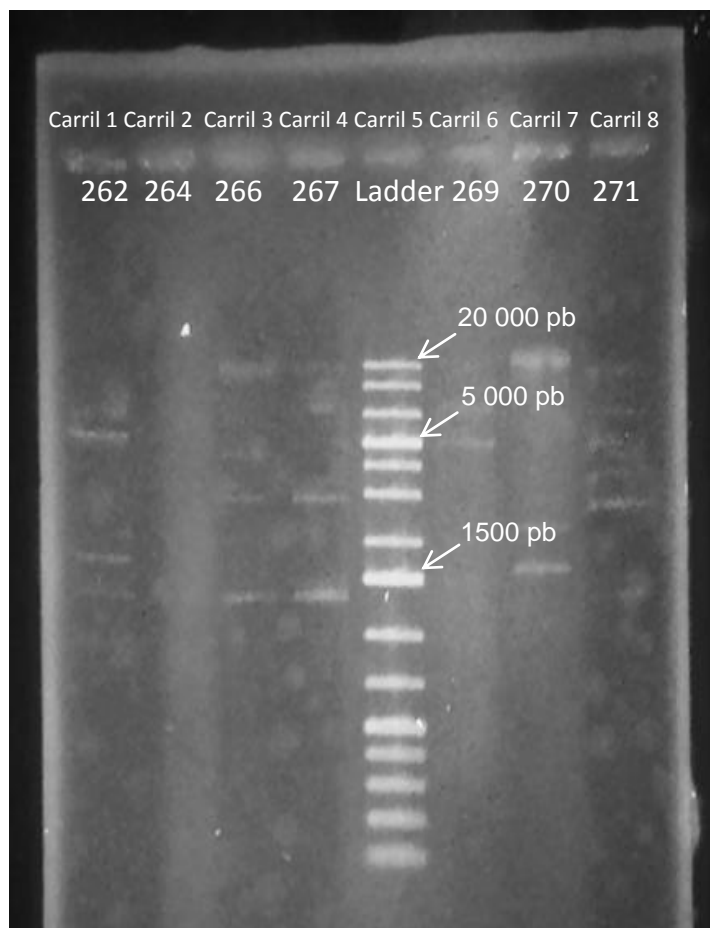


Figura N° 2: Patrones de bandas obtenidos. Carril 1: Mx 262, carril 2: Mx 264, carril 3: Mx 266, carril 4: Mx 267, carril 5: Ladder: 1 Kb plus, carril 6: Mx 269, carril 7: Mx 270, carril 8: Mx 271.

Mx 262: 6 bandas

Mx 264: 1 banda

Mx 266: 4 bandas

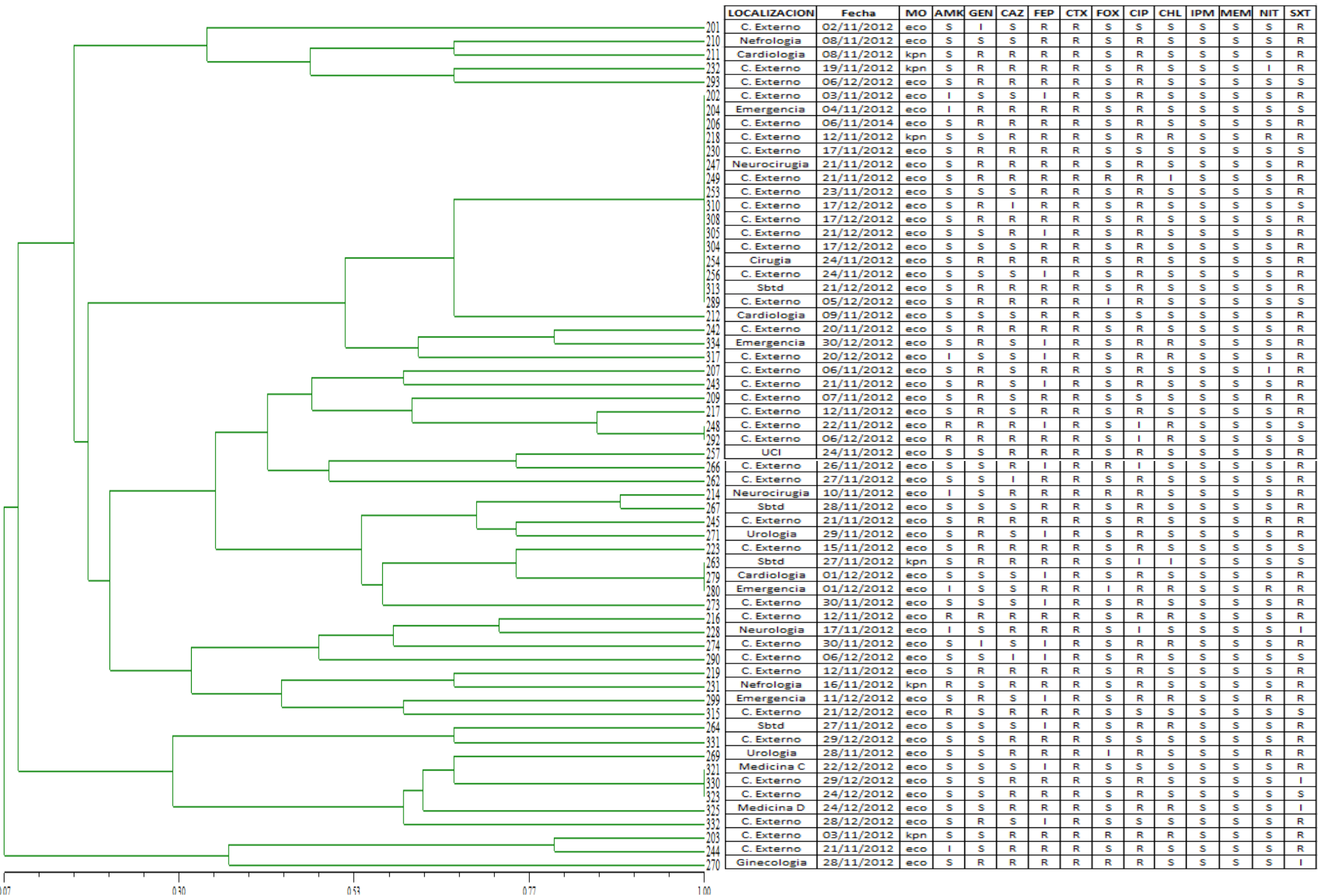
Mx 267: 5 bandas

Mx 269: 2 bandas

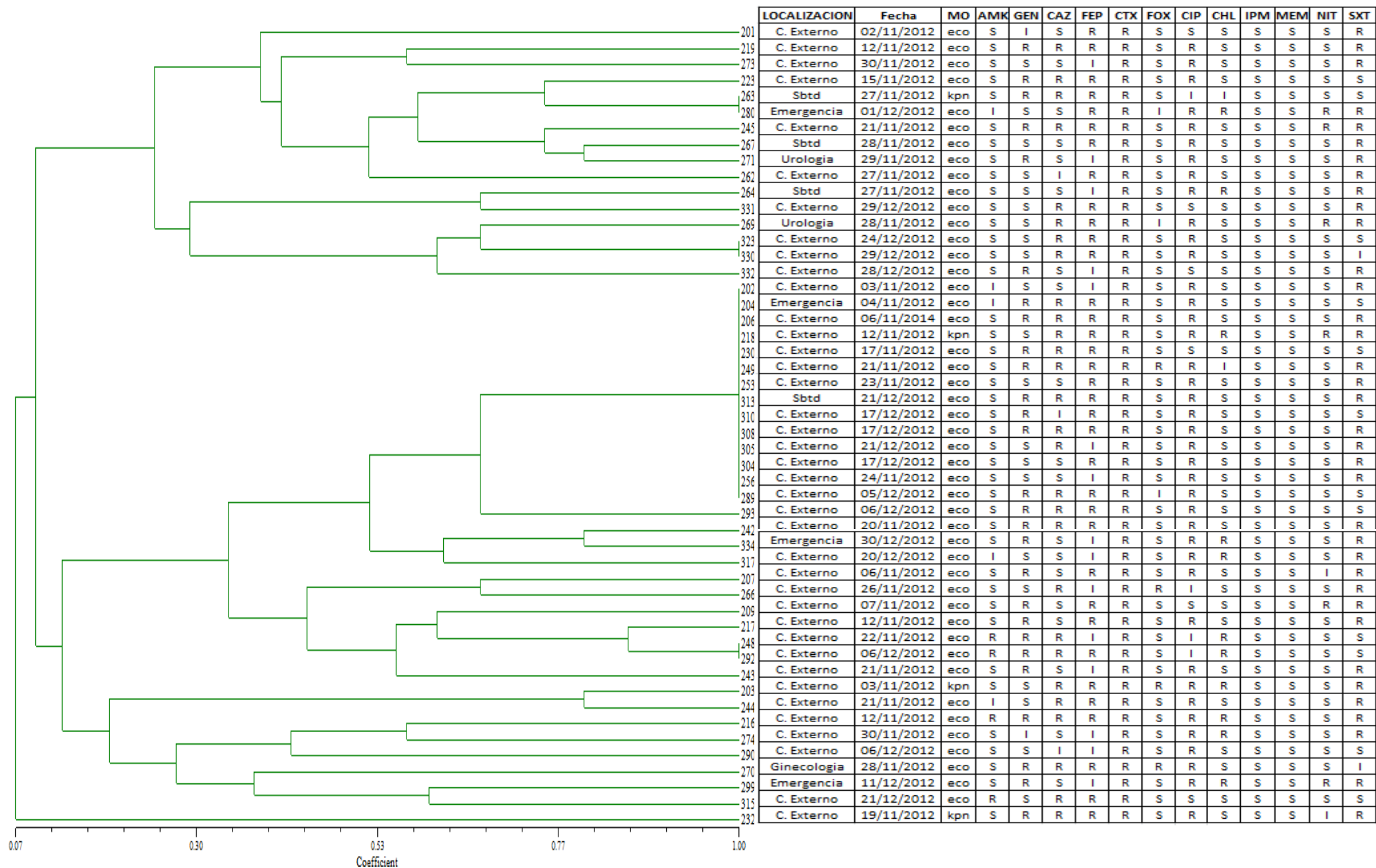
Mx 270: 3 bandas

Mx 271: 5 bandas

Dendrograma 1. Aislamientos de Consultorio Externo y Hospitalización (*E. coli* y *K. pneumoniae*)



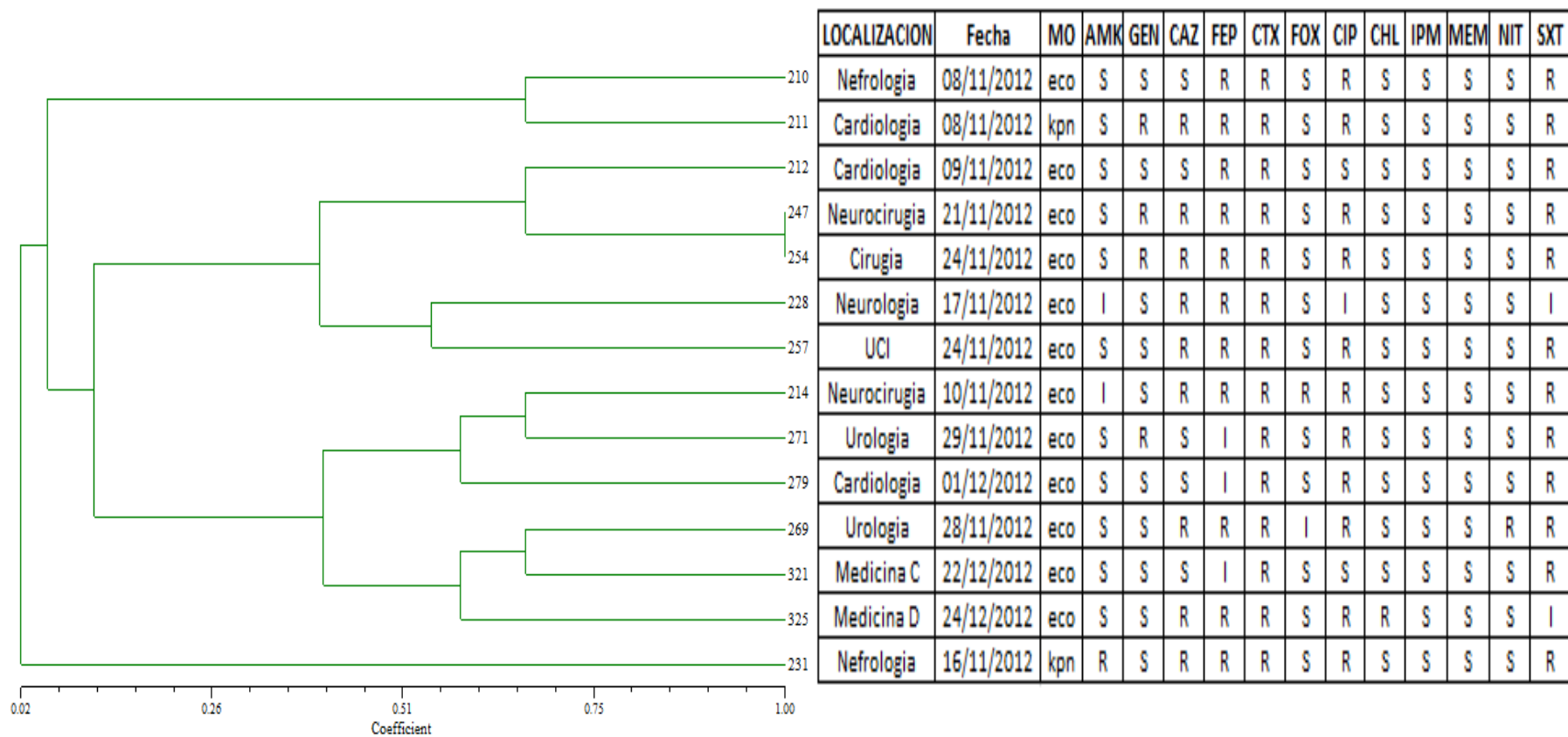
Dendrograma 2. Aislamientos de Consultorio Externo (*E. coli* y *K. pneumoniae*)



En el dendrograma N°1 se distinguieron 24 genotipos distintos entre los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* tanto de origen hospitalario como comunitario; 4 clusters formados presentaron aislamientos con el 100 % de similitud genética, uno de ellos formado por 16 aislamientos, de los cuales solo un aislamiento corresponde a *Klebsiella pneumoniae* (Mx: 218) y dos de ellos a aislamientos de origen hospitalario ambos de *Escherichia coli* (Mx: 247, 254), de los otros 3 cluster con el 100 % de similitud, 2 de ellos también incluyeron un aislamiento de *Escherichia coli* de origen hospitalario (Mx: 279, 321).

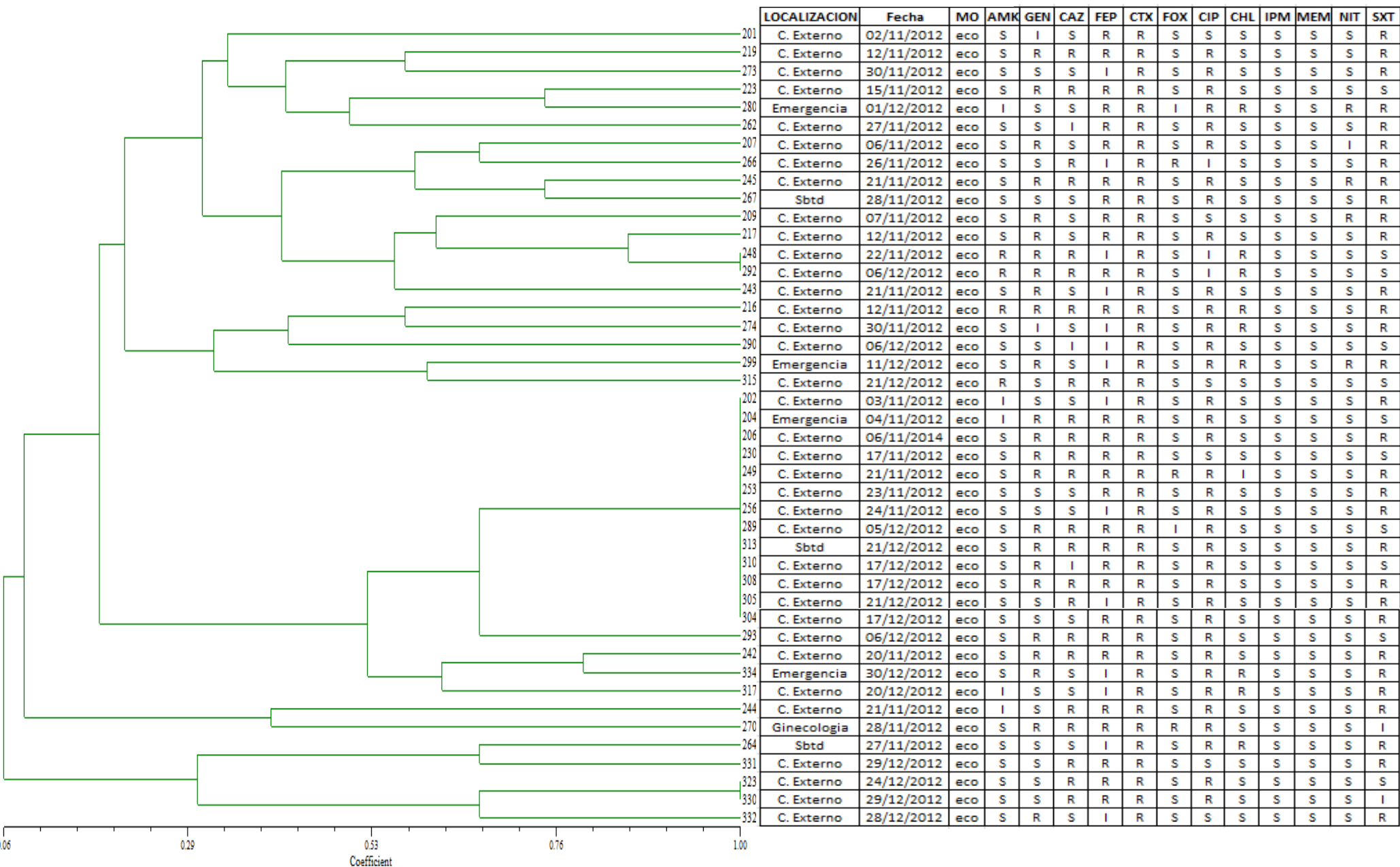
En el dendrograma N°2, que incluía solo los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* de origen comunitario, se distinguieron 19 genotipos distintos manteniéndose los 4 cluster que presentaban el 100 % de similitud genética, pero reduciéndose la cantidad de aislamientos en 3 de los 4 cluster debido a que incluían muestras de origen hospitalario.

Dendrograma 3. Aislamientos de Hospitalización (*E. coli* y *K. pneumoniae*)



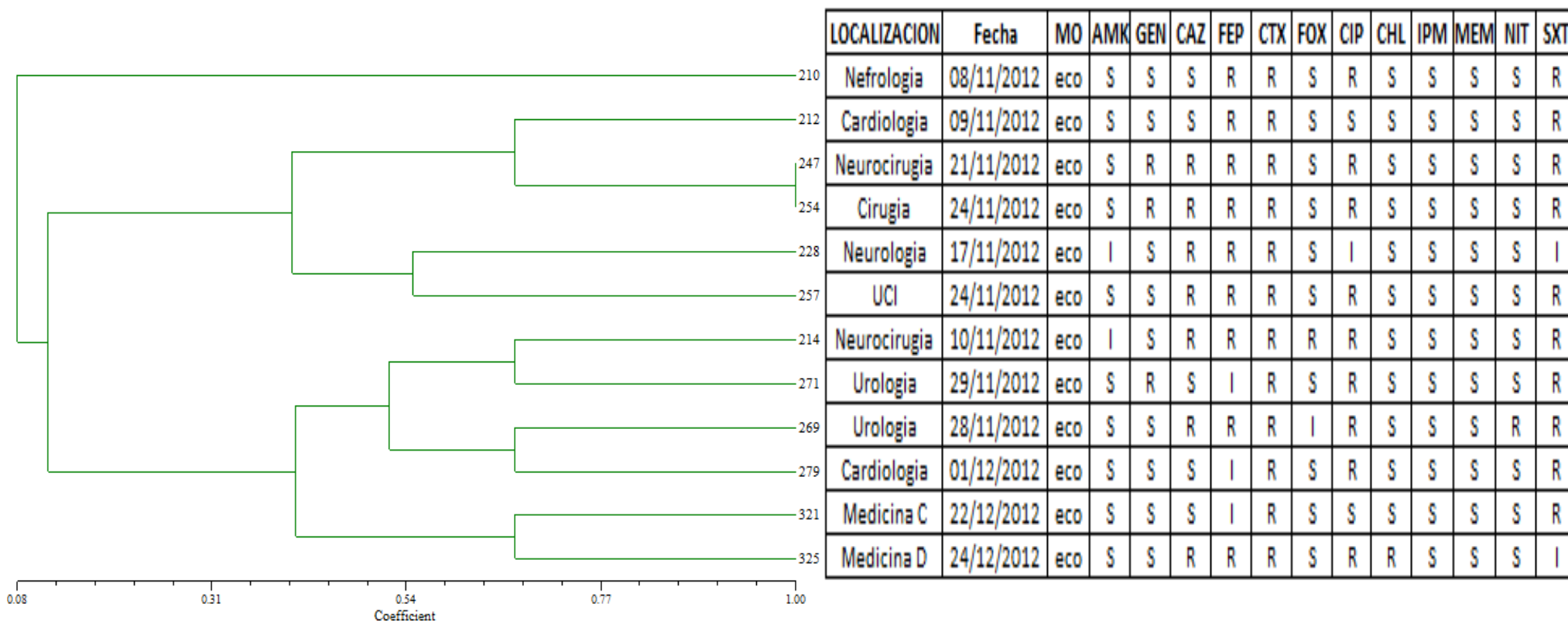
En el dendrograma N°3, conformado por aislamientos de origen hospitalario, se distinguieron 9 genotipos en el que solo uno de los cluster formados presentó 2 aislamientos con el 100 % de similitud ambos *Escherichia coli*.

Dendrograma 4. Aislamientos de Consultorio Externo (*E. coli*)



En el dendrograma N°4, el cual incluye solo los aislamientos de *Escherichia coli* de origen comunitario, se observaron 18 genotipos donde el número de los cluster que presentaban el 100 % de similitud genética se redujo a 3, en comparación al dendrograma 2.

Dendrograma 5. Aislamientos de Hospitalización (*E. coli*)



En el dendrograma N°5, compuesto por los aislamientos de *Escherichia coli* de origen hospitalario, solo se observaron 7 genotipos distintos y tan solo un cluster con aislamientos con el 100 % de similitud genética, el mismo que estaba presente en el dendrograma N°3.

Dendrograma 6. Aislamientos de Consultorio Externo (*K. pneumoniae*)



	LOCALIZACION	Fecha	MO	AMK	GEN	CAZ	FEP	CTX	FOX	CIP	CHL	IPM	MEM	NIT	SXT
203	C. Externo	03/11/2012	kpn	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
218	C. Externo	12/11/2012	kpn	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R
232	C. Externo	19/11/2012	kpn	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	I	R
263	Sbtd	27/11/2012	kpn	S	R	R	R	R	S	I	I	S	S	S	S

Dendrograma 7. Aislamientos de Hospitalización (*K. pneumoniae*)



	LOCALIZACION	Fecha	MO	AMK	GEN	CAZ	FEP	CTX	FOX	CIP	CHL	IPM	MEM	NIT	SXT
211	Cardiología	08/11/2012	kpn	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
231	Nefrología	16/11/2012	kpn	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R

En los dendrogramas N°6 y N°7, en los que se analizaron los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de origen comunitario y hospitalario respectivamente, la similitud genética que se observó fue del 0 %, indicando que no existe relación alguna entre los aislamientos analizados.

V. DISCUSIONES

Escherichia coli y *Klebsiella pneumoniae* son dos especies bacterianas asociadas frecuentemente a infecciones adquiridas en la comunidad y hospitalarias, capaces de adquirir mecanismos de resistencia a los antimicrobianos mediados por plásmidos como las β -lactamasas de espectro extendido, por lo que son las especies bacterianas a escoger a fin de evaluar la probable diseminación intrahospitalaria de plásmidos portadores de los determinantes de resistencia.⁴⁴

Los patrones de susceptibilidad mostraron que los antibióticos que presentaron mayor resistencia, sin considerar a las cefalosporinas de 3^{era} y 4^{ta} generación, fueron la Ciprofloxacina (CIP) y el Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT) tanto en los aislamientos de *Escherichia coli* (78.57 y 73.21 % respectivamente) como en los de *Klebsiella pneumoniae* (83.33 % en ambos casos), resultados cercanos con los datos obtenidos en un estudio realizado en Bulgaria por M. Marhova y colaboradores, en el que el 71.43 % de los aislamientos de *Escherichia coli* presentó resistencia al Trimetoprim-Sulfametoxazol, pero solo el 46.43 % a Ciprofloxacina; asimismo en un estudio realizado en la India por R Ranjbar y colaboradores con aislamientos de bacterias uropatógenas en pacientes pediátricos, el 70 % de los aislamientos de *Escherichia coli* presentó resistencia al Trimetoprim-Sulfametoxazol mientras que en *Klebsiella pneumoniae* fue del 50 %.^{49,50}

La resistencia a 3 o más familias de antibióticos estuvo presente en el 77.5 % de los aislamientos. Este resultado es muy similar al del estudio realizado por S. Farshad y colaboradores en la India, con un porcentaje del 77 % de los aislamientos con multidrogorresistencia; en Bangladesh en el estudio de T. Lina y colaboradores el 87 % de los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* presentaron resistencia a por lo menos 3 clases de antibióticos diferentes.^{51,52}

Los perfiles plasmídicos de los aislamientos de *Escherichia coli* mostraron de 1 a 7 bandas con tamaños entre aproximadamente 1.5 Kb hasta 20 Kb, solo 3 aislamientos presentaron un plásmido con un tamaño mayor a 20 Kb; en el caso de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* presentaron de 1 a 5 bandas con un tamaño molecular entre aproximadamente 2 Kb hasta 20 Kb y solo 1 aislamiento presentó un plásmido con un tamaño mayor a 20 Kb. En el estudio realizado por S. Farshad y colaboradores los aislamientos de *Escherichia coli* tenían entre 1 a 10 bandas con un rango de tamaños más amplio desde 1 Kb llegando hasta los 33 Kb; en un estudio con aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, M. Vasquez y colaboradores en el análisis de los perfiles plasmídicos de estos aislamientos reveló de 1 a 9 bandas distintas, mientras que Mustafa Aladog y colaboradores determinaron en los distintos aislamientos de su estudio productores de β -lactamasas de espectro extendido de 1 a 8 bandas con tamaños entre 1.6 Kb y 30.1 Kb. Adicionalmente en un estudio realizado con aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Instituto Nacional de Salud del Niño, haciendo

uso de otra técnica molecular como el REP-PCR, la impronta genética mostró de 2 a 8 bandas con pesos moleculares entre 250 pb hasta 2 000 pb.^{51, 53-55}

El plásmido más común que presentaron los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* fue el de 20 Kb (53 %), tamaño cercano al descrito por A. Celebi y colaboradores, en el que el plásmido de 19 Kb fue el más común en todos los aislamientos, S. Khadgi y colaboradores también describieron un plásmido de aproximadamente 23 Kb como el más común entre los aislamientos estudiados, y Nasreen y colaboradores haciendo uso de una enzima de restricción encontraron como el plásmido más común el de 26 Kb; resultado distinto fue el presentado por S Farshad y colaboradores en el que sólo el 1.31 % de los aislamientos poseía un plásmido con un tamaño entre 21 y 22 Kb, siendo el más común el plásmido con tamaño entre 4 a 5 Kb.^{51, 56-58}

En los dendrogramas obtenidos se consideró significativo respecto a la relación filogenética un porcentaje de similitud superior al 60 % entre los aislamientos estudiados, observándose un resultado por encima de ese valor. S. Farshad y colaboradores consideraron un valor a partir de 50 % de similitud, distinguiendo 22 genotipos distintos entre los aislamientos de *Escherichia coli*; mientras que en el estudio realizado mediante REP-PCR se consideró significativo un valor por encima de 70%.^{51,55}

Finalmente no se encontró una relación muy significativa entre los perfiles plasmídicos obtenidos y los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos estudiados mas que en tan solo 5 aislamientos, caso similar fue el estudio de M. Vasquez y colaboradores en el que no se encontró asociación entre los perfiles plasmídicos y las variables estudiadas. A. Celebi y colaboradores tampoco encontraron una relación cercana entre los perfiles plasmídicos y la resistencia a los antibióticos de los aislamientos estudiados; asimismo ninguna relación pudo ser detectada entre el patrón de resistencia antimicrobiana y el análisis de los perfiles plasmídicos en el estudio llevado a cabo por S. Khadgi y colaboradores debido a las limitaciones de la técnica utilizada, esto llevaría a la utilización de otros métodos de genotipificación en el estudio de brotes, para demostrar la relación clonal entre aislamientos como en el estudio realizado por H. Bailon y R. Sacsquispe, en el que se hizo uso de tres métodos: ERIC-PCR, REP-PCR y electroforesis de campo pulsado (PFGE) pudiendo demostrar la relación clonal entre aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido.^{53, 56, 57, 59}

VI. CONCLUSIONES

1. La detección fenotípica de las β -lactamasa de espectro extendido, en el caso de *Escherichia coli*, mostró que el 100% de los aislamientos fue resistente a Cefotaxima, por lo que podría tratarse de una β -lactamasa de espectro extendido de tipo CTX-M en la mayoría de los casos, lo que nos daría una ayuda para poder establecer relación con respecto a los perfiles plasmídicos obtenidos.
2. En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, la detección fenotípica de las β -lactamasa de espectro extendido mostró que el 100 % de los aislamientos fueron resistentes tanto a Ceftazidima y a Cefotaxima, pero esto no permitiría deducir el tipo de β -lactamasa de espectro extendido presente, con lo que no se contaría con una ayuda que nos permita establecer una relación con respecto a los perfiles plasmídicos obtenidos.
3. Luego de la determinación de los perfiles plasmídicos, el plásmido con un tamaño de 20 Kb fue el más común, presente en el 53 % de los aislamientos, de los cuales el 76 % fue resistente a Ciprofloxacina y el 73 % a Trimetoprim-Sulfametoxazol, pudiendo ser uno de los plásmidos responsables de la transmisión de las β -lactamasas de espectro extendido y la resistencia a estos antibióticos en particular, pero se necesitarían de mayores estudios para poder confirmar esto.
4. No se encontró una similitud genética marcada entre los aislamientos de origen comunitario y de origen hospitalario, por lo que no se podría establecer una relación significativa y determinar un origen común entre los mismos.
5. Al evaluar la similitud genética entre los aislamientos de origen hospitalario no se pudo determinar la presencia de cepas idénticas, por lo que no se estaría frente a un brote de origen bacteriano como causante de infecciones del tracto urinario en los pacientes hospitalizados.
6. Luego de evaluar la relación entre los perfiles plasmídicos y los perfiles de susceptibilidad obtenidos, en el caso de los aislamientos de *Escherichia coli*, se puede determinar que se trata de cepas similares, pero no idénticas, excepto 5 aislamientos que presentaron el 100 % de similitud y tenían el mismo patrón de susceptibilidad antimicrobiana, por lo que se tratarían de una misma cepa.
7. Los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, luego de evaluar la relación entre los perfiles plasmídicos y los perfiles de susceptibilidad obtenidos, se tratarían de cepas totalmente distintas ya que no se observó relación alguna en los dendrogramas obtenidos, al presentar el 0 % de similitud genética entre ellos.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se debe tener cuidado con la conservación de los aislamientos, sobre todo si estos se mantienen en congelación, ya que los continuos cambios de temperatura pueden alterar y degradar el ADN presente, lo que traería consigo que al final la cantidad de ADN extraído sea mínima o casi nula.
2. Se debe realizar cada paso de la extracción de ADN plasmídico con mucho cuidado y respetando las indicaciones establecidas en el protocolo de extracción, ya sea usando un kit comercial o la técnica de lisis alcalina propuesta por Birnboim y Doly, para de esta manera asegurar la mayor cantidad de ADN extraído y una óptima calidad del mismo.
3. Se necesitaría de otra técnica molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que nos ayude a confirmar el tipo de β -lactamasa de espectro extendido presente en cada aislamiento estudiado y con ello obtener mayor información que nos facilite el análisis con respecto a los perfiles plasmídicos obtenidos.
4. Al presentar los aislamientos tanto de *Escherchia coli* como de *klebsiella pneumoniae* el 100 % de sensibilidad frente a los carbapenémicos, se convierten en la alternativa terapéutica contra estos microorganismos multirresistentes, por lo que es importante que estos agentes se usen con moderación y discreción; además de la monitorización continua de estos antimicrobianos con respecto a su efectividad.
5. El estudio adicional a nivel molecular de los aislamientos con otras técnicas puede ser beneficioso para establecer la causa del patrón multidrogorresistente que puede ayudar a hacer una contribución a la comprensión actual y al conocimiento de la situación de la infecciones del tracto urinario de origen bacteriano causada por agentes patógenos multidrogorresistentes, y para el desarrollo de una mejor estrategia de tratamiento y prevención de la enfermedad.
6. Se debería evaluar la posibilidad de poder realizar este estudio en otros establecimientos de salud, detectar la presencia de un brote con cualquier otro microorganismo multirresistente que presente algún problema epidemiológico en cada centro de salud.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Howes DS, Henry SM. Urinary Tract Infection, female [Sede Web]. E-Medicine; 2005- [Acceso 25 de agosto de 2013]. Disponible en <http://www.emedicine.com/EMERG/topic626.htm>.
2. Hernández Álvarez E. *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de urocultivos: Implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. Madrid. 2010
3. Alós JI. Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community. Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23 (4):3-8
4. Kunin CM, White LV, Hua TH. A reassessment of the importance of 'low-count' bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Ann Intern Med*. 1993; 119: 454-560.
5. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med*. 1982; 307: 463-468.
6. Komaroff AL. Urinalysis and urine culture in women with dysuria. *Ann Intern Med*. 1986; 104: 212-218.
7. Hooton TM, Scholes D, Stapleton AE, et al. A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. *N Engl J Med*. 2000; 343 (14): 1037-1039.
8. Warren YW. Catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin N Am*. 1987; 1: 823-824.
9. Patton JP, Nash DB, Abrutyn E. Urinary tract infection: economic considerations. *Med Clin N Am*. 1991; 75: 495-513.
10. Andreu A, Alós JI, Gobernado M, Marco F, De la Rosa M, García-Rodríguez JA, et al. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23 (1): 4-9.
11. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*. 2002; 113 (1): 5-13.
12. Krieger JN, Ross SO, Simonsen JM. Urinary tract infection in healthy university men. *J Urol*. 1993; 149: 1046-1048.

13. Hellstrom A, Hanson E, et al. Association between urinary symptoms at 7 years old and previous urinary tract infection. Arch Dis Chile. 1999; 66: 232-234.
14. Ruiz de Alegría C, Perea López B. Indicaciones y valoración clínica del urocultivo y coprocultivo. Medicine. 2010; 10 (49): 3317-3320.
15. Koneman E. Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
16. Ochoa Sangrador C, Eiros Bouza JM, Pérez Mendez C, Inglada Galiana L. Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. Rev Esp Quimioterap. 2005; 18 (2): 124-135.
17. Rushton HG. Urinary tract infections in children: epidemiology, evaluation and management. Pediatr Clin North Am. 1997; 44:1158-1174.
18. Corahua Ventura LN. Caracterización molecular de las aislamientos de *Escherichia coli* uropatógenas aisladas de pacientes mujeres con infección del tracto urinario del distrito de Comas. Tesis de pregrado. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
19. Donnenberg MS. Enterobacteriaceae en Enfermedades Infecciosas: Principios y Práctica. Madrid: Elsevier; 2005.
20. Navarro F, Miro E. Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25 (2): 11-17.
21. Rossi F, Andreazzi D. Resistencia bacteriana: Interpretando el antibiograma. Sao Paulo: Atheneu; 2006.
22. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol. 2011; 2: 203.
23. Pérez-Cano HJ, Robles-Contreras A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Rev Med MD. 2013; 4(3):186-191pp
24. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (kaunas). 2011;47(3):137-146.
25. Cavaco LM, Frimodt-Moller N, Hasman H, Guardabassi L, Nielsen L, Aarestrup FM. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations of minimum inhibitory concentration in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated in humans and swine in Denmark. Microb Drug Resist. 2008; 14: 163-169.
26. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Asoc Col Infec. 2008; 12 (3): 217-226.

27. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Sacn J Infec Dis*. 1991; 78 (1): 7-16.
28. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, eflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 1210-1215.
29. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 79-114.
30. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de Resistencia antibiotic en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011; 28(4):648-656
31. Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3):969
32. Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. β -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(1):12-18
33. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 3–10.
34. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram negative pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012; 27: 128-142.
35. Diestra K, Coque TM, Miro E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, et al. Caracterización y epidemiología molecular de β -lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26: 404–10.
36. Ángel-Díaz M, Ramón-Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27: 503–10.
37. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 933–51.
38. Blanc Pociello V. Caracterización de aislamientos y de plásmidos de *Enterobacteriaceae* portadoras de β -lactamasas de espectro extendido. Barcelona. 2007.

39. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (1): 144-53.
40. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1-14.
41. Poirel L, Kampfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera - 37 -neumonia*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 4038-4040.
42. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 657–86.
43. Loeza P, Valdez J, Baizabal V, Lopez J. Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *REB.* 2004; 23 (2): 71-78.
44. Redondo C, Alonso G. Plásmidos conjugativos aislados de aislamientos multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2007; 26: 100-107.
45. Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2005; 25: 29-34.
46. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. 2005
47. Vergara C, Visbal J, Máttar S. Serotipia, resistencia a antimicrobianos y perfiles plasmídicos de bacterias enteropatógenas aisladas de procesos diarreicos de Colombia. *Revista MVZ Córdoba.* 2002; 7(2): 211-215.
48. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-1523.
49. Marhova M, Kostadinova S, Stoitsova S. Antimicrobial resistance profiles of urinary *Escherichia coli* isolates. *Biotechnol. & Biotechnol. EQ.* 2009; 23: 616- 620.
50. Ranjbar R, Haghi-Ashtiani MT, Jonaidi Jafari N, Abedini M. The prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial uropathogens isolated from pediatric patients. *Iranian J Publ Health.* 2009; 38(2):134-138.
51. Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M, Mohammadzadegan R. Microbial Susceptibility, Virulence Factors, and Plasmid Profiles of Uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Arch Iran Med.* 2012; 15 (5): 312 – 316.

52. Lina TT, Rahman SR, Gomes DJ. Multiple-Antibiotic Resistance Mediated by Plasmids and Integrons in Uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Bangladesh J Microbiol. 2007; 24 (1): 19-23.
53. Vásquez M1, Moreno N , Correa M, Estrada J, Castañeda L. Caracterización bioquímica, patrón de sensibilidad y perfil plasmídico de cepas hospitalarias multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*. IATREIA. 2001; 14 (4):291.
54. Mustafa OA, Yusuf D, Ahmet U. Investigation Of Imipenem and Meropenem susceptibilities, Plasmid Profiles and ESBL characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. World Applied Sciences Journal. 2009; 7 (3): 378-381.
55. Monteghirfo M, Barrón J, González E, Zumaeta K, Flores A. Genotipificación de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de pacientes hospitalizados y de la comunidad del Instituto Nacional de Salud del Niño, mediante amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos. An Fac Med. 2013; 74 (1).
56. Çelebi A, Duran N, Öztürk F, Açık L, Aslan G, Aslantas O. Identification of clinic uropathogen *Escherichia coli* isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles. Advances in Molecular Biology. 2007; (1): 31-40.
57. Khadgi S, Timilsina U, Shrestha B. Plasmid profiling of multidrug resistant *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection patients. Int J Appl Sci Biotechnol. 2013; 1(1): 1-4.
58. Nasreen J, Sudhir U, Meshram, Archana K. Plasmid profile analysis of multidrug resistant E. coli isolated from UTI patients of Nagpur City, India. Romanian Society of Biological Sciences. 2009; 14 (5): 4635-4640.
59. Bailón H, Sacsquispe R. Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. Rev Med Hered. 2013; 24:101-108.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

DATOS GENERALES

Código de Aislamiento: _____ Nro: H. Clínica: _____

Fecha de Aislamiento: _____ Sexo: ____ Edad: ____

Servicio de Origen del aislamiento: _____

Microorganismo aislado:

Escherichia coli:

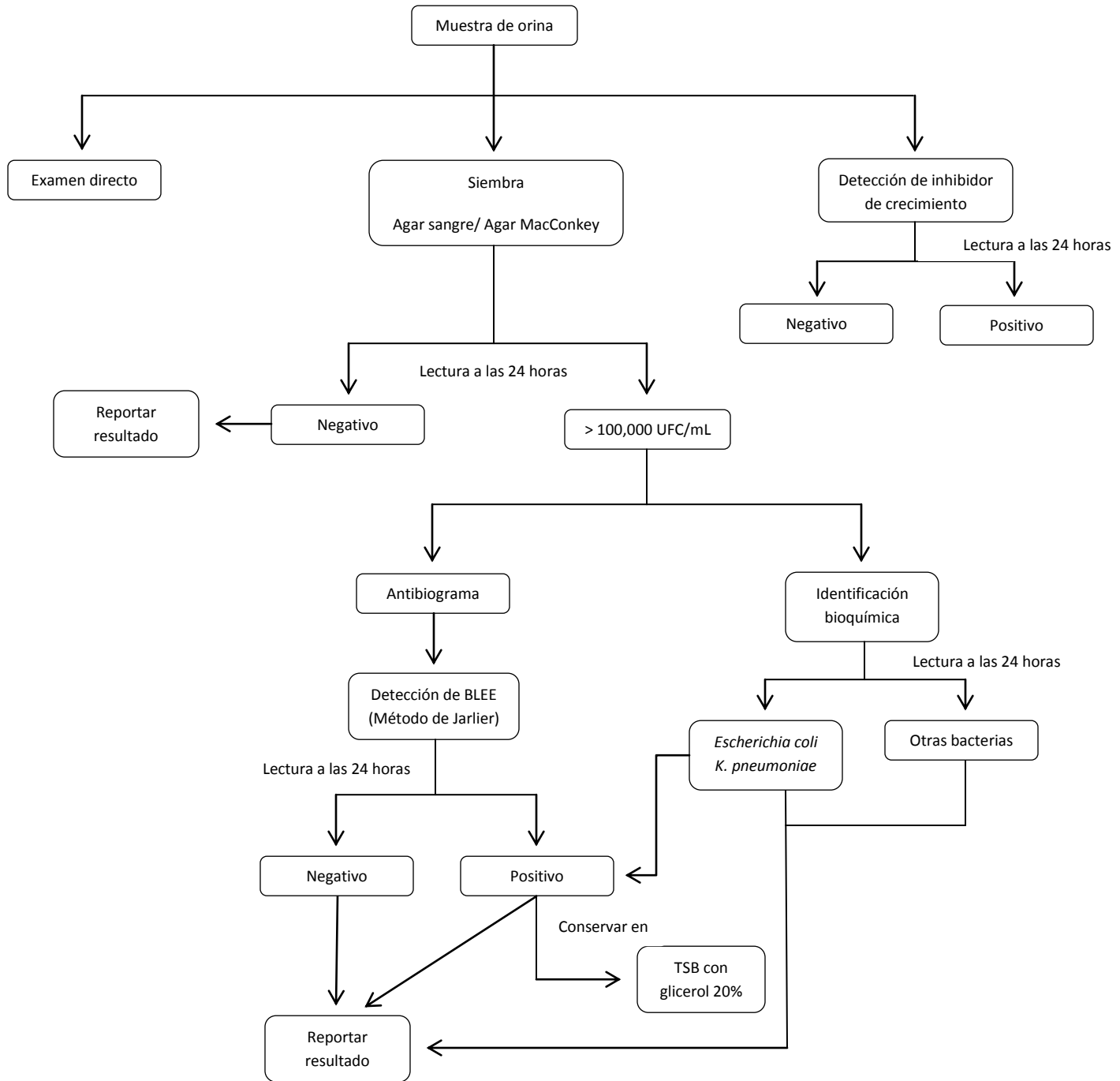
Klebsiella pneumoniae:

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBINA DE LAS CEPAS EN ESTUDIO:

ANTIBIOTICOS (DROGAS)		Carga	Diámetro del halo (mm)	S	I	R
Amikacina	AK	30 µg				
Gentamicina	GE	10 µg				
Ceftazidima	CAZ	30 µg				
Cefepime	FEP	30 µg				
Cefotaxima	CTX	30 µg				
Cefoxitina	FOX	30 µg				
Ciprofloxacina	CIP	5 µg				
Cloranfenicol	CHL	30 µg				
Imipenem	IPM	10 µg				
Meropenem	MEM	10 µg				
Nitrofurantoina	NIT	300 µg				
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75 µg				

ANEXO 2

FLUJOGRAMA PARA AISLAMIENTO DE PATÓGENOS EN UROCULTIVO (SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA - INSN)



ANEXO 3**Componentes del kit GeneJET™ Plasmid Miniprep**

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	50 preps #K0502
Solución de resuspensión	15 mL
Solución de lisis	15 mL
Solución de neutralización	20 mL
Solución de lavado (concentrada)	20 mL
RNasa A	0.15 mL
Buffer de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)	4 mL
Columnas GeneJET™	50
Tubos de colección (2 mL)	50