



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Prevalencia y epidemiología molecular de cepas de
Escherichia coli productoras de BLEEs aisladas de
casos de infecciones urinarias adquiridas en la
comunidad**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Pool MARCOS CARBAJAL

ASESOR

Ruth Hortensia GARCÍA DE LA GUARDA

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Marcos, P. (2016). *Prevalencia y epidemiología molecular de cepas de Escherichia coli productoras de BLEEs aisladas de casos de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO



Exped. N° 122-UPG-FCB-2014

5
21
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

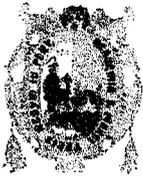
Siendo las... 15 horas del día... 11/07/14 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dr. Pablo S. Ramírez Roca	e integrado por
Dra. Susana M. Gutiérrez Moreno	(Miembro)
Mg. Débora E. Alvarado Iparraguirre	(Miembro)
Mg. Elena L. Quillama Polo	(Miembro)
Mg. Ruth H. García de la Guarda	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don **POOL MARCOS CARBAJAL**.

Después de darse lectura al Expediente N° 122-UPG-FCB-14, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recibieron la exposición de la Tesis Titulada:

"PREVALENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BLEEs AISLADAS DE CASOS DE INFECCIONES URINARIAS ADQUIRIDAS EN LA COMUNIDAD", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO



Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de Muy Buena con la nota de 18

A continuación el Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magister en Biología Molecular al Bachiller Pablo Marcos Carabajal

Siendo las 16:30 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 11 días del mes de julio del año 2016.

[Signature of Pablo S. Ramírez Roca]

Dr. Pablo S. Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE

[Signature of Ruth H. García de la Guarda]

Mg. Ruth H. García de la Guarda
Profesora Principal a D.E.
ASESORA

[Signature of Susana M. Gutierrez Moreno]

Dra. Susana M. Gutierrez Moreno
Profesora Principal a T. C.
MIEMBRO

[Signature of Débora E. Alvarado Iparraguirre]

Mg. Débora E. Alvarado Iparraguirre
Profesora Principal a D.E.
MIEMBRO

[Signature of Elena L. Quillama Polo]

Mg. Elena L. Quillama Polo
Profesor Principal a D. E.
MIEMBRO

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada:

A Dios en primer lugar, porque bajo su dirección me mostró que en este mundo biológico que vivimos desde lo más simple a lo complejo fue diseñada por un Ser inteligente, desarrollando en mi persona actitudes y aptitudes que me condujeron a confiar en su palabra hasta cumplir este objetivo importante en mi vida.

Todo mi amor y cariño a mi esposa Cinthia e hijas (Cattleya y Gazania) que son la motivación de mi vida y por darme su apoyo para lograr este sueño, a mis padres (Paulina y Marcial) por el empuje y fuerza de alcanzar las metas en esta vida.

A esas personas importantes en mi vida, familiares y amigos que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi asesora Ruth García de la Guarda directora de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, por la paciencia, motivación y el apoyo.

Especial reconocimiento merece la oportunidad dada en este trabajo por parte de los miembros de la Clínica Good Hope, siendo intermediario el Jefe de laboratorio el Blgo. Oscar Vásquez Macedo, con quien me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de todos mis amigos. A todos ellos, muchas gracias.

I. INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) se define como la colonización ascendente y multiplicación de cualquier microorganismo (urocultivo positivo: mayor de 100,000 ufc/ml), habitualmente bacterias en el aparato urinario (Hinostraza *et al.*, 2013). Constituyen las infecciones bacterianas más frecuentes sobre todo en el sexo femenino, que a menudo requiere tratamiento antibiótico. La ITU puede clasificarse en bacteriuria asintomática (presencia de bacteriuria significativa y leucocitos en el sedimento urinario, pero sin sintomatología), ITU baja (cistitis o uretritis) e ITU alta (pielonefritis). *Escherichia coli* es la especie bacteriana reconocida como la causa más frecuente de ITU tanto adquirida en la comunidad (90%) como intrahospitalaria (50%) (André *et al.*, 2008). La vía ascendente es la forma más común de colonización; la susceptibilidad antimicrobiana es amplia, sin embargo en los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a agentes antimicrobianos comunes siendo necesario el uso de agentes antimicrobianos de última generación cuya prescripción irracional ha condicionado un incremento en la resistencia (Botero *et al.*, 2000). El diagnóstico de certeza de ITU se establece con el urocultivo que es una prueba microbiológica que identifica el germen causal y su sensibilidad antibiótica. Existen otras pruebas como el sedimento urinario que tiene una menor sensibilidad, especificidad y que aporta un diagnóstico presuntivo (Hernández *et al.*, 2007). Por estudios epidemiológicos se ha observado que cuanto menos es la proporción de individuos tratados con un antibiótico, menor es la tasa de resistencia hacia éste. Se ha podido determinar que la frecuencia de la resistencia está ligada a la tasa de mutación; esta es bastante baja, por lo que la aparición de un germen resistente en el medio, será el producto de tamaño de la población. Se ha tratado de aplacar la resistencia bacteriana con la utilización de varios antibióticos, en conjunto; de este modo, cada antibiótico se dirigirá hacia el mutante resistente, sin embargo estas asociaciones son armas de doble filo, debido a que los antibióticos no se encuentran presentes al mismo tiempo y en el mismo lugar de la infección, en donde se localizan las bacterias, pudiendo no lograr una acción adecuada. La

rapidez con que una cepa resistente desaparezca dependerá de su capacidad relativa de reproducción y de su difusión con respecto a la cepa sensible. Si la capacidad de reproducción es escasa, la tasa de resistencia disminuye hasta alcanzar el equilibrio, pero si esta capacidad no difiere, la tasa de resistencia permanecerá estable incluso en ausencia de tratamiento.

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son una familia de enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, fundamentalmente enterobacterias, sobretodo *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros. Son capaces de inactivar, además de las penicilinas y las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam. Las BLEE tienen un valor importante dado la elevada frecuencia de gérmenes causantes de infección y mortalidad, porque pueden llevar al fracaso la terapéutica antibiótica y por lo tanto su diagnóstico y reconocimiento nos serviría para realizar un uso más eficaz de la antibioticoterapia (Ramos *et al.*, 2006).

En cualquier caso, cada vez son más frecuentes las publicaciones acerca de cepas clínicas de *E. coli* y de *Klebsiella* spp. productoras de BLEE que les confieren resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam. Un hecho importante es que estas cepas se aíslan no sólo en el medio hospitalario, sino también en residencias de ancianos y en la comunidad (Diestra *et al.*, 2008). Recientemente se han descrito los factores de riesgo asociados a las infecciones comunitarias por enterobacterias productoras de BLEE: la hospitalización previa, el tratamiento antibiótico en los meses previos (incluyendo cefalosporinas de tercera y de segunda generación, penicilina y quinolonas), la infección urinaria recurrente, la edad avanzada, la diabetes y el sexo masculino (Horcajada *et al.*, 2005). Un hecho preocupante es que se han comunicado fracasos clínicos en bacteriemias causadas por enterobacterias productoras de BLEE que estaban bajo tratamiento empírico teóricamente adecuado. También se ha demostrado la existencia de plásmidos transferibles que codifican ambas resistencias simultáneamente, una menor

permeabilidad de las enterobacterias productoras de BLEE para las quinolonas por ausencia de porinas y una mayor expulsión activa de estas moléculas por parte de estas mismas cepas. Las enterobacterias productoras de BLEE también tienen altas tasas de resistencia a betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas, por lo que estas combinaciones no deberían recomendarse, sobre todo cuando se han publicado elevadas tasas de mortalidad asociada a su empleo en algunas series. El aumento de las resistencias a los antibióticos es uno de los problemas clínicos más importantes en la actualidad. El conocimiento de las tasas locales de resistencia y de los datos clínico-epidemiológicos del paciente es crucial para poder decidir las pautas de tratamiento antibiótico empírico de los distintos cuadros clínicos (San Martín, 1999)

Esta investigación es de importancia porque estudia las cepas *E. coli* productoras de BLEE asociadas a ITUs adquiridas en la comunidad en Lima metropolitana, y este tipo de estudios a la fecha en el Perú, sobre epidemiología molecular, son pocos. Este trabajo está orientado a determinar si las ITU arriba mencionadas, son originadas por una sola o varias clonas de *E. coli* uropatogénicas productoras de BLEE y su resistencia antimicrobiana.

II. ANTECEDENTES

La vigilancia de la resistencia bacteriana se inició desde los años 30, con la introducción de las sulfamidas para el tratamiento de la enfermedad gonocócica y meningocócica. Una década después del descubrimiento de la penicilina, esta se desarrolló como un agente terapéutico sistémico. Para el año de 1940, el descubrimiento real de la resistencia bacteriana fue dado a conocer por Abraham y Chain (San Martín *et al.*, 1999) quienes observaron en ciertos extractos de *E. coli* la inactivación de soluciones de penicilina. Es aquí donde nace el descubrimiento de las penicilinasas. En 1944 Kirby *et al.* observa que la producción de penicilinasas se correlaciona con la resistencia a la penicilina en cultivos de *Staphylococcus aureus*. Para el año de 1960 se introducen las primeras penicilinas sintéticas tales como meticilinas y ampicilinas, el primero contra cocos Gram positivos y el segundo contra bacilos Gram negativos y además, se desarrolló la primera generación de la familia de las cefalosporinas. Poco después del uso a gran escala de la penicilina G aparecen las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a este tipo de antibiótico, como resultado de la elaboración de una betalactamasa, enzimas capaces de hidrolizar irreversiblemente el enlace amida del núcleo betalactámico de la penicilina. A partir de 1960 y hasta 1978 se inicia la era de las penicilinas semisintéticas y viene el desarrollo de la otra generación de las cefalosporinas (Abarca *et al.*, 2001).

2.1 BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Para el año de 1963 se aíslan las primeras betalactamasas: la betalactamasa de *E. coli* TEM-1, posteriormente la SHV-1 y la PSE-1. Esta aparición se ha diseminado por la producción bacteriana de plásmidos capaces de transferir genes que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos (Bradford, 2001). Las betalactamasas mediadas por plásmidos confieren un alto nivel de resistencia hacia las penicilinas y un bajo nivel de resistencia a las cefalosporinas de primera generación. Para finales de 1977 e inicios de 1978, comienza a observarse la pérdida de genes productores de porinas como OmpC que produce disminución en la permeabilidad de la

membrana y la aparición de cefalosporinas. A partir de 1978 hasta 1995 comienza la era de las cefamicinas, oxyminocefalosporinas, monobactams, carbapenems y los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, ácido penicilánico y sulfonas. En 1983 la SHV-2 fue la primera β -lactamasa de espectro extendido que se reporta en la literatura, la cual fue descubierta en Alemania, siete años después reportada en Francia y por último aparece en Estados Unidos. En 1984 el ácido clavulánico comienza a utilizarse junto con la penicilina con el objetivo de inactivar el sitio de unión de la betalactamasas bacteriana evitando hidrólisis de la penicilina en combinación con esta droga. Comienzan a aislarse betalactamasas derivadas de TEM, en Francia se aísla la TEM-3 evidenciando nuevas mutaciones (serina cambia por glicina en la posición 238 en el sitio activo). Se encuentran cuatro variantes naturales TEM-4, TEM-8, TEM-15 y TEM-25, con la sustitución de aminoácidos como glutamato y la histidina. La TEM-12 aparece en 1987 con la sustitución de la serina en vez de arginina en la posición 164, estas cepas eran mucho más resistentes a ceftazidima y aztreonam que las cepas productoras de TEM-1 y TEM-5 (Bush *et al.*, 2005). Tanto las BLEE de tipo TEM como las SHV están actualmente distribuidas por todo el mundo y se reconocen más de 160 y 100 variantes, respectivamente. Se han encontrado en la gran mayoría de las enterobacterias, especialmente en *Klebsiella pneumoniae*, y más recientemente en *Pseudomonas aeruginosa* y en *Acinetobacter baumannii*. En 1991 se aislaron en Ankara (Turquía) las primeras enzimas del grupo de las oxacilinasas (OXA) con un perfil superponible al de las BLEE pero con resistencia parcial a la inhibición por el ácido clavulánico y el resto de los inhibidores de Clase A (Camacho-Molina *et al.*, 2004). En la evolución temporal de las BLEE sorprende, con la perspectiva actual, que las BLEE más prevalentes en estos momentos sean las de la familia CTX-M. En la actualidad se conocen al menos 65 betalactamasas de tipo CTX-M agrupadas en torno a 5 enzimas diferentes según su secuencia de aminoácidos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) (Cantón *et al.*, 2007). Actualmente se aíslan más *E. coli* productoras de BLEE que el resto de enterobacterias tanto en áreas hospitalarias diferentes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y de manera

importante en pacientes de la comunidad, esencialmente en infecciones urinarias (Pitout *et al.*, 2005)

2.2 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN

Los antibióticos betalactámicos, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Algunas modificaciones de la molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano (Suarez y Gudiol., 2009). A pesar de que no se dispone de ningún betalactámico realmente nuevo desde hace más de 2 décadas, el aumento incesante de las resistencias y de los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares ha condicionado la existencia de una gran cantidad de información en la literatura médica sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos.

2.2.1 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA

La presencia del anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos. Además, este determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa (actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal) y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) de esta gran familia de antibióticos. No obstante, para que el betalactámico sea activo, es preciso que este unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura

química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas (Suarez *et al.*, 2009).

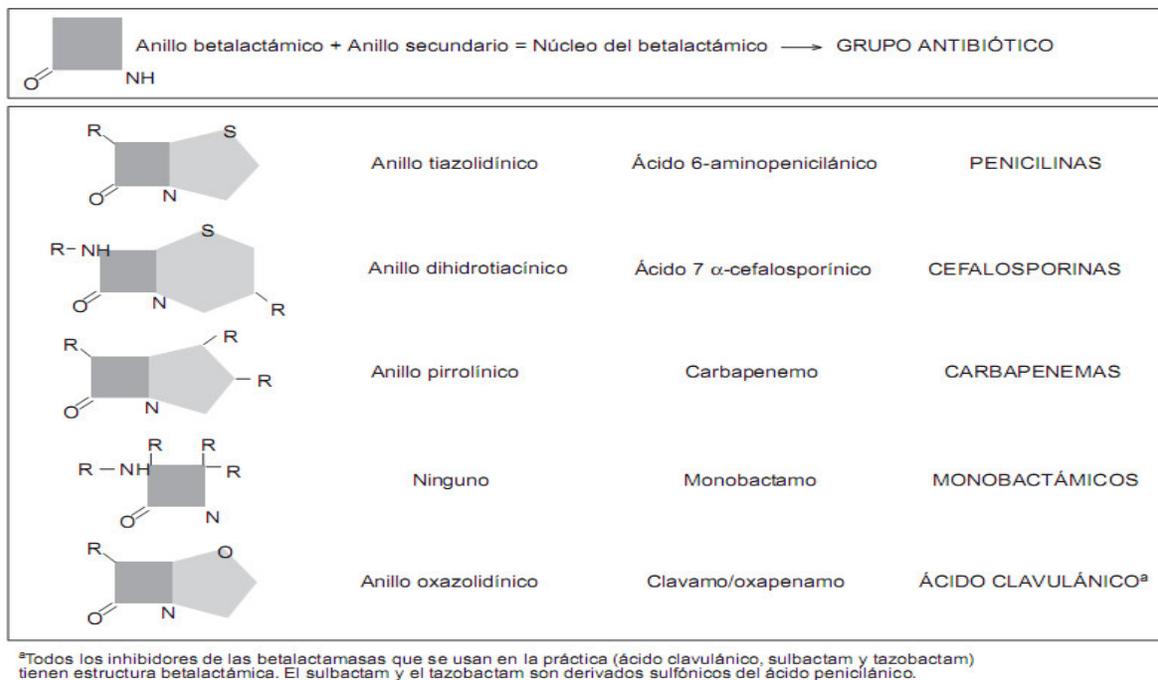


Fig. Nº 1. Estructura química de los betalactámicos

Fuente: Suárez *et al.*, 2009

2.2.2 MECANISMOS 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. La pared bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias de todos los géneros, excepto los micoplasmas; se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática y está compuesta principalmente por peptidoglucano. En las bacterias grampositivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es el peptidoglucano. 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. Las bacterias ácido-alcohol-resistente tienen una pared similar a la

de los microorganismos grampositivos, pero con una capa de peptidoglucano fina y, por fuera, una capa muy rica en lípidos (Suarez *et al.*, 2009).

El esqueleto del peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla. Los diferentes componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio que hay entre ésta y la pared celular (espacio periplásmico), donde se van ensamblando hasta formar la estructura previamente descrita.

La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de unas enzimas que se localizan en ese espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas.

El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. Es por eso que estas enzimas se llaman también PBP (penicillin binding protein: proteína ligada a la penicilina). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Por tanto, para que actúen los betalactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que este es el momento en que se sintetiza la pared celular. Los betalactámicos presentan actividad reducida en situaciones clínicas en las que gran parte de la población bacteriana se encuentra en estado estacionario, como por ejemplo los abscesos.

Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las cepas que carecen de autolisina (generalmente son cepas tolerantes a los betalactámicos) inhiben su crecimiento en presencia del betalactámico, pero no se destruyen completamente (Suarez *et al.*, 2009).

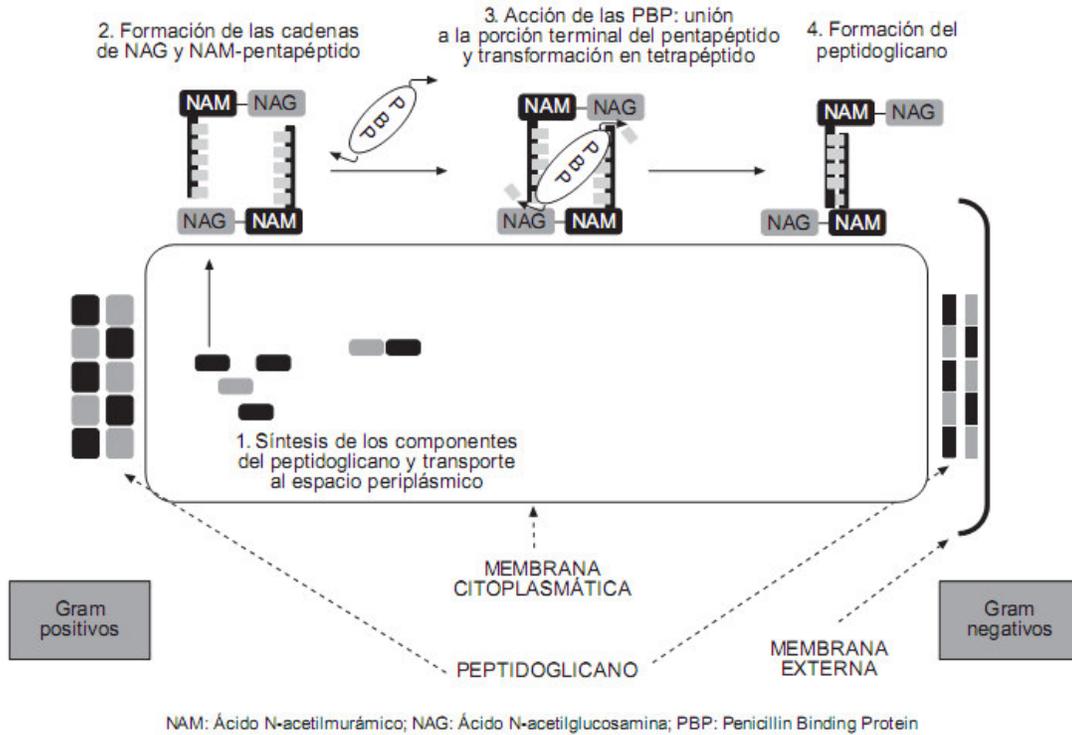


Fig. Nº 2. Etapas de formación de la pared celular

Fuente: Suárez *et al.*, 2009

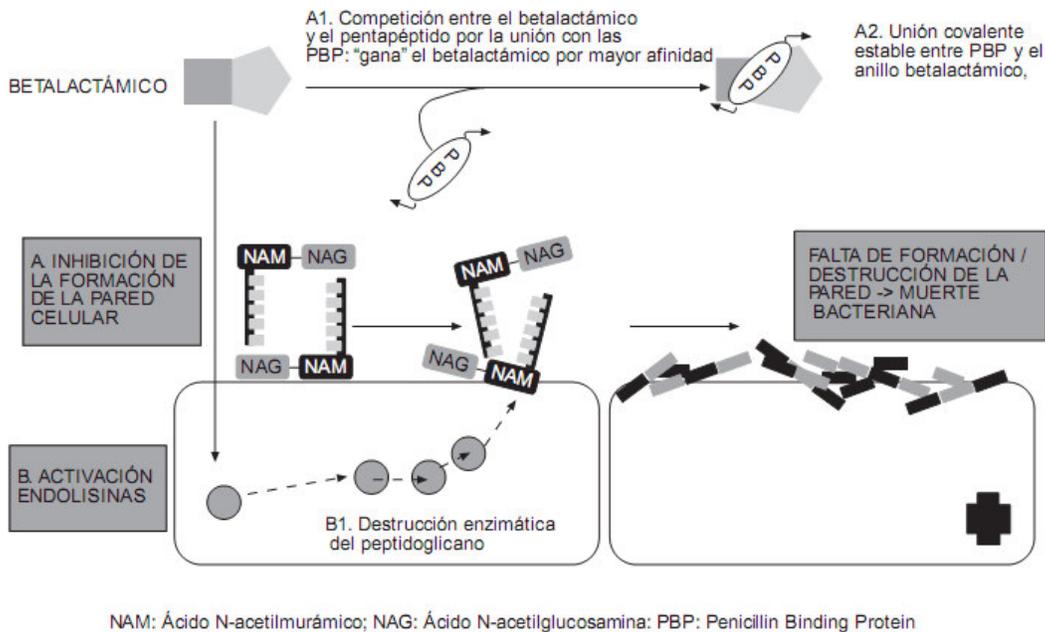


Fig. Nº 3. Mecanismo de acción de los betalactámicos

Fuente: Suárez *et al.*, 2009

2.3 ESPECTRO ANTIBACTERIANO

En general, el espectro de los betalactámicos incluye bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas. No son antimicrobianos activos sobre los micoplasmas (porque estos carecen de pared celular) ni sobre bacterias intracelulares como las clamidias o las rickettsias, ya que estos antibióticos tienen escasa capacidad de penetración dentro de las células. La producción de derivados semisintéticos a partir de la molécula nativa permitió disponer de preparados activos por vía oral (penicilina V, aminopenicilinas), con resistencia a las betalactamasas (penicilinas antiestafilocócicas), mayor capacidad de penetración en las bacterias gramnegativas (aminopenicilinas) o incluso con actividad antipseudomónica (ureidopenicilinas y carboxipenicilinas). El mecanismo de resistencia adaptativo más importante frente a los betalactámicos es la producción de betalactamasas por parte de algunos microorganismos (*S. aureus*, enterobacterias como *Salmonella spp.*, *E. coli* y *Shigella*, *Bacteroides spp.*, etc). Otros microorganismos, como *Klebsiella pneumoniae*, producen betalactamasas de forma natural, por lo que son resistentes a las penicilinas naturales de forma intrínseca. Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico, de modo que el antibiótico no puede ejercer su acción. Todos los inhibidores de betalactamasas usados en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica, pero poseen una actividad antibacteriana mínima, con excepción del sulbactam frente a *Acinetobacter baumannii*. Las cefalosporinas de primera generación son muy activas sobre los cocos grampositivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esta actividad, en beneficio de una actividad mayor frente a bacilos gramnegativos, con excepciones notables. Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la meticilina y *Listeria monocytogenes*. Los carbapenémicos son los betalactámicos de más amplio espectro, incluidos los microorganismos productores de BLEE. El imipenem es más activo frente a *Enterococcus faecalis* y menos activo frente a *P. aeruginosa* que el meropenem. El aztreonam (el único monobactámico disponible para uso clínico)

posee una actividad excelente sobre bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias.

La utilidad de las cefamicinas para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE es limitada debido al frecuente desarrollo de resistencia por pérdida de expresión de las porinas a través de las cuales entra el antibiótico. La amoxicilina-clavulánico es una buena opción para el tratamiento de las infecciones urinarias por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, siempre y cuando sean sensibles, ya que es frecuente la resistencia a esta combinación por producción simultánea de otras betalactamasas, alteraciones de la permeabilidad o, en menor medida, la hiperproducción de la propia BLEE. Las especies de enterobacterias productoras de la betalactamasa cromosómica AmpC (*E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, etc.) son intrínsecamente resistentes a la cefoxitina y a la amoxicilina-clavulánico, con lo cual la única opción entre los betalactámicos para el tratamiento de las cepas con BLEE sería, además de las carbapenemas, la piperacilina-tazobactam como se menciona en la siguiente tabla (Oliver *et al.*, 2003).

Tabla Nº 1. Opciones terapéuticas en las infecciones por microorganismos productoras de BLEE

Grupo	Antimicrobiano	Comentario
β-lactámico/inhibidor de β-lactamasas	Amoxic./clavulánico	Escasa experiencia en infección sistémica Útil en infección urinaria
	Piperac./tazobactam	Variable en infección sistémica Necesario estudio de sensibilidad
	Cefalos../clavulánico	Ausencia de formulaciones Diferente farmacocinética
Metoxi-β-lactámicos	Cefoxitina	Desarrollo de mutantes de permeabilidad
Carbapenemas	Moxalactam	Escasa experiencia. Efectos secundarios
	Imipenem	β-lactámicos de elección. Hay que vigilar
	Meropenem	aparición de resistencia en otros
	Ertapenem	patógenos
Aminoglucósidos		Necesario estudio de sensibilidad
Quinolonas		Incremento reciente de la resistencia
Otros	Fosfomicina	No suelen existir resistencias cruzadas
	Nitrofurantoina	No suelen existir resistencias cruzadas
	Colistina	Descontaminación intestinal

Fuente: Oliver *et al.*, 2003

2.4 DIVERSIDAD DE LOS TIPOS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Durante las décadas de los años 80 y principios de los 90, la inmensa mayoría de las BLEE encontradas eran del tipo TEM o SHV, habiéndose descrito hasta la fecha más de cien variantes distintas derivadas de las betalactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de SHV-1, que da idea de la gran diversificación evolutiva que han tenido estas enzimas en un corto periodo debido, esencialmente, a la presión selectiva de los antibióticos (Esmerino *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2007). También existen otras BLEE, algunas de ellas descritas en *Pseudomonas aeruginosa*, con menor importancia epidemiológica desde el punto de vista de su diseminación, al menos por el momento en España como se menciona en la siguiente tabla (Oliver *et al.*, 2003).

Tabla N° 2. Diferentes grupos de betalactamasas de espectro extendido

BLEE	β -lactamasa relacionada	País de origen	Especies en las que se detectaron inicialmente
TEM	TEM-1, TEM-2	Francia	<i>Enterobacteriaceae</i>
SHV	SHV-1/LEN	Alemania	<i>P. aeruginosa</i> /BGNNF
CTX-M	KLUA <i>Kluyvera</i>	Alemania/Argentina	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
OXA	OXA-10	Turquía / Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER		Francia	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER	Vietnam/Tailandia	<i>E. coli</i>
TLA	CME-1	Méjico	<i>E. coli</i>
GES/IBC		Guayana/Sudáfrica	<i>K. pneumoniae</i> / <i>P. aeruginosa</i>
BES	<i>Y. enterocolitica</i>	Brasil	<i>S. marcescens</i>
SFO	AmpA <i>S. fonticola</i>	Japón	<i>E. cloacae</i>

Fuente: Oliver *et al.*, 2003

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE. Mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M. Cientos de betalactamasas se han descrito y se les ha dado una desconcertante variedad de nombres. Afortunadamente, las enzimas se pueden clasificar sobre la base de su estructura primaria en cuatro clases moleculares (A a D) (Tabla N° 3), o

sobre la base de su espectro de sustrato y las respuestas a inhibidores en un mayor número de grupos funcionales (Cercenado y Cantón., 2011).

2.4.1 BLEE tipo TEM

Son derivados de TEM-1 y TEM-2. TEM-1 se reportó por primera vez en 1965 a partir de una *Escherichia coli* aislado de un paciente en Atenas (Grecia) llamado Temoneira (de ahí la designación TEM). TEM-1 es capaz de hidrolizar ampicilina a una tasa mayor que la carbenicilina, oxacilina, o cefalotina, y tiene una actividad insignificante contra cefalosporinas de espectro extendido. Se inhibe por el ácido clavulánico. TEM-2 tiene el mismo perfil hidrolítico que TEM-1, pero difiere de este por tener un promotor nativo más activo y por una diferencia en el punto isoeléctrico (5,6 en comparación con 5,4). TEM-13 también tiene un perfil similar hidrolítico similar a TEM-1 y TEM-2. Se han descrito más de 100 tipos de betalactamasas tipo TEM (Bradford., 2001) Sin embargo, las betalactamasas mutantes recuperadas de TEM que mantienen la capacidad para hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, pero que también demuestran resistencia a inhibidores de betalactamasas son consideradas como BLEE (Jacoby *et al.*, 2005).

2.4.2 BLEE tipo SHV

Las BLEE tipo SHV pueden encontrarse con mayor frecuencia en aislados clínicos que cualquier otro tipo de ESBL. SHV se refiere a la variable sulfhidrilo. Esta designación fue hecha porque se pensó que la inhibición de la actividad del SHV estaba relacionado por el sustrato p-cloromercuribenzoato, y fue variable de acuerdo con otro sustrato usado para el ensayo. En 1983, un aislado de *Klebsiella ozaenae* en Alemania fue descubierto que poseía una betalactamasa que hidroliza de manera eficiente cefotaxima, y en un grado menor ceftazidima. La secuenciación mostró que la betalactamasa difería de SHV-1, por la sustitución de glicina por serina en la posición 238. Esta mutación por sí sola representa las propiedades de amplio espectro de estas betalactamasas, designado como SHV-2. Las BLEEs tipo SHV se

han detectado en una amplia gama de Enterobacteriaceae y en brotes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* (Jacoby *et al.*, 2005; Phillipon *et al.*, 1989)

2.4.3 BLEE tipo CTX-M y TOHO

El nombre CTX refleja la actividad hidrolítica potente de estas betalactamasas contra cefotaxima y ceftriaxona. Este es un nuevo grupo que prevaleció en Sudamérica y Europa del Este, las BLEE CTX-M. Tazobactam exhibe una mayor actividad inhibidora de casi 10 veces del ácido clavulánico en contra betalactamasas tipo CTX-M. Cabe señalar que el mismo organismo puede albergar tanto BLEE tipo CTX-M y BLEE tipo SHV o BLEE de tipo CTX-M y de betalactamasas tipo AmpC, pudiendo alterar el fenotipo de resistencia del antibiótico. Toho-1 y Toho-2 son betalactamasas relacionados estructuralmente con betalactamasas tipo CTX-M (Toho se refiere a la Universidad Toho - Escuela de Medicina del Hospital Omori en Tokio, donde un niño fue hospitalizado que estaba infectado con betalactamasa Toho-1 producida por *Escherichia coli*). Como la mayoría de betalactamasas tipo CTX-M, la actividad hidrolítica de las enzimas Toho-1 y Toho-2 es más potente contra la cefotaxima que la ceftazidima (Ho *et al.*, 2007).

El número de BLEE tipo CTX-M se está expandiendo rápidamente. En la actualidad se han detectado en todos los continentes poblados. Estas cepas bacterianas que albergan estas enzimas son endémicas de en Europa Occidental y América del Norte, por ejemplo, CTX-M-3 se ha descubierto en Polonia y Taiwán, CTX-M-2 en Argentina, CTX-M-4 en Rusia lo que sugiere una evolución independiente de estas enzimas (Jacoby *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2007; Pallechi *et al.*, 2007).

2.4.4 BLEE tipo OXA

Las betalactamasas tipo OXA se llaman así debido a su habilidad de hidrolizar oxacilina. Estas betalactamasas (grupo 2d) se caracterizan por tener velocidades de hidrólisis mayor que 50% para cloxacilina y oxacilina que para la bencilpenicilina.

Ellas están predominantemente en *Pseudomonas aeruginosa*, pero han sido detectadas en muchas otras bacterias gram-negativas. De hecho, la más común de las betalactamasas tipo OXA, es OXA-1 que ha sido encontrada en 1 a 10% de los aislados de *Escherichia coli*. La mayoría de betalactamasas tipo OXA no hidrolizan las cefalosporinas de amplio espectro en un grado significativo y no son considerados como BLEE. Sin embargo, OXA-10 hidroliza (débilmente) cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, dando la mayoría de los organismos susceptibilidad reducida a estos antibióticos. Otros BLEE OXA incluye OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35, y -45. Éstas confieren resistencia clara a cefotaxima y a veces ceftazidima y aztreonam. La producción simultánea de una metaloenzima que hidroliza el carbapenem y el aztreonam por hidrólisis enzimática OXA puede fácilmente llevar a la resistencia a todos los antibióticos betalactámicos. Las BLEE tipo OXA se descubrieron originalmente en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de un solo hospital en Ankara, Turquía. En Francia, un nuevo derivado de OXA-10 fue encontrado en un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* (Jacoby *et al.*, 2005).

2.4.5 BLEE tipo PER

Las BLEE de este tipo muestran una homología que va del 25 al 27% comparado con BLEE tipo TEM y SHV. La betalactamasa PER-1 hidroliza eficientemente penicilinas, cefalosporinas y siendo susceptible a la inhibición del ácido clavulánico. PER-1 fue detectada por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa*, y más tarde en aislamientos de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Acinetobacter*. En Turquía, se encontró que el 46% de aislados nosocomiales eran *Acinetobacter spp.* y 11% *Pseudomonas aeruginosa* que producían PER-1. PER-2, que comparte 86% de homología con PER-1, se ha detectado en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, y *Vibrio cholerae* O1 El Tor. PER-2 sólo se ha encontrado en América del Sur hasta el momento. La coexistencia de estas enzimas hace que un organismo sea resistente a prácticamente todos los antibióticos betalactámicos. PER-1 también

se han encontrado en *Proteus mirabilis* y *Alcaligenes faecalis* en Italia. Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras PER-1 se han detectado en Francia, Italia y Bélgica.

2.4.6 BLEE tipo VES, BES y OTRAS BLEEs

Se han descubierto una variedad de otras betalactamasas que son mediadas por plásmidos o integrones de clase-A. Son reconocidas por su diversidad geográfica. También se han descrito nuevos BLEEs codificados cromosómicamente. VES-1 tiene mayor homología con PER-1 y PER-2 (38%), confiere resistencia de alto nivel a la ceftazidima, cefotaxima, y aztreonam, que se inhibe por el ácido clavulánico. Se encontró que el gen que codifica VES-1 es mediado por plásmido. Fue descrita originalmente en un bebé vietnamita hospitalizado en Francia. Otras enzimas VES también han sido detectadas en Kuwait y China. Otras BLEEs como BES, TLA, OFS e IBC son otros ejemplos de BLEEs no-TEM, BLEEs no SHV y se han encontrado en una amplia gama de ubicaciones geográficas (García *et al.*, 2010; Phillipon *et al.*, 1989).

Tabla N° 3. Clasificación de BLEEs por clase molecular

Variables	Clase molecular			
	A	B	C	D
Cromosomal	<i>Klebsiella oxytoca</i> K1 (C)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> L1 (I)	<i>E coli</i> Amp C (c)	
	<i>K pneumoniae</i> SHV-1 (C)	<i>Flavobacterium odoratum</i> ^s (C)	Shigella Amp C (c)	
	<i>Proteus vulgaris</i> (I)	<i>Aeromonas</i> (I)	Enterobacter Amp C (I)	
	<i>Citrobacter diversus</i> (I)		<i>Citrobacter freundii</i> Amp C (I)	
	<i>Bacteroides cepA</i> (C)		Serratia Amp C (I)	
			<i>Morganella morganii</i> Amp C (I)	
			Providencia Amp C (I)	
Plásmidos	familia TEM (C)	IMP-1 y relacionados (C)	Plasmídicos C (C)	Familia OXA
	Familia SHV (C)		Familia [BIL-1, CMY, FOX-1, LAT-1, MOX-1	
	HMS-1 (C)			
	Penicilinasa Estafilococo (I)		MIR-1]	

Fuente: Jacoby *et al.*, 2005

2.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos básicamente mediante 3 mecanismos diferentes que, en ocasiones, pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de la resistencia a otras familias de antibióticos. En resumen, de forma somera, los principales mecanismos implicados en la resistencia son los siguientes:

1. Producción de enzimas (betalactamasas). Representa el principal mecanismo de resistencia frente a los betalactámicos, especialmente en gramnegativos (aunque también pueden producirlas los grampositivos y anaerobios). Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico y que, por tanto, inactivan el antibiótico antes de su unión con las PBP. Su producción puede estar mediada por plásmidos o puede estar cromosómicamente codificada. En el primer caso, pueden ser transferibles y los inhibidores de las betalactamasas suelen inactivarlas; algunos ejemplos son las producidas por *S. aureus* sensible a la meticilina, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, algunas enterobacterias y anaerobios, como *Bacteroides fragilis*. En el caso de los microorganismos con betalactamasas de origen cromosómico (como *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.* y *Serratia spp.*) estos son a menudo inducibles (aumenta su producción tras la exposición a betalactámicos, especialmente cefalosporinas) y no son sustrato de los inhibidores de las betalactamasas. Hay muchos tipos de betalactamasas en función de los betalactámicos que hidrolizan. El uso (y abuso) de los antibióticos durante décadas ha favorecido la evolución de estas enzimas hacia una nueva generación, las llamadas BLEE, que son capaces de hidrolizarlas cefalosporinas de tercera generación y el monobactámico aztreonam (Suarez *et al.*, 2009)

2. Modificación de la diana en las PBP. Diferentes alteraciones en las PBP (mutaciones, hiperexpresión y modificación de la afinidad) pueden dificultar la unión del betalactámico a la proteína, lo que disminuye su actividad. Este es el mecanismo principal de resistencia a betalactámicos de los microorganismos grampositivos, como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecium*.

3. Alteraciones en la permeabilidad y bombas de expulsión. Ante la barrera que supone la presencia de una membrana celular (como en el caso de los microorganismos gramnegativos) las sustancias poco lipofílicas (como los betalactámicos) precisan proteínas (poros) que les faciliten la entrada al espacio periplásmico para poder unirse a las PBP. Este es uno de los motivos por los que, con algunas excepciones, los microorganismos gramnegativos son generalmente más resistentes a los antibióticos que los grampositivos. Algunos microorganismos más sofisticados, como *P. aeruginosa*, presentan además sistemas de bombeo de antibióticos muy eficaces, que determinan su resistencia intrínseca a muchos antibióticos, incluidos algunos de los betalactámicos. Algunas alteraciones en la permeabilidad (mutaciones, hiperexpresiones) pueden modificar la resistencia basal a los betalactámicos (Suárez *et al.*, 2009).

2.6 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE

La primera BLEE (SHV-2) fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania en 1983. Desde entonces se ha reportado una gran cantidad de brotes epidémicos de enterobacterias con BLEE, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuentemente involucrada. La primera descripción de cepas de enterobacterias productoras de BLEE en España fue en 1988 y la primera epidemia documentada ocurrió entre 1988 y 1990. Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la

diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol (Lerma *et al.*, 2008).

En España, si bien el porcentaje de cepas con BLEE encontradas en un estudio multicéntrico reciente fue mayor en *K. pneumoniae* (2,7%) que en *E. coli* (0,5%), el número absoluto de cepas fue significativamente superior para *E. coli*. En relación con este último punto, es cada vez más frecuente el aislamiento de enterobacterias con BLEE, especialmente *E. coli*, fuera del ámbito hospitalario, particularmente como causa de infección urinaria en pacientes de atención primaria y así, en el estudio anteriormente aludido, se encontró que el 50% de las cepas de *E. coli* con BLEE procedían de la comunidad. Otro aspecto epidemiológico destacable es la creciente presencia de BLEE en enterobacterias productoras de betalactamasas cromosómicas AmpC. En este sentido, la cepa productora de BLEE, para la cual se ha documentado una mayor diseminación, es una cepa de *Enterobacter aerogenes* productora de TEM-24 que ha sido la causa de brotes epidémicos en un gran número de hospitales de distintos países europeos, como Bélgica, Francia, Portugal y España (Oliver y Canton, 2003; Pérez *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en Perú el 2005 denominado “Presencia de betalactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima” se describe la presencia de BLEEs de tipo SHV y TEM determinados por PCR. La secuencia de ADN reveló la presencia de TEM-10 que ha sido hallada en EEUU y la otra SHV-5 ha sido hallada en muchos países. Este trabajo es el primer reporte de TEM-10 y SHV-5 en nuestro país y es el primer reporte de TEM-10 en Latinoamérica (García-Apac, 2012). Las BLEEs halladas son de particular importancia, ya que a comparación de las otras están más frecuentemente asociadas con multirresistencia y que pueden mantenerse por prolongados periodos de tiempo y causar brotes en los hospitales. Tanto TEM-10 como SHV-5 fueron halladas en ambos hospitales y pueden encontrarse en otros hospitales de Lima y Provincias (Morales *et al.*, 2005).

2.7 INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO

La infección del tracto urinario (ITU) ocasiona una importante morbimortalidad y por consiguiente, un elevado coste sanitario. Además, la aparición progresiva de resistencias a diferentes antimicrobianos de uso común en el tratamiento empírico de la ITU se está convirtiendo en un problema de difícil manejo que aconseja una revisión continuada de las principales pautas terapéuticas recomendadas con el fin de realizar un uso más racional de los antibióticos.

El tratamiento de las infecciones urinarias continúa sometido a controversias dependientes de los resultados inapropiados que, con mayor frecuencia de la deseada, obtenemos. Diversos factores pueden justificar estos hechos:

1. La existencia de un reservorio de patógenos urinarios (intestino) de imposible o difícil erradicación, a partir del cual colonizan el introito y vagina en la mujer y el prepucio y uretra distal en el varón.
2. Multiplicidad de microorganismos capaces de provocar infección urinaria. Cerca de una veintena de especies bacterianas aerobias, son identificadas diariamente como patógenos urinarios. A ellas habría que añadir la cada vez más frecuente identificación de hongos, anaerobios, clamidias y micoplasmas como causantes de las mismas.
3. El inapropiado uso de antimicrobianos facilita la selección de microorganismos cada vez más resistentes.
4. El substrato orgánico sobre el que se desarrolla la infección urinaria, es en muchas ocasiones, complejo (obstrucción, litiasis, sondas permanentes, etc), lo que obliga a la adopción de terapias combinadas.
5. Nuestras limitaciones diagnósticas que hacen inviable el precoz reconocimiento de aquellos individuos capaces de sufrir recaídas, ya sea por recidiva (mismo microorganismo) o por reinfección (microorganismo distinto).
6. Elevada incidencia de bacteriuria asintomática, sobre todo en edades extremas de la vida, no eliminable y que en un momento dado, provoca un brote sintomático.

7. Dificultad para localizar el origen de la bacteriuria. Aspecto muy importante pues es diferente el enfoque terapéutico ante una infección parenquimatosa que de vía urinaria.

Desde hace más de tres décadas se acuñó el concepto de bacteriuria significativa con el objeto de resaltar la importancia del número de colonias aisladas en un cultivo de orina. Así, sólo recuentos superiores a 100.000 unidades formadoras de colonias (ufc/mL) se consideraban como bacteriurias significativas y, por consiguiente, infección urinaria (Hernández, 2007; Picazo, 2002).

CLASIFICACIÓN (Echevarría-Zarate *et al.*, 2006; Pacora y Huiza, 1996)

1. Infección urinaria parenquimatosa (riñón, próstata, epidídimo, testículo)
2. Infección urinaria de vías (vejiga y uretra)
3. Infección urinaria no complicada
 - Bacteriuria asintomática
 - a. Infancia
 - b. Embarazo
 - Bacteriuria sintomática
 - a. Pielonefritis aguda
 - b. Cistitis aguda
 - c. Epididimitis aguda
 - d. Prostatitis Infección urinaria complicada
4. Infecciones urinarias de repetición

2.7.1 Pielonefritis aguda

Es una infección del parénquima renal, potencialmente severa, en particular en mujeres embarazadas, recién nacidos y lactantes. Clínicamente se manifiesta con fiebre, escalofríos, dolor lumbar, a los que suelen asociarse, pero no siempre, síntomas del tramo urinario inferior: polaquiuria, imperiosidad, dolor o escozor miccional. Siendo este el cuadro típico del adulto (Pigrau, 2011). A partir de los 2-3 años ya surgen síntomas urinarios. En el anciano, por el contrario, éstos pueden no

estar presentes y sí otros: gastrointestinales y pulmonares. Las enterobacterias gramnegativas son las habitualmente causantes: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*. y de las grampositivas, *Enterococcus faecalis*. El tratamiento requiere antimicrobianos capaces de obtener concentraciones elevadas en orina, suero y tejido renal. Los antimicrobianos orales que reúnen estas condiciones, son utilizados: fluoroquinolonas (un 20 % de cepas de *Escherichia coli* resistentes en España), derivados de penicilina y cefalosporinas. La vía parenteral obtiene, por una mayor biodisponibilidad, niveles más rápidos y mayores. Los aminoglucósidos y cefalosporinas de 2ª generación son los más usados. Los monobactanes y las cefalosporinas de 3ª generación, son restringibles a pielonefritis complicadas o no-complicadas desarrolladas en un paciente hospitalizado previamente. La asociación de antimicrobianos, en esta infección no complicada, no es justificable de inicio. La duración del tratamiento es de 7-14 días. Ciclos más largos, no han mostrado mayor eficacia (Vida *et al.*, 2012, Paterson, 2007).

2.7.2 Cistitis aguda

La cistitis, en el sentido amplio, se define como cualquier situación inflamatoria aguda o crónica que afecta a la vejiga urinaria en ausencia (no complicada) o presencia (complicada) de enfermedad urológica subyacente. Es la infección sintomática más común en la mujer. La distribución por edades indica una curva gaussiana con un pico máximo comprendido entre los 20-30 años. La distribución según el patógeno aislado muestran curvas similares con la excepción de *Staphylococcus saprophyticus* en el cual el 70 % se halla comprendido entre 16-25 años, lo que parece indicar una estrecha relación con el inicio de la actividad sexual (Pigrau, 2011).

La asociación de la sintomatología con un sedimento en el que se observe piuria y bacteriuria es motivo suficiente para un diagnóstico provisional de cistitis bacteriana. El diagnóstico de confirmación se basa en el cultivo de orina y aislamiento del agente causal. La presencia de microorganismos en la orina, la diferencia de cuadros clínicos similares no microbianos, denominados cistopatías o cistitis no bacterianas. Los cultivos son monomicrobianos en más del 95% de las veces, con recuento de

colonias superiores a 10^6 ufc/ml en algo más del 70%, entre 10^5 - 10^6 ufc/ml entre un 5- 10% e inferiores a 10^5 ufc/ml entre un 20- 25% de los casos. La etiología está restringida a cinco patógenos principales que son *Escherichia coli* (>80%), *Staphylococcus saprophyticus* (7-12%), *Proteus mirabilis* (4-6%), *Klebsiella spp.* (1-2%) y *Enterococcus faecalis* (0,5-1%).

La pauta clásica es la administración de un antimicrobiano de exclusiva eliminación renal, sin niveles séricos o hísticos, con lo cual se reduce el riesgo de modificar la flora intestinal o vaginal (lo que facilita las recaídas). Las quinolonas como ácido pipemídico y norfloxacin, son de elección. El cotrimoxazol o nitrofurantoína, han perdido actividad y han sido relegados, por aquellos. Las ampicilinas, considerando las cepas resistentes, y cefalosporinas orales, también son eficaces (Vidal *et al*, 2012).

2.7.3 Epididimitis aguda

Es una infección del epidídimo, típica del varón joven, generalmente secundaria al "reflujo" de microorganismos desde la uretra prostática, vía el conducto deferente. Por ello, suele ser el "pregonero" de una prostatitis. En varones menores de cuarenta años el microorganismo causal predominante es *Chlamydia trachomatis*. En mayores de 50-60 años son las enterobacterias y son secundarias a un proceso obstructivo en uretra o próstata o instrumentación uretral (epididimitis complicada). El cuadro clínico habitual cursa con fiebre, aunque puede faltar, y dolor en el hemiescroto, que está aumentado de tamaño, con incremento de la sensibilidad, sobre todo, con determinados movimientos o al palpar el epidídimo que está engrosado. El diagnóstico microbiológico, si es por enterobacterias, se fundamenta en su identificación en el cultivo de orina. Si es por *Chlamydia trachomatis*, la orina y el semen no son buenos medios para cultivarlos. Es más fiable la obtención por punción directa del líquido epididimario, pero es una maniobra agresiva, molesta y con numerosos fracasos. La presencia de leucocitos en el sedimento urinario o semen con cultivo bacteriano negativo, sugiere esta etiología. El tratamiento, en este caso, se basa en tetraciclinas: doxiciclina o minociclina, 100-200 mg/día, por un

período de 6-8 semanas. En mayores, suponiendo en enterobacterias, se usan antimicrobianos activos frente a los habituales de la infección urinaria (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*) o según el cultivo, capaces de obtener concentraciones en parénquima testicular y epididimario: aminoglucósidos, cefalosporinas de segunda generación, monobactanes, derivados de penicilina, o quinolonas. La duración puede ser de 10-14 días. Si a pesar de la correcta elección, la evolución es mala se tiene que recurrir a la cirugía.

2.7.4 Prostatitis

Dentro de las infecciones parenquimatosas, la prostatitis constituye la infección urinaria más habitual en el varón entre la segunda y cuarta década de la vida. Su prevalencia se estima, según recientes estudios en el 11% en sujetos menores de 50 años y en el 8,5% de los mayores de esa edad. El Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (NIH) ha propuesto a través de su panel de expertos una nueva clasificación que intenta acotar los posibles diagnósticos de prostatitis. El diagnóstico de las prostatitis no es sencillo. La abundante flora uretral normal (Grampositivos: *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus* grupo D); bacterias gramnegativas (básicamente enterobacterias); *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* y hongos originan problemas a la hora de discernir su auténtico papel (Pigrau, 2011).

La terapia oral debe cubrir, al menos, 14 días. Después del tratamiento de choque con cualquiera de los antimicrobianos señalados es conveniente cambiar a uno con probada difusión intraprostática (si éste no lo hace) durante el tiempo restante del tratamiento: quinolonas orales, doxiciclina o minociclina. Por ello requieren cumplir una serie de condicionantes: liposolubilidad, unión proteica baja, pKa alto y pH ácido. Así, difunden adecuadamente al líquido prostático: trimetoprim, doxiciclina, minociclina, ácido pipemídico, norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, fosfomicina, aztreonam y ceftriaxona. Los ciclos de tratamiento son de 6-12 semanas, con control microbiológico fraccionado una semana después (Hernández *et al.*, 2007).

2.8 PATÓGENOS IMPLICADOS

Se carece de estudios multicéntricos recientes a nivel nacional que analicen la etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos. A pesar de ello, tanto los realizados en distintas zonas de España como en distintos países confirman que *Escherichia coli* sigue siendo el principal uropatógeno (60-80%) y ponen de manifiesto un aumento paulatino y sostenido de su resistencia a algunos de los antibióticos de mayor uso terapéutico en la comunidad, mostrando esos datos en la tabla 4 (Andreu *et al.*, 2005).

Tabla Nº 4. Especies bacterianas más frecuentemente aisladas en urocultivos.

	Número de aislamientos (%)*
<i>Escherichia coli</i>	1989 (73,0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	146 (5,4)
<i>Klebsiella</i> spp.	32 (1,2)
<i>Citrobacter</i> spp.	31 (1,1)
<i>Enterobacter</i> spp.	24 (0,9)
<i>Serratia</i> spp.	12 (0,5)
<i>Proteus mirabilis</i>	196 (7,2)
<i>Proteus</i> spp.	6 (0,2)
<i>Providencia stuartii</i>	4 (0,1)
<i>Morganella morganii</i>	19 (0,7)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35 (1,3)
Otros bacilos gramnegativos	6 (0,2)
<i>Enterococcus</i> spp.	128 (4,8)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	46 (1,7)
<i>Streptococcus</i> spp.	4 (0,1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15 (0,6)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	18 (0,7)
Otros estafilococos coagulasa negativa	12 (0,4)
<i>Corynebacterium</i> spp.	1 (0,04)

*n: 2.724.

Fuente: Andreu *et al.*, 2005

2.8.1 *Escherichia coli* uropatógenicas

En los últimos años se ha producido un incremento de los aislamientos de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), posiblemente en relación con el uso generalizado de cefalosporinas de amplio espectro. Desde su aparición en 1983, las cepas productoras de BLEE se han considerado fundamentalmente como patógenos nosocomiales, sin embargo, actualmente, las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE son un problema emergente en la comunidad. En España (2009), datos del estudio multicéntrico GEIH-BLEE 2000 (Hernandez *et al.*, 2003) señalan que el 51% de las cepas de *E. coli* y el 7% de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, son de origen comunitario. Actualmente, en los hospitales españoles, el 64% de las cepas de *E. coli* y el 36% de *K. pneumoniae* productoras de BLEE proceden de muestras no hospitalarias y un alto porcentaje de estas cepas se aíslan a partir de muestras de orina de mujeres con infección del tracto urinario (ITU) no complicada. Además de conferir resistencia a todos los betalactámicos, excepto cefamicinas y carbapenemas, los plásmidos que codifican las BLEE contienen, con frecuencia, otros genes de resistencia para distintos antimicrobianos, como aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol y, especialmente en cepas de *K. pneumoniae*, es también frecuente la resistencia a quinolonas. Excluyendo estos antimicrobianos, las alternativas terapéuticas para el adecuado tratamiento de las ITU comunitarias causadas por cepas productoras de BLEE son muy limitadas (Ruppé *et al.*, 2009)

En otro estudio, Bou *et al.* (2002) han comunicado que 7 de 30 pacientes en los que se aislaron cepas productoras de BLEE nunca habían tenido un contacto previo con el hospital. En la serie de Rodríguez-Baño *et al.* (2004), el 40% de las cepas de *E. coli* productor de BLEE fueron de origen comunitario, identificándose entre otros factores de riesgo de infección por estas cepas, el uso previo de fluoroquinolonas, la diabetes, hospitalización previa y la ITU recurrente. Aunque no se conocen con exactitud las razones, las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se encuentran con mayor frecuencia en pacientes no hospitalizados mientras que las cepas de *K.*

pneumoniae productoras de BLEE son más prevalentes en hospitales, causando brotes epidémicos o situaciones de endemia en determinadas áreas hospitalarias.

El perfil de multirresistencia a antibióticos que expresan estas cepas ocasiona un problema terapéutico importante, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad. En el caso de las ITU comunitarias, las tasas de resistencia encontradas para ciprofloxacino y SXT, muy superiores al 20%, desaconsejan el empleo de estos antibióticos como tratamiento empírico en los casos en que por las características del paciente, pueda sospecharse de una infección de esta etiología. Por el contrario, las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, aisladas en el mismo ámbito, son cepas genéticamente relacionadas con un grupo mayoritario que incluye más del 80% de los aislamientos (Cueto *et al.*, 2006).

2.8.1.1 FACTORES DE VIRULENCIA

Escherichia coli es la bacteria uropatógena mejor estudiada y causa el 80% de las infecciones del trato urinario extrahospitalarias. Las fimbrias, unas estructuras filamentosas de la membrana externa, de unos 2-8 nm de diámetro y 15 nm de longitud, son factores determinantes de su capacidad colonizadora (son las estructuras encargadas de reconocer y unirse a receptores específicos de las células de los tejidos). La expresión de las fimbrias adecuadas permite la colonización bacteriana de los diferentes tejidos del tracto urinario y el inicio del proceso infeccioso. La *Escherichia coli* uropatógena puede expresar diferentes tipos de fimbrias durante el proceso infeccioso --hasta siete tipologías diferentes-- en función de los receptores externos de las células colonizadas en el tracto urinario. La expresión de fimbrias manosa-resistentes del tipo P esta codificada por el gen *pap* y su habilidad para adherirse a células del epitelio cúbico renal califica a este factor de virulencia como indispensable en el desarrollo de una pielonefritis en un sujeto sano. Su mecanismo de acción consiste en el reconocimiento exclusivo de un di-galactósido contenido en un glicolípido que se encuentra en la superficie de las células cúbicas renales. Otras bacterias (*P. mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, etc.) también son capaces de expresar fimbrias manosa-resistentes que

conservan un cierto parecido al tipo P de *E. coli*, pero son mucho menos selectivas. Esta característica explicaría la distinta capacidad de invasión de estas especies y en consecuencia su escasa frecuencia de aislados como agentes etiológicos.

Entre los principales factores de virulencia de *E. coli*, destacan: la presencia de adhesinas que permiten su adhesión al uroepitelio, la capacidad de estructurarse en biopelículas, la liberación de toxinas (hemolisinas, factor citotóxico necrotizante), las invasinas u otros como las islas de patogenicidad (genes que codifican factores de virulencia que se encuentran agrupados en fragmentos de DNA muy particulares denominados “islas de patogenicidad” o PAI) (Hull *et al.*, 1981).

Estos datos parecen indicar que las cepas productoras de infecciones sintomáticas corresponden a subpoblaciones menos diversas.

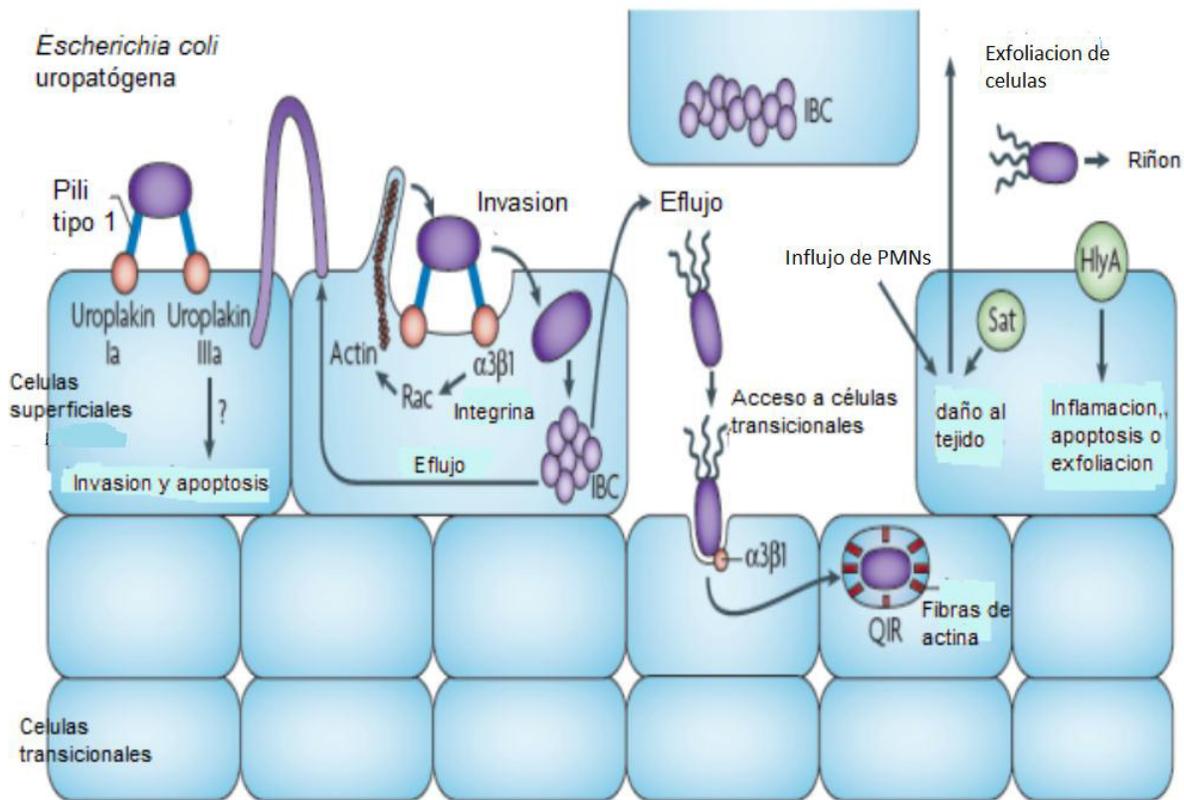


Figura N° 4. La *E. coli* uropatógena se une al epitelio de la vejiga a través de la Pili tipo 1 y estos se unen a su vez a los receptores de uroplakina la y IIIa.

Fuente: Croxen *et al.*, 2010

En estudios moleculares se ha demostrado que en mujeres jóvenes que presentan recurrencias la mayoría de éstas están producidas por la misma cepa de *E. coli*. La

incógnita sería donde se ocultan estas cepas de *E.coli* entre episodios. En estudios experimentales se ha observado que las bacterias uropatógenas invaden las células superficiales de la vejiga y que en el interior de estas células crean “biofilms” o “pods”. Estas estructuras contendrían bacterias bañadas en una matriz rica en polisacáridos rodeadas por una envoltura de uroplaquina. Estos “pods” podrían constituir un nuevo reservorio para los microorganismos productores de las IU recurrentes (Anderson *et al.*, 2004).

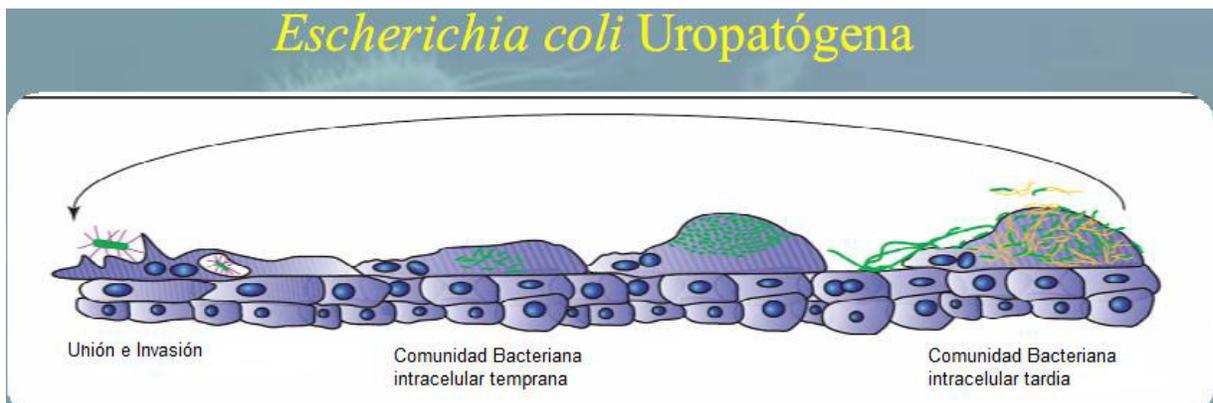


Figura Nº 5. Formación del biofilm bacteriano sobre una superficie epitelial

Fuente: Anderson *et al.*, 2004

2.8.1.1.1 Organización de los genes de virulencia

E. coli aisladas de vías urinarias infectados suelen expresar las propiedades específicas que no son frecuentes entre las cepas de la flora fecal comensal. La capacidad de adherirse a las células uroepiteliales se considera ser un factor de virulencia crítico que permite en particular clones de *E. coli* fecal colonizar el tracto urinario. Varios operones multicistronicos que codifican adhesinas de *E. coli* uropatogenas han sido analizados por las técnicas de clonación de ADN. Algunos operones de adhesinas codifican para la producción apéndices de fimbrias (pili), mientras que otros parecen codificar estructuras afimbriales.

Se han encontrado los operones *pap* (pili asociada a pielonefritis) y *prs* (secuencias relacionada a *pap*) que son operones estructural y funcionalmente relacionados,

clonados a partir del ADN cromosómico de *E. coli* J96 causante de pielonefritis. El operón *pap* codifica una adhesina específica para el antígeno P del grupo sanguíneo y se denomina adhesina P, por analogía, nos referimos a la adhesina codificada por el operón *prs* y específico para el antígeno Forssman como adhesina F. El papel de la adhesina P como un factor de virulencia en infecciones de las vías urinarias está bien documentado. En numerosos encuestas epidemiológicas, la mayoría de los aislados de pielonefritis por *E. coli* expresan una adhesina P, mientras que este fenotipo se encuentra con menos frecuencia entre los aislados de pacientes con cistitis y aislamientos fecales. En un modelo de ratones infectados con *E. coli*, se demostró que esta expresaba una adhesina P el cual mostró una mayor capacidad para colonizar el tracto urinario superior. Un análogo soluble del receptor para la adhesina era protector contra infecciones ascendentes del tracto urinario en el mismo modelo. Por lo tanto, el adhesina P promueve la infección ascendente de la tracto urinario, probablemente porque las bacterias evaden la limpieza normal del flujo de la orina en los uréteres (Roberts J., *et al* 1997). La combinación de genes de virulencia de una cepa de *E. coli* uropatogénica puede determinar el proceso de patogénesis empleado por esta cepa para provocar la infección en el tracto urinario. Los factores de virulencia de *E. coli* uropatogénica son potenciales marcadores para la prevención y el tratamiento de las infecciones urinarias. Por ejemplo, la adhesina FimH de fimbrias de tipo 1 es responsable de la colonización de la *E. coli* uropatogénica en la epitelio de la vejiga.

La ITU es un modelo de cascada patogénica. Este modelo representa la secuencia de eventos durante la progresión de establecimiento de una infección urinaria sobre la base de los datos presentados: *E. coli* avanza en cuatro distintas etapas de desarrollo que difieren con respecto a la tasa de crecimiento, longitud de la bacteria, organización de colonias, motilidad, y su eventual dispersión. En la primera fase, las bacterias de la Comunidad Bacteriana Intracelular (IBC) presentan bacterias inmóviles, en forma de varilla y crecen rápidamente en colonias poco organizadas libres. En la segunda fase, el conjunto disperso de bacterias en la IBC maduró a un ritmo más lento de crecimiento, el cual se organiza como una comunidad unida a este biofilm formado principalmente por bacterias de forma cocoide. En la tercera

etapa, las bacterias en este biofilm en la IBC cambia a un fenotipo en forma de barra que permite desprendimientos móviles de la comunidad y la eventual flujo de la célula huésped. Durante la cuarta etapa, se observan bacterias filamentosas. Esta filamentación parecía ser en respuesta a un receptor Toll-like que pertenece a la defensa innata que media este mecanismo. Las bacterias son capaces de volver a entrar en la cascada de desarrollo de la IBC con una cinética más lenta y en última instancia, se establece un depósito de reposo. El crecimiento intracelular y filamentación proporcionan una ventaja para las bacterias en evadir la infiltración polimorfonuclear de leucocitos como se muestra en la figura 6 (Justice *et al.*, 2004).

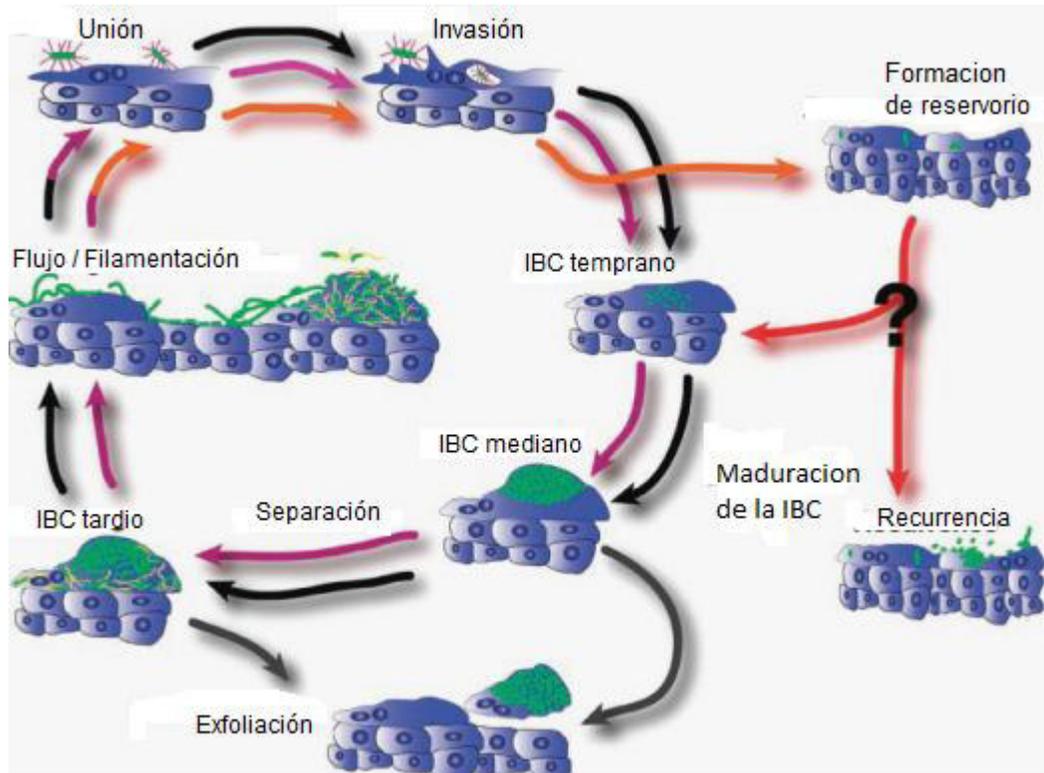


Figura Nº 6. Modelo de cascada patogénica en ITU

Fuente: Justice *et al.*, 2004

2.9 RESISTENCIA BACTERIANA EN LAS INFECCIONES URINARIAS ADQUIRIDAS EN LA COMUNIDAD

En los últimos años se ha producido un aumento de las tasas de resistencia de los uropatógenos frente a los antimicrobianos que se utilizan habitualmente, no sólo en el medio hospitalario sino también en la comunidad. Este hecho ha obligado a modificar las recomendaciones de tratamiento antibiótico empírico de las infecciones urinarias. La ampicilina y las cefalosporinas de primera generación utilizadas desde los años 1970 dejaron de poder recomendarse de forma empírica en la última década debido al incremento de las resistencias, que ha llegado a ser de hasta un 58%. El cotrimoxazol, fármaco de primera elección en el tratamiento empírico de la infección urinaria baja durante décadas, ha dejado de ser útil en muchos países por haber alcanzado tasas de resistencia superiores al 30%. En Estados Unidos el cotrimoxazol se venía utilizando de manera empírica en la infección urinaria hasta hace poco tiempo porque sus tasas de resistencia eran bajas. Sin embargo, algunas series recientes muestran cifras de resistencia de hasta el 22%, y se han publicado fracasos terapéuticos tanto en cistitis como en la pielonefritis aguda, a pesar de que se trata de antimicrobianos que alcanzan altas concentraciones en orina. De esta forma, las últimas guías terapéuticas norteamericanas recomiendan evitar la utilización empírica de cotrimoxazol en la infección urinaria cuando la prevalencia local de resistencia es del 10-20% (Horcajada y Fariñas, 2005). Las quinolonas comenzaron a utilizarse para el tratamiento de la infección urinaria en 1960 con la introducción del ácido nalidíxico en la práctica clínica. Posteriormente, en 1980, las fluoroquinolonas reemplazaron a las quinolonas antiguas por su amplio espectro y mejor farmacocinética y farmacodinámica. Desde entonces se han considerado antimicrobianos de primera elección en el manejo de la mayoría de formas clínicas de infección urinaria, incluyendo las formas graves. Sin embargo, a pesar de su corta historia, las fluoroquinolonas están dejando de ser fármacos de uso empírico en ciertas formas clínicas de infección urinaria debido a que las resistencias de los uropatógenos están aumentando en muchos países tanto en el medio hospitalario

como en la comunidad. Entre los factores que pueden haber contribuido a este rápido aumento de las resistencias a quinolonas se encuentran la utilización frecuente y/o continuada de estos antibióticos en patología humana y, probablemente, la diseminación en la comunidad de cepas resistentes a partir de animales de granja a los que se les administran antibióticos con fines terapéuticos o como promotores del crecimiento. Los factores de riesgo asociados a la infección urinaria de la comunidad producida por *Escherichia coli* resistente a fluoroquinolonas son la exposición previa a estos antibióticos, la infección urinaria recurrente, la edad avanzada y el sexo masculino. En los pacientes diabéticos con infección urinaria se aíslan con mayor frecuencia cepas resistentes a quinolonas, tal vez porque presentan más factores de riesgo de infección por cepas resistentes que la población general (Horcajada *et al.*, 2005). Sin embargo, para el tratamiento empírico de la pielonefritis aguda los betalactámicos se consideran fármacos de elección junto a las fluoroquinolonas (en áreas con resistencias menores del 10%) y los aminoglucósidos, gracias a su eficacia en infecciones con afectación parenquimatosa y sistémica y sus menores tasas de resistencia (Horcajada *et al.*, 2005).

2.10 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Una de las preguntas más frecuentes para los epidemiólogos, clínicos y microbiólogos es saber si dos bacterias aisladas son iguales o diferentes, o sea, la evaluación de clonalidad. El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva.

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Ello se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Labarca, 2002) (Tabla N° 5).

Tabla N° 5. Métodos de tipificación bacteriana

Métodos fenotípicos	Métodos genotípicos
Biotipificación	Análisis plasmidial
Antibiotipo	REA ADN cromosomal
Serotipificación	RFLP usando sondas de ADN
Bacteriófago	Ribotipificación
<i>Western blot</i>	PFGE
Electroforesis de multilocus enzimático	RPC
Secuenciación	

Fuente: Labarca, 2002

2.10.1 Métodos más usados para estudios de epidemiología molecular

Con el pasar de los años las técnicas de tipificación molecular bacteriana están siendo cada vez más disponibles. En la década de los 90 nuevas técnicas han pasado a liderar el campo de la epidemiología molecular, siendo cada vez más discriminatorias y reproducibles. Entre ellas destacan las técnicas basadas en PCR y en electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE); sin embargo, hay una variedad de técnicas disponibles las cuales pueden ser de elección frente a patógenos específicos. Si bien la secuenciación puede ser la técnica que discrimine finalmente si dos bacterias son del mismo origen clonal o no, esta técnica está todavía en investigación y su uso no es rutinario. Por otro lado, la PFGE, que nos permite evaluar la mayor parte del ADN cromosomal, es hoy en día la técnica que tiene el mejor poder discriminatorio y la mejor reproducibilidad, que permite tipificar la mayor

cantidad de especies bacterianas. Los métodos basados en PCR tienen la ventaja de ser más rápidos, más económicos y requerir infraestructura que está más ampliamente disponible; sin embargo, dan información de un sector reducido del ADN cromosomal de las bacterias y son menos reproducibles (Cuenca F. *et al*, 2013).

2.10.1.1 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos de genotipificación. La electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) es la técnica estándar de referencia para tipificar la mayoría de bacterias, hongos y parásitos con importancia clínica, debido a que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad. Esta técnica de tipificación permite la separación de DNA mediante la aplicación en un gel un campo eléctrico pero tiene el inconveniente de que es muy laboriosa y duradera (la mayoría de los protocolos de trabajos requieren más de 4 días para poder obtener y analizar los pulsotipos), por lo que su uso diario en el laboratorio es poco práctico. Esto hace que sea necesaria la búsqueda de otros métodos de tipificación alternativos a la PFGE que sean más flexibles y rápidos, y menos laboriosos (Fernández-Cuenca, 2004).

2.10.1.2 Rep-PCR

La rep-PCR es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias *rep*) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias grampositivas y hongos. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias *rep*, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias repetitivas que

más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos (Calderón *et al.*, 2002). La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo coste, una vez que se dispone de un termociclador (Fernández-Cuenca, 2004). Los patrones de bandas suelen ser sencillos. Esta técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferiores a los de la PFGE, aunque para algunas bacterias, como *A. baumannii*, se ha visto que la rep-PCR presenta un poder de discriminación similar al de la PFGE. Estudios realizados por Tenover *et al* (1994), y Van Belkum (1995) indican que la rep-PCR es tan discriminatoria como el PFGE para tipificar *S. aureus* (Fernández-Cuenca, 2004) (Tabla N° 6).

Tabla N° 6. Características más relevantes de algunos métodos de tipificación basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR en comparación con PFGE.

Método	Facilidad técnica	Interpretación de resultados	Duración de la técnica (días)	Reproducibilidad entre laboratorios	Reproducibilidad intraensayo	Coste por prueba
PFGE	Moderada	Fácil	3	Buena	Buena	Moderado
PCR-RFLP	Fácil	Fácil	1	Buena	Buena	Bajo
rep-PCR	Fácil	Fácil	1	Buena	Moderada	Bajo
AP-PCR	Fácil	Fácil	1	Moderada	Baja	Bajo
AFLP	Moderada	Moderada	2	Buena	Buena	Moderado
MLST	Difícil	Moderada	2	Buena	Buena	Elevado

Adaptada de Olive y Bean².

Fuente: Fernández-Cuenca, 2004

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Existe una importante prevalencia de cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas productoras de BLEEs en Lima metropolitana, las cuales son de diferente origen clonal.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GENERAL

1. Determinar la prevalencia, perfiles de resistencia y caracterizar genéticamente las cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas productora de betalactamasas de espectro extendido causantes de infecciones urinarias comunitarias en el área de Lima metropolitana.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia de cepas *Escherichia coli* uropatogénicas productoras de BLEEs.

2. Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de las cepas *Escherichia coli* uropatogénicas productoras y no productoras de BLEEs.

3. Caracterizar genéticamente las cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas productoras de BLEEs mediante rep-PCR y PFGE, a fin de determinar su asociación epidemiológica.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

Material biológico: cepas

Se recolectaron 181 cepas bacterianas

Escherichia coli productoras de BLEEs : 32

Escherichia coli no productoras de BLEEs : 149

Antibióticos

Se usó los siguientes antibióticos:

Amikacina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Aztreonam, Cefadroxil, Cefalotina, Cefaclor, cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepime, Ciprofloxacino, Gentamicina, Imipenem, Nitrofurantoina, Sumetropin.

Medios de cultivo

Agar Mueller Hinton según el CLSI

Agar MacConkey

Caldo Cerebro Corazon

Agar Triple Sugar Iron

Agar Lisina

Agar SIM

Agar Citrato de Simons

Equipos

Sistema MICROSCAN

Equipo para PFGE

Equipo para electroforesis horizontal

Termociclador

Transiluminador UV

4.2 MÉTODOS

4.2.1 TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio retrospectivo, transversal y descriptivo.

4.2.2 Toma de muestra

Entre mayo y julio del 2008 se colectaron 181 cepas de *E. coli* a partir de muestras de orina provenientes del mismo número de pacientes con infección del tracto urinario. Las cepas fueron aisladas en el laboratorio de Microbiología Clínica (Departamento de Patología y Laboratorio Clínico) de la Clínica Good Hope (Miraflores).

Criterios de Inclusión

Cepas bacterianas: *E. coli* productoras y no productoras de BLEEs aisladas de pacientes con infección del tracto urinario

Criterios de Exclusión

Cepas bacterianas de especie diferente a *Escherichia coli*

Cepas bacterianas aisladas de pacientes sin infección del tracto urinario

4.2.3 Aislamiento e identificación bacteriana

Se procedió según las técnicas bacteriológicas convencionales donde el aislamiento primario se obtuvo en Agar Mc Conkey, haciéndose repiques en medios diferenciales: Citrato, TSI, LIA y SIM correspondiendo a la bioquímica de *E. coli* según tablas de identificación (Koneman *et al.*, 2008), así mismo se corroboró tales cepas con el sistema MICROSCAN que permite determinar la especie bacteriana en un 99.9 % utilizando 24 sustratos diferenciales (Marco *et al.*, 2004).

4.2.4 Análisis de Susceptibilidad Antimicrobiana

Se hizo la prueba de sensibilidad por el método de disco de difusión (Bauer *et al.*, 1966). Se realizó en placas de Mueller Hinton cumpliendo con los estándares del CLSI (Cockerill *et al.*, 2012), tales como profundidad de agar, pH, entre otros. Así mismo, en una placa de 15 x 100 mm se utilizó 6 discos de antibióticos tal como lo recomienda las normas de control de calidad del Instituto de Nacional de Salud (Sacsquispe y Velásquez, 2002; Calderón y Yagui 2002), con los siguientes antibióticos: Amikacina, Amoxicilina / Acido Clavulánico, Aztreonam, Cefadroxil, Cefalotina, Cefaclor, Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepime, Ciprofloxacino, Gentamicina, Imipenem, Nitrofurantoina y Sumetropin.

4.2.5 Identificación de la Producción de BLEEs

Se llevó a cabo mediante la Prueba del Sinergismo de doble disco usando los criterios del CLSI (Lezameta L. *et al.*, 2010). Este test requiere el uso de discos habituales de Ceftazidima (30 mg), cefotaxima (30 mg), así como de Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30/10 mg) y Cefotaxima/Ácido Clavulánico (30/10 mg), con los que se realiza un test de disco difusión sin ninguna variante.

Si los discos de Ceftazidima/Ácido Clavulánico y Cefotaxima/Ácido Clavulánico presentan zonas de inhibición superiores 5 mm a aquellos producidos por los discos

de Ceftazidima y Cefotaxima respectivamente, se considera el test como positivo (Puerta *et al.*, 2005)

4.2.6 Aislamiento de DNA genómico de *Escherichia coli*

Se realizó con el Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA), según instrucciones del fabricante a partir de 0.5 ml de cultivo bacteriano. Se desarrolló siguiendo las siguientes etapas:

a. Lisis bacteriana: las células se cosecharon por centrifugación de un cultivo de toda la noche, al sedimento celular obtenido se agregó 100 µl de RNAsa y 5 µl de lisozima. Se mezcló con vórtex e incubó a 37 °C por 10 minutos. Durante la incubación se mezcló con 500 µl de buffer de lisis y proteinasa K. Se mezcló invirtiendo el tubo e incubó a 80 °C de 1 a 1.5 horas.

b. Unión de las perlas magnéticas al DNA: A la muestra contenida en el tubo se le adicionó 40 µl de perlas magnéticas, y 300 µl de “Binding Buffer” (B8). Luego de mezclar usando 5-6 pequeños pulsos con el vórtex, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. La muestra se puso sobre el MagnaRack por 1 minuto o hasta que las perlas hayan formado un sedimento. Sin remover el tubo del MagnaRack, se descartó cuidadosamente el sobrenadante sin alterar el sedimento.

c. Lavado del DNA: Consistió en añadir 1 ml de “Wash buffer” (N12) a la muestra y colocarlo sobre el Magnarack por 1 minuto o hasta que las perlas hayan formado un sedimento. Sin remover el tubo del MagnaRack, cuidadosamente se descartó el sobrenadante sin alterar el sedimento de perlas. Se sacó el tubo del magnaRack y se repitió el procedimiento por segunda vez.

c. Elución del DNA: Luego de sacar el tubo del Magnarack se añadió 200 µl de “Elution Buffer”, mezclando e incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Se colocó la muestra en el Magna Rack por 1 minuto o hasta que las perlas formaron un sedimento. Sin sacar el tubo del MagnaRack, cuidadosamente se removió el sobrenadante conteniendo el DNA a un tubo estéril de microcentrifuga, sin haber alterado el sedimento de perlas. Las perlas magnéticas usadas se descartaron.

e. Almacenaje del DNA: Se guardó a – 20 °C hasta su uso.

4.2.7 REP-PCR:

Se realizó de acuerdo al procedimiento estandarizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM, el cual se describe a continuación.

Los *primer* usados fueron (Versalovic *et al.*, 1994):

REP2I: ICG IICT TAT CIG GCC TAC

REP1R: III ICG ICG ICA TCI GGC

Estos fueron comprados a “Invitrogen”.

La mezcla usada para 5 cepas clínicas fue la siguiente: 12 µl de Cl₂Mg, 30 µl de Buffer PCR (10X), 15 µl de dNTPs (10mM), 2.4 µl *Taq* polimerasa (2 U), 12 µl Primer Forward (REP2I), 12 µl Primer Reversa (REP1R) y 12 µl de DNA molde agregando a esto 204.6 µl de agua destilada haciendo un volumen total de 300 µl.

El programa usado en el termociclador fue:

Paso 1: 95 °C / 3 minutos

Paso 2: 95 °C/ 1 minuto

Paso 3: 40 °C / 1 minuto

Paso 4: 65 °C / 5 minutos

Paso 5: 30 ciclos repetidos desde el paso 2

Paso 6: 65 °C / 15 minutos

Paso 7: 4 °C / tiempo indefinido

Los amplificadores fueron analizados mediante electroforesis en el gel de agarosa 1.0 % en buffer TAE 0.5 X. El marcador de tamaño molecular usado fue de 100 a 100 pb (Castro-Alarcón *et al.*, 2009). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron en un transiluminador UV.

4.2.8 PFGE:

Se realizó de acuerdo al procedimiento estandarizado en el Laboratorio del Hospital Clínico, DIBAPS, Barcelona – España (Diestra *et al.*, 2008). El protocolo es el siguiente:

Las cepas de *E. coli* se cultivaron durante toda la noche en caldo Luria a 37 °C. Las células se centrifugaron, se lavaron con 10 mM Tris / HCl, pH 7,6 / ClNa 1M, y se resuspendieron en un volumen adecuado del mismo tampón para obtener una densidad celular equivalente a $1,5 \times 10^9$ ufc/ml. La suspensión bacteriana resultante se mezcló en un volumen igual de agarosa (Gibco) al 2% en tampón TE (pH 7,6) a 50 °C. La suspensión bacteriana de agarosa se introdujo en el molde (Biorad) y se dejó solidificar a 4°C por 20 min. Los bloques de agarosa se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación suave en tampón de lisis (6 mM Tris / HCl, pH: 7.6), 1 M NaCl, 100 mM EDTA, pH 8; 0.5% de BRIJ 58; 0.2 % de desoxicolato de sodio; 0.5 % de N-Lauril sarcosina; 1 mg de lisozima y 20 ug de RNA). Los bloques de agarosa se lavaron a continuación en un tampón compuesto de 0.5 M EDTA (pH 9.5), 0.5 % de N-Lauril sarcosina y 50 ug de proteinasa K durante 48 horas a 55 °C. Los tampones se lavaron de nuevo durante 1 hora a 3°C y otra durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de 1 mM de PMSF en buffer TE, y luego 3 veces (durante 30 minutos cada vez) en tampón TE a temperatura ambiente. Luego se procedió a la digestión con endonucleasas de restricción. El DNA genómico fue incubado con 10 U de *Xba*I a 37 °C durante 24 horas. Los fragmentos de restricción fueron separados por PFGE usando geles de agarosa al 1% en tampón 0.5 TBE en el aparato CHEF_DRII (Biorad). Las condiciones de electroforesis fueron 14 °C a 200 V

durante 35 h, con tiempos de pulsos de 30 seg. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotodocumentaron bajo luz UV en un transiluminador.

4.2.9 Generación de dendrogramas

Los perfiles de la cepa de *E. coli* generados por Rep-PCR y PFGE, fueron analizados utilizando el programa Bionumerics versión 5.0 2007 (Applied Maths, USA), para generar un dendrograma y determinar la similitud entre las cepas.

V. RESULTADOS

En nuestro estudio un total de 300 aislados clínicos fueron recogidos como parte de los estudios de vigilancia de resistencia a antibióticos en pacientes con infecciones de tracto urinario entre mayo y julio de 2008. De ellos 181 fueron considerados en el estudio siendo el agente etiológico *E. coli*.

De los 181 cepas de *E. coli*, 32 (17.7%) fueron productoras de BLEEs y 149 (82.3%) no productoras (Tabla 7).

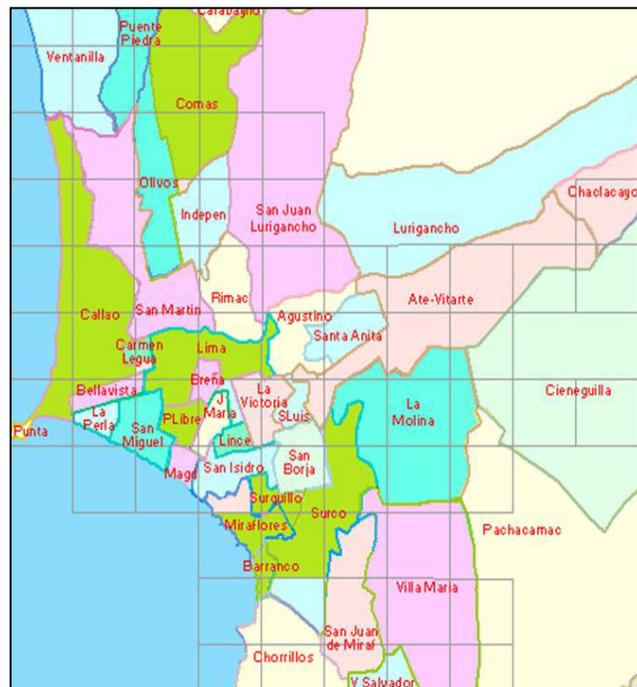
Tabla N° 7. Cepas de *E. coli* productoras de BLEE y no BLEE aisladas de pacientes con ITU

	Pacientes con ITU (%)
BLEE POSITIVAS	32 (17.7 %)
BLEE NEGATIVAS	149 (82.3 %)
TOTAL	181 (100 %)

Los datos demográficos por distritos de los 32 pacientes de los cuales se aislaron las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se resumen de la siguiente manera: 15 (46.5 %) se obtuvieron de Miraflores, 4 (12.5 %) de Surco, 4 (12.5 %) de San Isidro, 2 (6.25 %) del Callao, 1 (3.2 %) de Barranco, 1 (3.2 %) de Cercado de Lima, 1 (3.2 %) de Comas, 1 (3.2 %) de Pueblo libre, 1 (3.2 %) de Surquillo y 2 (6.25 %) datos de distritos no registrados (Tabla 8).

Tabla N° 8. Distribución por distrito de los aislados de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido a partir de urocultivos de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad, en Lima Metropolitana, de Mayo a Julio del 2008.

DISTRITO	PACIENTES CON ITU <i>E. coli</i> BLEEs	
	N	(%)
Barranco	1	(3.2%)
Callao	2	(6.25%)
Cercado de Lima	1	(3.2%)
Comas	1	(3.2%)
Miraflores	15	(46.5%)
Pueblo libre	1	(3.2%)
San Isidro	4	(12.5%)
Surco	4	(12.5%)
Surquillo	1	(3.2%)
Distrito no registrado	2	(6.25%)
TOTAL	32	(100%)



Se observó que la mayoría de cepas productoras de BLEEs fueron resistentes a las 3 familias de antibióticos (Sulfonamidas, Fluoroquinolonas y Betalactámicos) e inclusive a los asociados a inhibidores de betalactamasas. Asimismo, se muestra que la co-resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico y ciprofloxacino fue común a la mayoría de las cepas productoras de BLEEs, seguida de sulfametoxazol/trimetoprim y gentamicina (Figura 7).

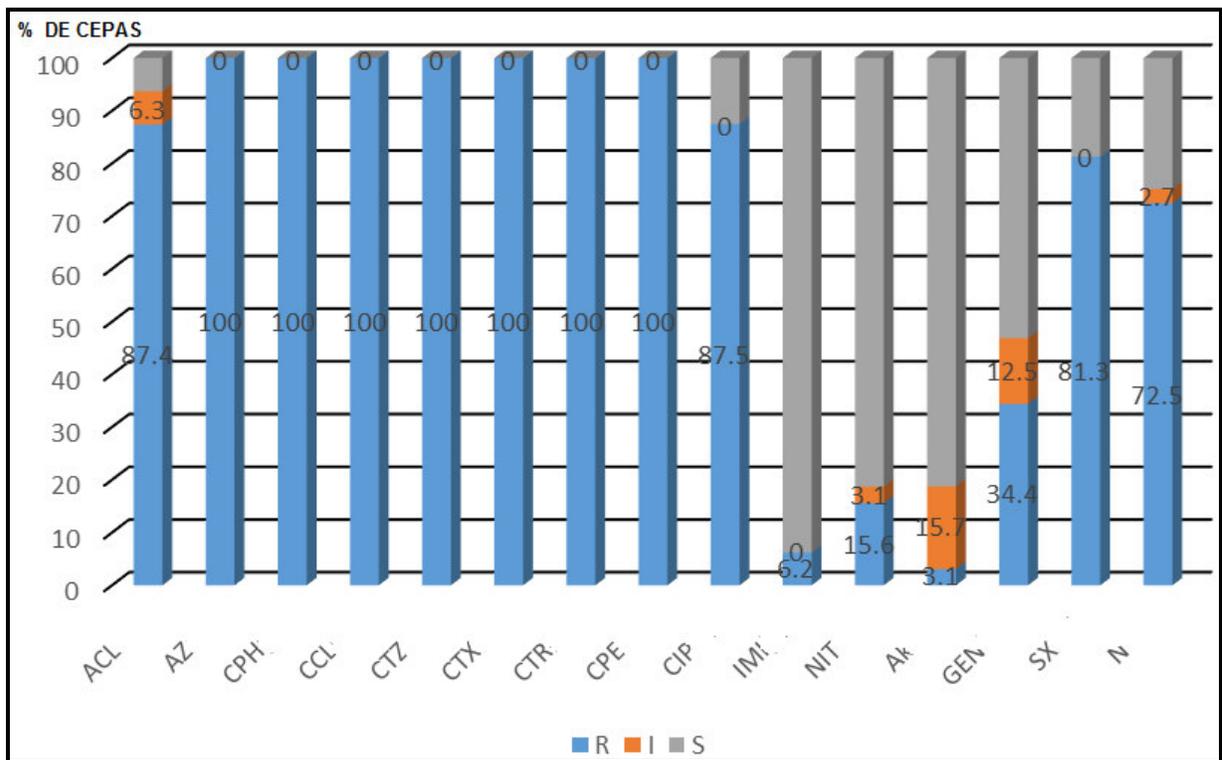


Figura N° 7. Susceptibilidad de los aislados de *E. coli* uropatogénicas productoras de BLEEs de Mayo a Julio del 2008. (R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible)

En cuanto a las características fenotípicas de los aislamientos encontrados de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, se identificó que todos tuvieron el mismo perfil de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Figura 7).

Se observa que las cepas no productoras de BLEEs fueron resistentes a sulfametoxazol/trimetopim (67.63%), ciprofloxacino (53.3%), amoxicilina/ácido clavulánico (42.47%), cefadroxil (47.08%), cefaclor (17.95%), con total susceptibilidad a imipenem, amikacina, ceftriaxona, cefepime y cefotaxima (Figura 8).

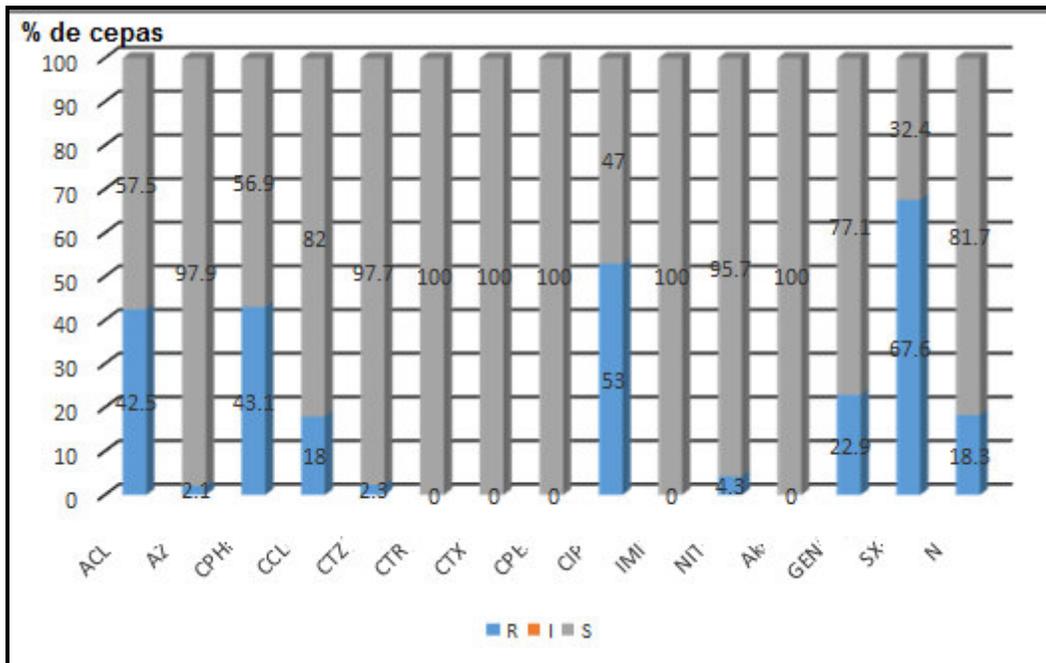


Figura Nº 8. Susceptibilidad de los aislados de *E.coli* uropatógenas no productoras de BLEEs de Mayo a Julio del 2008. (R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible)

En cuanto a los pacientes portadores de *E. coli* productoras de BLEE se encontraron que 30 (93.75%) mujeres y 2 (6.25%) hombres. La edad promedio de los pacientes fue de 50 años con un rango de 26 a 74 años (datos no mostrados).

Con respecto a los cuadros clínicos presentados por los pacientes portadores de las cepas productoras de BLEE, estos fueron distribuidos de acuerdo a la clasificación: ITU recurrente 28 (87.5 %), Cistitis 2 (6.4 %), ITU severa 1 (3.2 %) y Pielonefritis 1 (3.2%) (Tabla 9).

Tabla Nº 9. Distribución por tipo de ITU de los aislados de *E. coli* productores de BLEEs a partir de urocultivos de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad, en Lima Metropolitana, de Mayo a Julio del 2008.

TIPOS DE ITU	PACIENTES CON ITU <i>E. coli</i> BLEEs
	N (%)
ITU RECURRENTE	28 (87.5%)
ITU SEVERA	1 (3.2%)
CISTITIS	2 (6.4%)
PIELONEFRITIS	1 (3.2%)
TOTAL	32 (100%)

El análisis de los perfiles generados por rep PCR y PFGE de las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs aisladas en este estudio, demostró que todas fueron distintas genéticamente (diferentes perfiles amplificados por rep PCR y diferentes perfiles de fragmentos de DNA mediante PFGE), lo que significa que las cepas proceden de distintas fuentes y localización geográfica (Figura 9 y Figura 10), es decir, no tienen origen clonal.

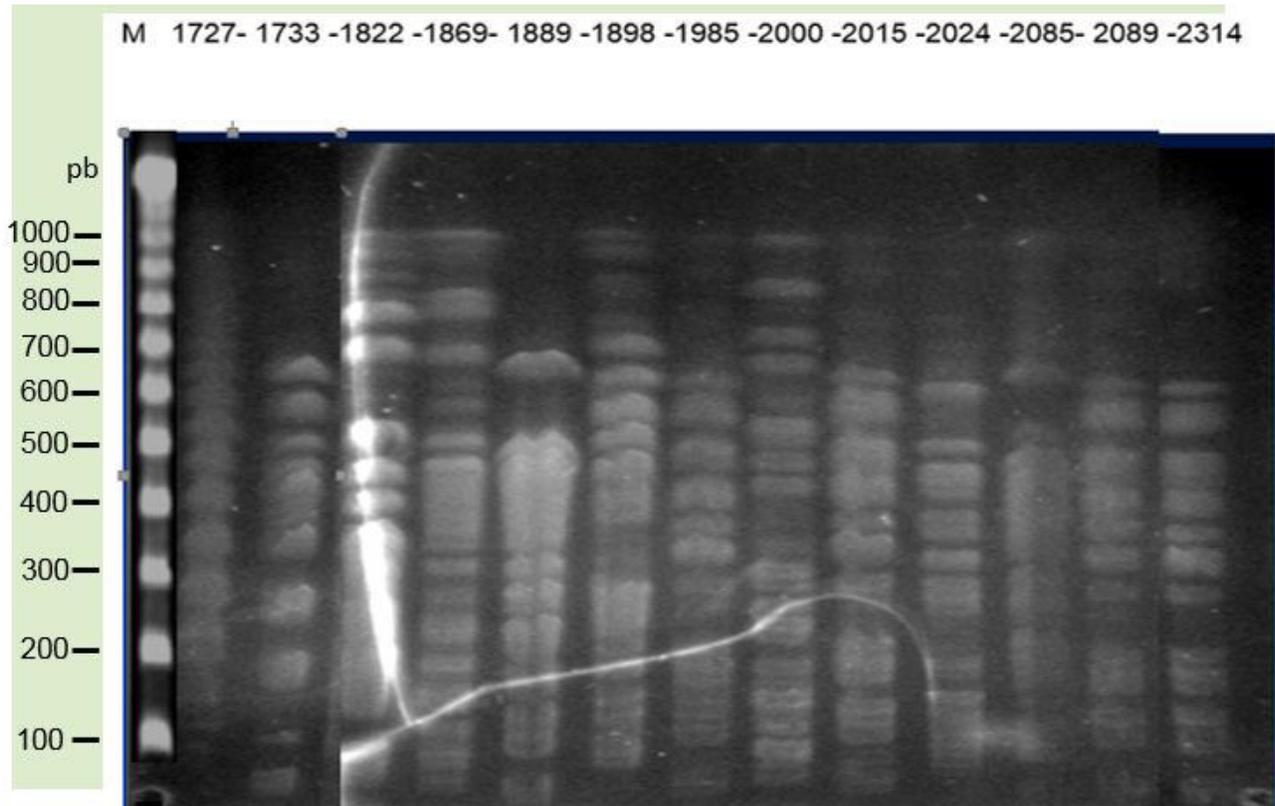


Figura N° 9. Perfiles electroforéticos obtenidos mediante PFGE de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEEs aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad, en Lima metropolitana. La codificación de las cepas se indica en la parte superior de los carriles. Digestión realizada con XbaI. M: Marcador lambda ladder, PM: 100 – 1000 pb

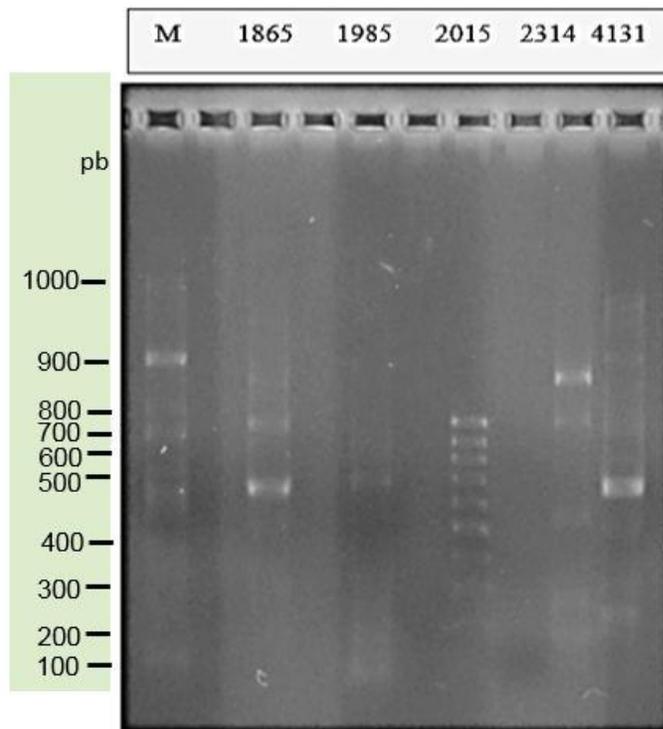


Figura N° 10. Rep-PCR de cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas productoras de BLEEs aisladas de pacientes con ITU adquiridas en la comunidad, en Lima metropolitana. Se usaron los *primer* REP-2F Y REP-2R.

M: Marcador de bajo peso molecular: 100 – 1000 pb. Cepas: 1869, 1985, 2015, 2314, 4131 (izquierda a derecha)

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir el empleo de las dos técnicas PFGE y rep-PCR (Figura 9 y Figura 10) para la tipificación molecular de *E. coli* productoras de BLEE, ya que cumplieron con los criterios de evaluación de métodos de tipificación como: la capacidad de tipificación (el 100% de los aislados fueron tipificables), la reproducibilidad (se realizó por duplicado, obteniendo los mismos perfiles de bandas, la facilidad de interpretación (5 a 10 fragmentos amplificados).

Los patrones de bandas obtenidos con la PFGE de las 13 cepas de *E. coli* uropatógenas permitieron definir 13 genotipos diferentes (Figura 11).

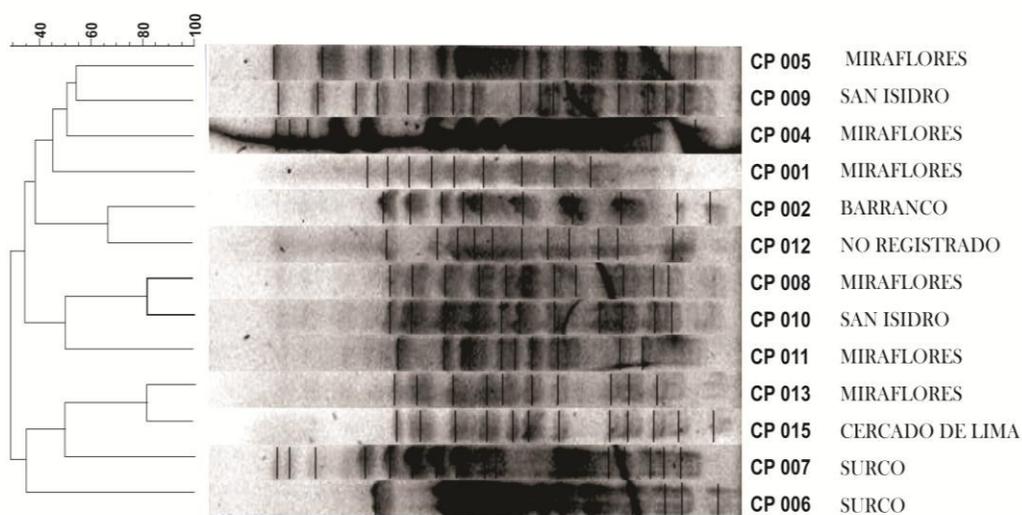


Figura N° 11. Dendrograma de los genotipos obtenidos mediante PFGE de cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas productoras de BLEEs aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad, en Lima metropolitana.

Los patrones de bandas obtenidos con la REP-PCR de las 5 cepas de *E. coli* uropatógenas permitieron definir genotipos diferentes (Figura 10).

El análisis del dendrograma indica una baja clonalidad de las cepas, es decir, que las cepas circulantes en los distintos distritos de Lima metropolitana no se derivan de un clon inicial. Más bien, cada una de las cepas es prácticamente un genotipo y circulan indistintamente entre los distritos de esta comunidad, sin asociación epidemiológica entre ellas (Figura 11).

Observamos entonces al igual que otros estudios, que la tipificación molecular por rep-PCR y PFGE determinó que la propagación clonal no jugó un papel clave en la difusión de cepas productoras de BLEE. Estos resultados fueron consistentes con nuestra hipótesis de que los productores de BLEE serían policlonales.

VI. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana mediada por BLEEs es un problema global, sin embargo varios estudios han demostrado que es más frecuente en los países latinoamericanos ya que *Klebsiella* y *E. coli* tienen una frecuencia más alta de producción de BLEE en esta región cuando se compara con las otras regiones del mundo (García-Apac, 2012; Sahm *et al*, 2001).

De las 181 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU entre mayo y julio del 2008, 32 (17.7%) fueron confirmadas como productoras de BLEEs, corroborando la hipótesis planteada, que en la comunidad de Lima metropolitana hay una prevalencia importante de cepas productoras de BLEEs. Tena (2010) señala que estas cepas representan un alto porcentaje en la comunidad.

El 17.7% encontrado de *E. coli* productoras de BLEE se aproxima a los valores de frecuencias comparadas con otros países de América Latina, que va de 20 a 48 % (García *et al.*, 2012).

Las 32 cepas confirmadas fenotípicamente como productoras de BLEE fueron resistentes a cefalosporinas de 1ra, 2da, 3era, 4ta generación, aztreonam e imipenem, así como sensible a antibióticos no betalactámicos como amikacina y nitrofurantoína, características que concuerdan por lo señalado por Castro-Alarcón (2008).

En cuanto a la susceptibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico, se observó que 28(87.5%) de 32 cepas productoras de BLEE fueron resistentes al inhibidor de betalactamasa (ácido clavulánico), lo cual podría deberse a diversos mecanismos, como alteración de la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria por modificación de las porinas o por hiperproducción de BLEE (Hernández, 2008).

La corresponsión a antibióticos no betalactámicos determinada en las 32 cepas productoras de BLEE podría deberse a mutaciones cromosómicas y extracromosómicas, en los genes que dan origen a los blancos terapéuticos de otras familias de antibióticos (ciprofloxacino, sulfametoxazol/trimetoprim) (Andre, *et al* 2008), así como a otros mecanismos los cuales habría que investigar.

En cuanto a las cepas no productoras de BLEE pero que eran resistentes a los betalactámicos, probablemente involucran otros mecanismos de resistencia, tales como: bombas de flujo, betalactamasas AmpC sean cromosómicas o mediadas por plásmidos y reducción de permeabilidad de la membrana externa (Pittout *et al.*, 2005; Trupia *et al.*, 2005; Martínez-Martínez *et al.*, 2007).

Cabe resaltar por ejemplo que la resistencia a quinolonas en varios estudios es atribuido a mutaciones cromosómicas en los genes *gyr*. Este fenómeno se puede explicar en parte por la presencia de la propagación clonal de resistencia a las quinolonas (García-Apac, 2012).

Cueto *et al.* (2010) en España demuestran que la fosfomicina mantiene su actividad frente a cepas *E. coli* productoras de BLEE uropatógenas y, de momento, no existe resistencia cruzada con otros grupos de antimicrobianos, lo que convierte a este antimicrobiano en una buena alternativa para el tratamiento de la ITU comunitaria causada por estos patógenos multirresistentes.

El grado de resistencia encontrado en este estudio aunque es ligeramente menor a lo reportado por García *et al.* (2012) para América latina (20-48%), nos hace suponer que se debe fortalecer la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos y que persiste el uso indiscriminado y automedicación de antibióticos en la comunidad con relación a las infecciones del tracto urinario (Pujol *et al.*, 2003).

El cateterismo urinario y la administración previa de cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación fueron factores de riesgo importantes para la infección

con cepas de *E. coli* productoras de BLEE uropatógenas en nuestro país (Rodríguez-Baño, 2006).

Observando las tablas de distribución por distritos y clasificación de ITU (Tabla 8 y 9), es un tema de gran complejidad que requiere no sólo el análisis del consumo de antibióticos, sino el estudio pormenorizado del tipo de pacientes e infecciones, de acuerdo con su gravedad clínica y antecedentes de uso previo de antibióticos. Si bien es cierto se encontró mayor porcentaje en el distrito de Miraflores, San Isidro, Surco es porque las muestras eran de distritos cercanos a la clínica y es por eso que también los pacientes presentan ITUs recurrentes en mayor porcentaje.

Según Rodríguez-Baño (2010) en España, las cepas de *E. coli* productoras de BLEE constituyen una causa emergente de infecciones intrahospitalarias y las características epidemiológicas son complejas y diferentes según el tipo de BLEE producido por lo que este estudio considero debe ser ampliado y profundizado.

El conocimiento del uso previo de antibióticos emerge como el factor predictivo más importante en la sospecha diagnóstica precoz de las infecciones potencialmente resistentes.

La prevalencia encontrada de *E. coli* productoras de BLEE en pacientes con Infección urinaria en Lima metropolitana, probablemente se debe a un proceso multifactorial que habría que investigar, pudiendo incluir tanto los elementos genéticos(plásmidos, transposones), tipo de microorganismo, resistencias asociadas (quinolonas y aminoglucósidos) y presión selectiva a antibióticos (uso de cefalosporinas de tercera generación) (Navarro y Miró, 2007).

Al comparar parejas, es decir fragmento-por-fragmento, cada patrón observado no tiene un brote común. Las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE tienen menos del 50% de fragmentos en común considerándose por lo tanto no afines.

Se demostró una baja clonalidad de las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas en este estudio, es decir, que mayoritariamente los perfiles de cada una de las cepas son distintos unos de otros (Espinal, 2004). Mediante la PFGE, las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas en este estudio brindan una información epidemiológica útil, pudiéndose entender que éstas tienen patrones moleculares distintos que representan cepas únicas y distintas que no están relacionadas entre sí (Espinal *et al.*, 2004).

Esta baja diseminación clonal se debería principalmente a, la infección localizada en el paciente y a que no se facilita la transmisión de paciente a paciente por no estar en un ambiente hospitalario.

Se ha descrito la diseminación clonal de cepas de *E. coli* resistente a cotrimoxazol en la comunidad, sin embargo, en nuestro medio, al igual que sucede entre los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE estudiados, no parece existir relación clonal entre las cepas de *E. coli* resistentes a cotrimoxazol. Posiblemente, la diseminación de estos mecanismos de resistencia está en relación con la transmisión vehiculizada por plásmidos en lugar de la diseminación de clones (Cueto *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se emplearon dos técnicas de tipificación molecular para discriminar grupos clonales en cepas de *E. coli* uropatógenas, la rep-PCR y la PFGE. En la población analizada, ambas técnicas fueron capaces de identificar los 13 genotipos Tanto con la técnica rep-PCR como con PFGE se pudo agrupar a los aislados de *Escherichia coli* en 13 genotipos. Al no estar estas cepas relacionadas entre sí y presentar distintos determinantes de resistencia esto sugiere que la

resistencia este mediada por mecanismos de transferencia genética horizontal (Rodríguez-Baño. 2008).

Se demostró en el siguiente trabajo mediante el análisis de dendograma que las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE no están relacionadas clonalmente, y en su mayoría se distribuyeron en 2 grupos mayoritarios. El primer grupo estaría formado por las cepas pertenecientes a los distritos de Surco y Cercado de Lima; y el otro grupo formado por los distritos Miraflores, San Isidro y Barranco.

Por otras publicaciones, el estándar de oro en la tipificación molecular es la PFGE, los resultados obtenidos en el presente estudio incluyeron esta técnica y la rep-PCR, las cuales mostraron resultados concordantes con un poder de discriminación igual en ambas técnicas (Bernal *et al.*, 2004; Castro-Alarcón *et al.*, 2009).

Debido a la accesibilidad de la metodología, bajo costo y rapidez en el procesamiento, la técnica de rep-PCR es una herramienta muy útil para la tipificación molecular de cepas de *E. coli* uropatógenas en unidades hospitalarias como lo menciona en su artículo Castro-Alarcón *et al.* (2009) en México.

La PFGE es útil para la determinación de la clonalidad de las enfermedades infecciosas ya que permiten comparar y determinar si los aislamientos tienen un mismo origen (Manges *et al.*, 2001).

En el Perú, no hay estudios similares al de esta tesis. Hay una investigación realizada por Bailon y Sacsquispe (2013), quienes muestran los resultados del análisis de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE sospechosos de un brote de infección nosocomial provenientes de una unidad neonatal de un hospital de Lima. A través del uso de tres diferentes métodos de genotipificación, en la que incluyeron PFGE, demostraron una relación clonal entre 5 de los 7 aislamientos analizados sugiriendo la transmisión horizontal de estas infecciones entre los pacientes de dicha unidad (Calderón *et al.* 2003).

Dada la escasez de estudios que evalúen este tema en nuestro país, consideramos que se deberían hacer más investigaciones sobre epidemiología molecular de bacterias productoras de BLEE en la comunidad.

VII. CONCLUSIONES

Las cepas de *Escherichia coli* uropatógenas productoras de BLEEs adquiridas en la comunidad de Lima metropolitana:

1. Presentan una importante prevalencia de resistencia (17.7%) a los antibióticos betalactámicos.
2. Presentan una alta resistencia (100 %) a las cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación así como una resistencia mayor al 15% en cuanto a quinolonas, nitrofurantoína, sulfatrimetropin, gentamicina e inhibidores de betalactamasas.
3. Tienen una alta frecuencia de corresponsencia a los antibióticos aminoglucósidos y fluoroquinolonas.
4. Tienen alta sensibilidad (90%) a aminoglucósidos (Amikacina) y carbapenem (Imipenem).
5. Se aíslan con más frecuencia de personas mayores de 50 años de edad, de sexo femenino y con cuadros clínicos de ITU recurrente.
6. No tienen origen clonal, no son afines entre sí. Su diversidad genética es alta (baja clonalidad).
7. La técnica de rep-PCR es una herramienta útil para la tipificación molecular de estas cepas dados los resultados concordantes con la técnica de PFGE, su menor costo, rapidez de procesamiento y accesibilidad de la metodología.
8. El análisis de dendograma muestra que las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE para este estudio en su mayoría se distribuyeron en 2 grupos mayoritarios, los cuales no están relacionados clonalmente. El primer grupo estaría formado por

las cepas pertenecientes a los distritos de Surco y Cercado de Lima; y el otro grupo formado por los distritos Miraflores, San Isidro y Barranco.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Organizar programas para el control del uso de antibióticos sobre todo de cefalosporinas de tercera generación y quinolonas, limitando así la aparición de resistentes en los hospitales.
2. Controlar la diseminación de estos microorganismos productores de BLEE en clínicas y hospitales mediante la desinfección de equipos médicos y la higiene de manos.
3. Realizar estudios moleculares epidemiológicos para la detección temprana de pacientes infectados con microorganismos productores de BLEE, tanto comunitarios como intrahospitalarios.
4. Realizar estudios a gran escala que involucre más hospitales de Lima metropolitana y evidenciar la presencia y tipos de estas cepas uropatógenas productoras de BLEE involucrados en la resistencia otros antibióticos.
5. Ampliar los estudios de detección molecular identificando los tipos de genes BLEE por ejemplo, TEM, CTX-M, SHV, los cuales se diseminan en cepas comunitarias e intrahospitalarias.
6. Las técnicas rep-PCR y PFGE pueden ser empleadas como herramientas moleculares para la tipificación de brotes de *Escherichia coli* productoras de BLEE.
7. El conocimiento global de los grupos de antibióticos de mayor consumo por áreas en un centro de atención facilitará el mejor control y ayudará a implementar el uso racional de antibióticos con el objetivo último de poder influir positivamente en la disminución del desarrollo de resistencias marcadas o co-resistencias frente a los agentes de mayor uso.

8. En el Perú, no hay muchos estudios que evalúen este tema, es por tal motivo que se debería hacer estudios de epidemiología molecular sobre estas bacterias productoras de BLEE en la comunidad.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABARCA G., HERRERA M.L. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica). 2001 Vol: 36 nº.1-2
2. ANDERSON G., DODSON K., HOOTON T., HULTGREEN S. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. 2004 TRENDS in Microbiology Vol.12 Nº.9 September. Pág: 424 - 430
3. ANDRE A., PLANELLS I. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. estudio nacional multicéntrico. Med Clin (Barc). 2008. 130(13):481-6
4. ANDREU A., ALOS B. J.I., GOBERNADOR M., MARCÓ F., ROSE M., GARCIA RODRIGUEZ J.A. 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
5. ANDREU A. Patogenia de las infecciones del tracto urinario 2005 Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 23 (Supl. 4): 15-21
6. ANGEL M., RAMON J., MARTINEZ L., RODRIGUEZ J., PASCUAL A., Y GRUPO DE INVESTIGACION DE INFECCION HOSPITALARIA 2009 Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 27(9):503–510
7. BERNAL M.; POUTOU R., MÁTTAR S. Utilización del RAPD para detectar clonalidad entre cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) aisladas de pacientes pediátricos con diarrea. Universitas Médica. 2004. 45 (1) : 7-12
8. BRADFORD, P. Extended-Spectrum B-Lactamasas in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and Detection of this Important Resistant Threat. Clin. Microbiol. Rev. 2001. 14 (4) : 933-951
9. BUSH K, JACOBY G.A., MEDEIROS A.A. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995. 39:1211-33.

10. CAMACHO-MOLINA, L., PEROZO-MENA A.; CASTELLANO-GONZALES M., BERMUDEZ-NAVARRO E., HARRIS-SOCORRO B. Métodos fenotípicos para la detección de Betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *klebsiella pneumoniae*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2004 24 : 1-2
11. CALDERON R., SACSAQUISPE R., PASTERAN F., GALAS M., SOTO J., RIVEROS J., VALENCIA A., SILVA N., SUAREZ V., MONTOYA P. Caracterización Molecular de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* Productoras de Betalactamasas de Espectro extendido Tipo SHV – 5 en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal de Lima. Rev. Peru med. Exp. Salud publica 2003. 20 (3): 121-127
12. CALDERÓN R., YAGUI M. Manuel de procedimientos para la investigación de brotes de infecciones intrahospitalarias producidas por bacterias mediante Métodos de Biología Molecular. Serie de Normas Técnicas N 35 .Instituto Nacional de Salud. 2002. Pág.1-28
13. CALVO J.; CANTON R.; FERNANDEZ CUENCA F.; MIRELIS B.; NAVARRO F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. 2011 Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. España.
14. CASELLAS J. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev. Panam. Salud Publica 2011 30 (6): 519 - 528
15. CANTON, R., VALVERDE A., NOVAIS A., BAQUERO F., COQUE T. Evolución y Panorama actual de las BLEE. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2007. 25: Supl. 2:2-10
16. CASTRO-ALARCON N.; ALONSO-MORALES A.; SILVA-SANCHEZ J.; ARMENTA-SOLIS A. Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de β -lactamasas de espectro extendido. Bioquímica 2009. Vol 34 N°. 4 Octubre-Diciembre p. 165-174
17. CASTRO-ALARCON N.; CARRION VALLE E.; ALARCÓN ROMERO L. Caracterización molecular de β -lactamasas de espectro extendido en

- aislamientos clínicos de *Escherichia coli* Enf Inf Microbiol 2008. 28 (3): 114-120
18. CERCENADO E., CANTON R. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. 2005 Procedimiento en Microbiología Clínica SEIMC Pág.: 1 40
 19. COCKERILL F., WIKLER M., ADDRE J., DUDLEY M., Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing 2012 CLSI M100 S22 VOL 32 N° 3
 20. CROXEN A., FINLAY B., Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. 2010. Nature Reviews Microbiology VOL 8
 21. CUETO M., HERNÁNDEZ J., LÓPEZ-CERERO L., MORILLO C., PASCUAL A. Actividad de fosfomicina sobre cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido. 2006 Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 24(10): 613-616
 22. DIESTRA K., COQUE T., MIRO E., OTEO J., NICOLAU C., CAMPOS J., MOYA B., CURIAU T., PEREZ-VASQUEZ M., CANTON R., OLIVER A., NAVARRO F. Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004) Enferm Infecc Microbiol Clin 2008. 26(7):404-10
 23. ECHEVARRIA-ZARATE J., SARMIENTO E., OSORES-PLANGE Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. 2006 Acta Med. Per. 23(1) Pág.: 26-31
 24. ESMERINO L.; GONZALVES L.; SCHELESKY M. Perfil de sensibilidad Antimicrobiana de cepas *Escherichia coli* aisladas de Infecciones Urinarias Comunitarias. UEPG Ci. Biol. 2003. Saude, Ponta Grossa 9 (1): 31-39
 25. ESPINAL P., MANTILLA J., SAAVEDRA C., LEAL A., ALPUCHE C., VALENZUELA E. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. Biomédica 2004. Vol.24 N°.3 Bogotá
 26. FARIÑAS M.; MARTINEZ-MARTINEZ L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. 2013 Enferm Infecc Microbiol Clin. 31(6):402–409

27. FERNANDEZ-CUENCA F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las Enfermedades Infecciosas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(6):355-360
28. GAITAN S., ESPINAL P., GRUPO DE INVESTIGACION DE RESISTENCIA BACTERIANA. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. 2009 *Rev Chil Infect* 26 (3): 239-246
29. GARCIA C.; DE LA GANDARA M.; CASTILLO F. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. 2010 *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28 (Supl 1): 12-18
30. GARCÍA-APAC C. 2012. Resistencia antibiótica en el Perú y en América Latina. *Acta medica peruana* 2012. 29(2): 99-103
31. GARCIA C., ASTOCONDOR L., BANDA C. 2012. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido: Situación en América latina y en el Perú. 29(3): 163-169
32. HERNANDEZ E. *Escherichia coli* productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. 2010 Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Pág.: 1- 172
33. HERNANDEZ W.; RAMOS A.; NODARSE R.; PADRON A.; DE ARMAS E. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (blee). *Rev Cub Med Int Emerg* 2006. 5(1):256-264
34. HERNANDEZ J.; MARTINEZ L.; HERNANDEZ J.; MOHAMED-BALGHATA M. Documento de consenso sobre el manejo clínico de las Infecciones del Tracto Urinario. Sociedad andaluza de Enfermedades Infecciosas. 2007. Vol. 8 suplement. 2
35. HINOSTROZA F; LOZA R. Resistencia antibiótica en infecciones urinarias en niños atendidos en una institución privada, periodo 2007 - 2011 *Rev Med Hered.* 2013. 24:210-216.
36. HO P., POON W., LOKE S., LEUNG M., CHOW K., WONG R., YIP. K., LAI E., TSANG K. Community emergence of CTX-M type extended-spectrum b-lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. *Journal of*

- Antimicrobial Chemotherapy 2007. 60: 140–144
37. HORCAJADA J.P., FARIÑAS M.C. Implicaciones de las resistencias bacterianas en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2005. 23(1):1-3
 38. HULL R., GILL R., HSU P., MINSHEW B., FALKOW S. Construction and Expression of Recombinant Plasmids Encoding Type 1 or D-Mannose-Resistant Pili from a Urinary Tract Infection *Escherichia coli* Isolate. *Infection and Immunity* 1981. p. 933-938
 39. JACOBY G.A., MUNOZ-PRICE L.S. Mechanisms of disease: The New *b*-Lactamases. *N Engl J Med* 2005. 352:380-91
 40. JUSTICE S., HUNG C., THERLOT J., FLETCHER D., ANDERSON G., FOOTER M., HULTGREN S. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *PNAS*. 2004. Vol 101: N° 5: 1333-1338
 41. LABARCA J. Utilización del Antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev. Chil. Infectol.* 2002. 19: Supl. 2: 157-160
 42. LERMA M., CEBRIAN L., GIMENEZ M., CORONEL P., GIMENO P., AGUILAR P. GARCIA DE LOMAS J. β -lactam susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections exhibiting different resistance phenotypes. *Rev Esp Quimioter* 2008. 21(3):149-152
 43. LEZAMETA L., GOBZALES-ESCALANTE E., TAMARIZ J. comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. 2010 *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 27(3): 345-51
 44. MANGES A., JOHNSON J., FOXMAN B., OBRIAN T., FULLERTON K., RILEY L. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med*. 2001. Vol. 345, No. 14
 45. MANGES A., DIETRICH P., RILEY L. Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired pyelonephritis. *Clin. Infect. Dis.* 2004. 38:329-334

46. MARCO F., JURADO A., JIMENEZ DE ANTA M. Evaluación del sistema Phoenix para identificación y determinación de la sensibilidad de aislamientos clínicos. Estudio comparativo con el sistema Microscan. 2004 Rev. Esp. Quimioterap. Junio Vol 17 (2) : 169-176
47. MARTINEZ-MARTINEZ L. Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2007. 25 (2): 38-47
48. MORALES, J.L., REYES K., MONTEGHIRFO M., ROQUE M., IREY J. Presencia de B-lactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Peru. An. Fac. Med. 2005. Lima 66 (1): 24-32
49. NAVARRO F., MIRÓ E. Entorno genético de las BLEE: Implicaciones en la transmisión. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2007. 25: Supl. 2: 11-17
50. OLIVER ANTONIO Y RAFAEL CANTÓN 2003 Enterobacterias productoras de Betalactamasas plasmídicas de Espectro Extendido. Control de calidad de Sociedad Española de Microbiología Clínica. 2003.
51. PATERSON D. Tratamiento de las infecciones por microorganismos productores de BLEE. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2007. 25 (2) : 60-63
52. PACORA P. HUIZA L. Bacteriuria asintomático es una población de Lima, consecuencias maternas, fetales, y Neonatales. Rev: Ginecología y obstetricia. 1996. 42(3) : Pág. 50-58
53. PALLECHI L., BARTOLONI A., FIORELLI C. Rapid dissemination and diversity of CTX-M Extended-spectrum betalactamases genes in commensal Escherichia coli isolates from low-resource setting in Latin America. Antimicrobial agents and chemotherapy, Aug. 2007, p. 2720–2725
54. PEREZ F., ENDIMIANIA., HUJER K., BONOMO R. The continuing challenge of Esbls. Curr Opin Pharmacol. 2007. 7(5): 459–469
55. PHILLIPON A., LABIA R., JACOBY G. Extended-Spectrum b-Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1989. 33(8) : 1131 – 1136
56. PICAZO J. La infección Urinaria. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2002

57. PIGRAU C. Infección del tracto urinario 2013 Ed. Salvat Barcelona Pág.: 1-137
58. PITOUT J., LAUPLAND K., CHURCH D., MENARD M., JOHNSON J. Virulence Factors of *Escherichia coli* Isolates That Produce CTX-M-Type Extended-Spectrum b-Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005. Vol. 45 p. 4667–4670
59. PUERTA, H.; CANTILLO C.; CONSUEGRA C.; CORONEL W.; ALVIS N.; MATTAR S. Capacidad de los laboratorios de microbiología clínica de Cartagena para detectar microorganismos productores de Betalactamasas de espectro extendido. Asociación Colombiana de infectología. 2005. 19: 123-130
60. PUJOL M., PEÑA C. El significado Clínico de las Betalactamasas de Espectro Extendido. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2003. 21 (2): 69-71
61. RAMOS A.; HERNANDEZ W.; NODARSE R.; PADRON A.; DE ARMAS E.; ROSARIO L. Detección precoz de Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido en pacientes graves. Rev. Cub. Med. 2006 Int. Emerg. 5 (1). 294 -301
62. ROBERTS J., KAACK M., BASKIN G., MARKLUND B.I, NORMARK S., Epitopes of the P-fimbrial adhesin of E. coli cause different urinary tract infections. 1997 J Urol. Oct;158(4):1610-3.
63. RODRÍGUEZ-BAÑO J., NAVARRO M., ROMERO L., MUNIAIN M., PEREA E., PEREZ-CANO R., HERNANDEZ J., PASCUAL A. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia Coli* as a Cause of Nosocomial Infection or Colonization: Implications for Control. Clinical Infectious Diseases 2006. 42(1):37-45
64. RODRIGUEZ-BAÑO J. Y NAVARRO M. Extended-spectrum b-lactamases in ambulatory care: a clinical perspective Clin Microbiol Infect 2008. 14 (Suppl. 1): 104–110
65. RODRÍGUEZ-BAÑO J., ALCALA J., CISNEROS J., GRILL F., OLIVER A., HORCAJADA J., TORTOLA T., MIRELIS B., NAVARRO G., CUENCA M.; ESTEVE M., PEÑA C., LLANOS A., CANTON R., PASCUAL A. Community

- Infections Caused by Extended Spectrum Lactamase Producing *Escherichia coli* Arch Intern Med. 2008. 168(17):1897-1902
66. RUPPÉ E., HEM S., LATH S., GAUTIER V., ARIEY F., SARTHOU J., MONCHY D., ARLET G. CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. Emerging Infectious Diseases 2009. Vol. 15, N° 5
67. SAN MARTIN B.; CAÑON H. Antimicrobianos en medicina veterinaria: ¿Cómo se puede evitar la resistencia bacteriana? 1999 TECNO VET: Año 5 N°2.
68. SUAREZ C., GUDIOL F. Antibióticos Betalactámicos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clinic. 2009. 27(2): 116-129
69. TENA D., GONZALES-PRAETORIUS A., GONZALES J., HEREDERO E., ILLESCAS S., SAINZ DE BARANDA C., SESEÑA G. Evolución del patrón de sensibilidad de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario diagnosticadas en la comunidad durante el periodo 2003-2007. Estudio multicéntrico en Castilla la Mancha. Rev Esp Quimioter 2010. 23(1):36-42
70. TRUPPIA, L., MOLLERACH A., DI CONZA J., RADICE M., MUGNA V., MENDEZ E.; GUTKIND G. Comparación de tres métodos para la detección de Betalactamasa de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). Enferm. Infecc. Microbiol. Clinic. 2005. 23 (9) : 525 – 528
71. SACSQUISPE R., VELASQUEZ J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión 2002 INS Serie de Normas Tecnicas 30
72. SAHM D., THORNSBERRY C., MAYFIELD D., JONES M., KARLOWSKY. Multidrug-Resistant Urinary Tract Isolates Demographics in the United States in 2000 of *Escherichia coli*: Prevalence and Patient. Antimicrob. Agents Chemother. 2001. 45(5):1402
73. VERSALOVIC J., SCHNEIDER M., BRUIJN F., LUPSKY J. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. 1994. Methods in Molecular and Cellular Biology 5:25-40

74. VIDAL E., LAMA C., BARROS C. Actualización del documento del consenso sobre infecciones del tracto urinario. 2012 Avances en enfermedades infecciosas. Vol 13 Suplemento 1. Pág.: 1-28