



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA
SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
TECNOLOGÍA MÉDICA
ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA

**“COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO DE DISCO PRE
DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE DISCO
COMBINADO PARA LA DETECCIÓN DE
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE
BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN
MUESTRAS DE UROCUTIVO”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO
TECNÓLOGO MÉDICO EN EL ÁREA DE LABORATORIO
CLÍNICO Y ANATOMIA PATOLÓGICA

MARX CRUZADO REQUEJO

ASESOR:

LIC. JAVIER ORLANDO SOTO PASTRANA

LIMA – PERÚ

2016

HOJA DE APROBACIÓN

MARX CRUZADO REQUEJO

**“COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO DE DISCO PRE
DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE DISCO
COMBINADO PARA LA DETECCIÓN DE
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE
BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN
MUESTRAS DE UROCUTIVO”**

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del
título de Licenciado en Tecnología Médica en el área de
Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la
Universidad Alas Peruanas.

A todos mis maestros que, en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo fidelidad.

Le doy gracias a mis padres Gabriel y Paublina por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo, por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Al servicio de Laboratorio Clínico microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” que me brindaron todas las facilidades para la realización de este trabajo de investigación.

RESÚMEN

Objetivos: Determinar las diferencias significativas entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado para la detección de Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Materiales y métodos: Estudio comparativo de corte transversal, prospectivo y descriptivo en 246 aislamientos de enterobacterias en urocultivo del Hospital Docente Madre Niño “San Bartolomé”. En ambos métodos se realizó con cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), solos y combinados con Amoxicilina/Acido clavulánico. El análisis estadístico fue en IBM SPSS.

Resultados: Se procesaron 201 aislamientos positivos para BLEE y 45 aislamientos BLEE negativos. Se obtuvo una muy buena correlación entre el método de disco pre difusión y la prueba confirmatoria de disco combinado ($\kappa=1.00$), el método de disco pre difusión tuvo una sensibilidad y especificad de 100.0%. Las enterobacterias BLEE positivos más frecuentes fueron: 173 (86.1%) de *E. coli*, 27 (13.4%) *K. pneumoniae*, 1 (0.5%) *P. mirabilis*. El género sobresaliente con mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE fue en mujeres con 171 (85.1%) y la edad dominante fue en menores de 10 años con 73 (36.3%).

Conclusión: En el estudio realizado se evidenció una alta concordancia y rendimiento diagnostico en ambos métodos comparados, pudiendo ser el método de disco pre difusión una opción alternativa y eficaz.

Palabras clave: Betalactamasas, resistencia a antibióticos, Enterobacterias, *Escherichia coli*, urocultivo.

ABSTRACT

Objective: Determine the significant differences between the disk pre diffusion method and confirmatory method combined disk for the detection of beta-lactamase producing Enterobacteriaceae extended spectrum (ESBL).

Materials and Methods: A comparative, prospective cross-sectional study was performed in 246 isolates Enterobacteriaceae in urine culture in the Hospital Docente Madre Niño "San Bartolomé". In both methods was performed with cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), alone and in combination with amoxicillin / clavulanate. The statistical analysis was SPSS.

Results: Were performed 201 isolates for positive ESBL and isolates negative 45. A very good correlation was obtained between disk pre diffusion method and confirmatory method combined disk ($\kappa=1.00$); the disk pre diffusion method had a sensitivity and specificity of 100.0%, the most frequent ESBL-positive enterobacteriaceae were: 173 (86.1%) of *E. coli*, 27 (13.4%) *K. pneumoniae*, 1 (0.5%) *P. mirabilis*. The outstanding genre more often ESBL-producing Enterobacteriaceae was in 171 women (85.1%) and the dominant age was under 10 years old with 73 (36.3%).

Conclusion: In the study evidenced a high concordance and diagnostic performance compared both methods, may be the method disk pre diffusion an alternative and effective option.

Key words: lactamase, antibiotic resistance, Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, urine culture.

ÍNDICE

CARÁTULA.....	1
HOJA DE APROBACION.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
RESÚMEN	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE	7
INTRODUCCIÓN	12

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema:.....	13
1.2. Formulación del Problema:.....	15
1.2.1. Problema General:	15
1.2.2. Problemas Específicos:	15
1.3 . Objetivos:.....	17
1.3.1 Objetivo General:.....	17
1.3.2. Objetivos Específicos:.....	17
1.4 HIPOTESIS	19
1.5 JUSTIFICACIÓN:	19

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Bases Teóricas.....	20
2.1.1. Generalidades sobre los antibióticos	20
2.1.2. Antibióticos betalactámicos.....	20
2.1.3. Mecanismos de resistencia a betalactámicos	22
2.1.4. Betalactamasas	23
2.1.5. Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE).....	25
2.1.6. Inhibidores betalactámicos	27
2.1.7. Mecanismo de inhibición.....	28
2.1.8. Detección de BLEE en el laboratorio de Microbiología	29
2.1.9. Métodos para la detección de las Betalactamasas.	30
2.1.10. Determinación de la sensibilidad por el método de difusión en disco según la O.M.S.....	31
2.1.11. Métodos fenotípicos para la identificación de BLEE.	33
2.2. Antecedentes	42
2.2.1. Antecedentes Internacionales	42
2.2.2. Antecedentes Nacionales.....	46

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño del Estudio:.....	48
3.2. Población:.....	48
3.2.1. Criterios de Inclusión:	48
3.2.2. Criterios de Exclusión:.....	48

3.3. Muestra:.....	48
3.4. Operacionalización de Variables	49
3.5. Procedimientos y Técnicas:.....	50
3.6. Plan de Análisis de Datos:.....	53

CAPÍTULO IV: RESULTADOS ESTADÍSTICOS

4.1. Resultados	54
4.2. Discusión de resultados	65
4.3. Conclusiones.....	68
4.4. Recomendaciones.....	70

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71
----------------------------------	----

ANEXOS	82
--------------	----

MATRIZ DE CONSISTENCIA	94
------------------------------	----

LISTA DE TABLAS

Título	Página
Tabla Nº 01 Diferencias significativas entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado.....	54
Tabla Nº 02 Evaluación del disco de ceftazidima y cefotaxima para la detección de BLEE en el método disco pre difusión	56
Tabla Nº 03 Evaluación de la sensibilidad del método disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado.....	57
Tabla Nº 04 Evaluación de la especificidad del método disco pre difusión y el método confirmatorio de combinado.....	58
Tabla Nº 05 Determinación de la concordancia entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado.....	59
Tabla Nº 06 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE.....	60
Tabla Nº 07 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el género.....	61
Tabla Nº 08 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el género femenino.....	62
Tabla Nº 09 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el género masculino.....	63
Tabla Nº 10 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el grupo etario.....	64

LISTA DE GRAFICOS

Titulo	Página
Gráfico N° 01 Diferencias significativas entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado.....	54
Gráfico N° 02 Evaluación del disco de ceftazidima y cefotaxima para la detección de BLEE en el método disco pre difusión.....	56
Gráfico N° 03 Evaluación de la sensibilidad del método disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado.....	57
Gráfico N° 04 Evaluación de la especificidad del método disco pre difusión y el método confirmatorio de combinado.....	58
Gráfico N° 05 Determinación de la concordancia entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado.....	59
Gráfico N° 06 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE.....	60
Gráfico N° 07 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el género.....	61
Gráfico N° 08 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el género femenino.....	62
Gráfico N° 09 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el género masculino.....	63
Gráfico N° 10 Frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE según el grupo etario.....	64

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Figura N° 01 Mecanismo de resistencia a los betalactámicos.....	87
Figura N° 02 Criterio de interpretación de difusión de discos y la MIC.....	87
Figura N° 03 Prueba de tamizaje y confirmación de BLEE.....	88
Figura N° 04 Método confirmatorio de disco combinado.....	89
Figura N° 05 Método de Jarlier.....	89
Figura N° 06 Método de Hodge.....	90
Figura N° 07 Pasos para realizar el método de disco pre difusión.....	91
Figura N° 08 Método de disco pre difusión.....	92
Figura N° 09 Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana.....	93

INTRODUCCIÓN

La resistencia de enterobacterias a antibióticos betalactámicos es un fenómeno natural que conforma un serio problema en la salud pública y es uno de los modelos que demuestran las llamadas enfermedades infecciosas emergentes.² El amplio uso indiscriminado de los antibióticos en pacientes con enfermedades crónicas son factores que ayudan directamente en la resistencia bacteriana a los antibióticos, y posteriormente conlleva al fracaso en la terapia antimicrobiana.³ Uno de los mecanismos de resistencias con considerable importancia clínica son las betalactamasas de espectro extendido, esta enzima con mayor frecuencia se presenta en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*.⁸

El presente trabajo tiene como objeto comparar el método confirmatorio de disco combinado con un método alternativo para la detección de enterobacterias productoras de BLEE, determinando la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y la concordancia de los dos métodos. Esto permitirá brindar un diagnóstico oportuno para el beneficio del paciente, para luego iniciar terapia antimicrobiana correcta. Este método alternativo fue diseñado por el laboratorio de microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé”

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema:

La alta incidencia de las infecciones del tracto urinario son causadas principalmente por Enterobacterias, así como el surgimiento de cepas resistentes y multirresistentes a los antibióticos, son elementos que constituyen uno de los mayores problemas de la medicina actual y futura, ya que estos factores dificultan el tratamiento de las enfermedades infecciosas y deterioran la calidad de vida del individuo.^{1,2} Entre los antimicrobianos más ampliamente utilizados se encuentran los betalactámicos, conformados por la penicilina, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos, los cuales continúan siendo objeto de modificaciones bioquímicas dirigidas a modular su actividad antimicrobiana.³

La producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituye uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos, es por ello que la utilización de inhibidores de betalactamasas en combinación con antibióticos betalactámicos que permite la inactivación de determinadas betalactamasas producidas por gérmenes Gram positivos, Gram negativos, entre otros.⁴ Los inhibidores de betalactamasas representan una alternativa terapéutica mejorada respecto del resto de los betalactámicos por asegurar un mayor espectro antimicrobiano en comparación con sus análogos. Actualmente existen tres inhibidores de betalactamasas localmente disponibles: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Diversos estudios confirman que las combinaciones de inhibidores betalactámicos son efectivos en el tratamiento empírico inicial de infecciones respiratorias, intraabdominales, urinarias y ginecológicas, incluidas las de origen polimicrobiano.⁵ En el caso particular de amoxicilina-sulbactam, la evidencia citada indica que esta combinación es efectiva para el tratamiento de desde sinusitis hasta infección del tracto urinario e infecciones ginecobstetricias. Asimismo, por su espectro y propiedades farmacológicas, la combinación amoxicilina–sulbactam constituye una excelente opción también para el tratamiento de infecciones.³

Para la detección de BLEE en Enterobacterias se utiliza métodos comparativos, lo que favorece la sensibilidad y especificidad y resulta de gran utilidad por el hecho de que determinados aislamiento de enterobacterias BLEE positivas puedan parecer sensibles in vitro a los betalactámicos, siendo en realidad resistentes debido a diferencias cuantitativas en la actividad hidrolítica en determinadas cepas BLEE sobre los sustratos; Asimismo, ciertas betalactamasas pueden no detectarse si el inóculo es muy elevado y/o si la producción de betalactamasa se asocia con otro mecanismo de resistencia o una disminución de la permeabilidad de la membrana al paso del antibiótico.⁶

Por estas razones la evaluación de cepas BLEE resulta importante y necesaria en los laboratorios de Microbiología clínica, por el mal pronóstico y alta tasa de morbilidad en pacientes con infecciones por estas bacterias.⁷ Existen diversos métodos fenotípicos para la detección de BLEE: el método de tamizaje para detección de BLEE según la CLSI (The Clinical Laboratory Standard Institute), el método confirmatorio de disco combinado según CLSI, el método de Jarlier, el método de Hodge y el método tridimensional para la determinación de BLEE.⁸ En ese sentido, y dado la reciente aplicación del método de disco pre difusión para la determinación de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*.^{9,10,11}

Este estudio se plantea comparar el método disco pre difusión frente al método confirmatorio de disco combinado para la búsqueda de Enterobacterias productoras de BLEE, determinando la sensibilidad, especificidad y también la concordancia entre estos 2 métodos.

1.2. Formulación del Problema:

1.2.1. Problema General:

¿Existe diferencias significativas entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?

1.2.2. Problemas Específicos:

¿Cuánto es la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) del método disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?

¿Cuánto es la concordancia entre el método disco pre difusión y el método de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?

¿Cuál es la enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?

¿Cuál es la enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el género, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?

¿Cuál es la enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el grupo etario, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?

1.3 . Objetivos:

1.3.1 Objetivo General:

Determinar las diferencias significativas entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.

1.3.2. Objetivos Específicos:

Determinar la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPN) y el valor predictivo negativo (VPN) del método disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.

Determinar la concordancia entre el método disco pre difusión y el método de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.

Determinar qué enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.

Determinar qué enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el género, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015

Determinar qué enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el grupo etario, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.

1.4 HIPOTESIS

Hipótesis General

No existe diferencia significativa entre el método de disco pre difusión frente al método confirmatorio de disco combinado para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido.

1.5 JUSTIFICACIÓN:

Las infecciones de tracto urinario por enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y el uso inapropiado de antibióticos debido a la no detección de este mecanismo de resistencia constituyen un problema relevante por su frecuencia creciente, como también la morbilidad que pueden llevar al paciente a tener problemas renales graves y afectar su salud integral.

El constante aumento en la incidencia de las infecciones por bacterias multirresistentes es un grave problema de salud pública en todo el mundo, ya que estas bacterias están presentes en infecciones graves con peores pronósticos debido a la ineficacia terapéutica. En ese sentido la detección oportuna y eficaz de BLEE constituye un verdadero desafío para el personal de los laboratorios de microbiología.

En el presente trabajo tiene como objetivo comparar el método de disco pre difusión frente al método confirmatorio del disco combinado para la detección de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en urocultivo, esto permitirá tener las bases científicas sobre el cual se diseñara un método alternativo eficaz con una óptima sensibilidad y especificidad para la detección de enterobacterias productoras de BLEE, beneficiando no solamente a los pacientes con ITU sino también al personal de microbiología, los cuales podrían obtener resultados concordantes, confiables, rápidos y además de ser más accesibles en el mercado, facilitando la detección oportuna.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Bases Teóricas

2.1.1. Generalidades sobre los antibióticos

Son sustancias sintéticas o naturales producidas por varias especies de microorganismos (hongos, bacterias, actinomices), que inhiben el crecimiento de otros microorganismos y ocasionalmente pueden exterminarlos. Los antibióticos se clasifican de acuerdo a la función a realizar contra los microorganismos infecciosos, la mayoría de los antibióticos retrae o inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, polímeros y las proteínas, algunos antibióticos lesionan la membrana celular, y otros alteran la pared bacteriana.^{12, 14}

Se pueden clasificar también en función a su estructura química, clasificando a las tetraciclinas, sulfamidas, cefalosporinas, macrólidos, penicilinas, y aminoglucósidos.¹² Las bacterias gram positivas son más sensibles a los antibióticos que los microorganismos gram negativas.¹² Se denominan antibióticos de amplio espectro a los agentes que inhiben a las bacterias gram positivas como a las gram negativas.¹⁴

2.1.2. Antibióticos betalactámicos

Los betalactámicos es la familia más numerosa de antibióticos de amplio espectro, actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana con acción bactericida lenta relativamente independiente de la concentración plasmática, con débil toxicidad para el humano por lo cual son usados con mayor frecuencia por los clínicos.^{13,15} Los antibióticos betalactámicos está conformado por:

2.1.2.1. Carbapenémicos y Monobactámicos.

Son antibióticos sintéticos con acción bactericida para microorganismos gram negativos resistentes a las cefalosporinas y penicilinas.¹⁴ Los carbapenémicos más conocidos son el imipenem y el meropenem, aunque actualmente se encuentran en fase experimental algunos derivados de este grupo, los más sobresalientes son el panipenem y el biapenem. Dentro de los monobactámicos, el más usado es el aztreonam, aunque existen otros como el tigemonam y el caromonam.¹⁵

2.1.2.2. Penicilinas. Son empleadas con gran frecuencia por su eficacia terapéutica y escasa toxicidad, son de origen natural y sintéticos, los de origen natural son elaborados por diversas especies de *Penicilium spp.* Se distribuyen de acuerdo a su espectro y acción y origen en:

- **Penicilinas resistentes a penicilinasas de los estafilococos:** meticilina, oxacilina, dicloxacilina
- **Penicilinas naturales:** penicilina G (procainica, benzatinica) y penicilina V, vía oral o IM. Está indicado para *Neisseria spp.*, estreptococos y sífilis
- **Carboxipenicilinas:** Carbenicilina, ticarcilina
- **Aminopenicilinas:** Amoxicilina, ampicilina. Tienen más actividad para gérmenes gram negativos productores de betalactamasas al asociarse con inhibidores como el sulbactam o ácido clavulánico.^{12,}

16

2.1.2.3. Cefalosporinas. Son antibióticos de origen natural elaborado de la fermentación de *Cephalosporium acremonium*. En su núcleo está constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico, en situaciones clínicas son requeridos como agentes de primera elección en casos de sepsis,

infecciones de tejidos blandos y de piel, meningitis, neumonía, e infecciones intrahospitalarias.^{14, 15}

Se clasifican en cuatro generaciones:

- **Cefalosporinas de primera generación:** Cefazolina, Cefalexina, cefradina, cefadroxil, cefalotina. Son indicados contra *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis* y *staphylococcus spp*. meticilinosensibles.

- **Cefalosporinas de segunda generación:** Cefaclor, cefuroxima, cefonicida. Tienen actividad contra *Moraxela catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*.

- **Cefalosporinas de tercera generación:** Ceftriaxona, cefeloperazona cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima. Son indicados contra Enterobacterias, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*

- **Cefalosporinas de cuarta generación:** *Cefpirome*, *cefepime*. Indicados contra gérmenes productores de betalactamasas cromosómicas (*Pseudomonas spp*. y otras bacterias relacionadas), tiene baja actividad frente a anaerobios.^{14,15,18}

2.1.3. Mecanismos de resistencia a betalactámicos

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian, el control genético de dichos mecanismos puede ser cromosómico, por transposones o plasmídico, la resistencia cromosómica aparece por mutación, y los transposones y plásmidos se pueden transferir de una bacteria a otra.^{16,19}

Se puede describir en tres mecanismos:

A. Trastorno de permeabilidad: Se presenta con frecuencia en bacterias Gram negativos donde la membrana celular es rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas, la penicilina y vancomicina que por su tamaño molecular son incapaces de pasar a través de la porinas.¹⁴

B. Hidrólisis enzimática: Indica la inactivación de los antibióticos betalactámicos por acción de las enzimas betalactamasas.^{16, 18}

C. Alteración del sitio blanco: Sufre modificaciones en el gen que codifica el blanco del antibiótico, el sitio blanco de los betalactámicos son las diferentes proteínas fijadoras de penicilina (PBP) Este tipo de resistencia es importante en *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria spp.*¹⁶ Figura N° 01

2.1.4. Betalactamasas

Son sustancias químicas o enzimas producidas por ciertas bacterias, estas enzimas se encargan de romper el anillo de algunos antibióticos betalactámicos, desactivando sus propiedades antimicrobianas, se encuentra en la parte intracelular de los bacterias Gram positivos, o en el espacio peri plasmático en bacterias gram negativos, los genes que codifican se encuentran localizados en el plásmido o en el cromosoma bacteriano, pudiendo ser transferidos entre especies.^{19, 20, 21, 23.}

Las cepas bacterianas que producen las enzimas de la clase A: SHV-1, TEM-1, ROB-1 son mediados por plásmidos resistentes a la ticarcilina, amoxicilina entre ellos tenemos a enterococos, *Moraxella catarrhalis*, bacteroides, acinetobacter, pseudomonas, Neisseria, estafilococos y algunas familias de enterobacterias, estas enzimas son neutralizadas por inhibidores de betalactamasas como ácido clavulánico, tazobactam, y sulbactam.^{21, 26}

Las betalactamasas de la clase C son producidas por varios integrantes de la familia de las enterobacterias incluyendo *Acinetobacter baumannii*, Enterobacter y Serratia, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, y así como *P. aeruginosa* y *E. coli* producen cefalosporinasa, pero esa enzima se manifiesta de manera constitutiva, en niveles bajos y no presenta acción contra los antibióticos β -lactámicos.²⁰

Las betalactamasas se clasifican de acuerdo con su espectro de hidrolisis, secuencia y ubicación de proteínas o de genes.^{21, 22}

- **Clasificación de Ambler.**

Este tipo de betalactamasas se clasifican en: (A, B, C y D). Está basada en la secuencia de aminoácidos y su estructura molecular, los de tipo A, C, D que corresponden a enzimas que contienen serina en su sitio activo y las de tipo B pertenecen a las metaloenzimas.^{22,23,30}

- **En 1995 clasificación de Bush, Jacob y Medeiros.**

Se clasifica de acuerdo a los sustratos que la enzima hidroliza y la inhibición por la presencia de ácido clavulánico y otros, generando cuatro grupos:

Grupo 1. Las cefalosporinas que no son inhibidas por el ácido clavulánico ni por EDTA (Etilen diamino tetra acético), los genes que codifican generalmente son cromosómicos pero también por plásmidos, son resistentes a todos los betalactámicos, menos los carbapenemes, los bacilos gram negativos que producen estas enzimas son las de tipo AmpC.^{22,23,30}

Grupo 2. Las Cefalosporinas, carbapenemasas y penicilinas que son inhibidas por el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam.

Grupo 3. Las metalo betalactamasas son inhibidas por EDTA pero no son inhibidas por el ácido clavulánico, son enzimas que confieren resistencia a los betalactámicos y carbapenemes pero no a los monobactames.

Grupo 4. Las penicilinasas misceláneas no son inhibidas por el ácido clavulánico. Este grupo es poca importancia, estas enzimas son producidas por *Burkholderia cepacia*.^{22, 24, 25}

2.1.4.1. Betalactamasas inducibles

Una enzima inducible solo se produce cuando un microorganismo se expone a un antibiótico betalactámico, la enzima solo se produce en presencia a la exposición a un sustrato de un agente antimicrobiano betalactámico, después de lo cual se desencadena la producción de la enzima, el antibiótico no causa la resistencia; solo induce la expresión de resistencia potencialmente presente en la bacteria.^{14, 20, 21}

2.1.4.2. Betalactamasas constitutivas

Se expresa de manera continua, independientemente de que haya o no estímulo. Un ejemplo de producción de Betalactamasas constitutiva es la enzima cromosómica BLEE SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae* que interviene en la resistencia contra ampicilina y ticarcilina.^{14, 20, 21}

2.1.5. Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE)

La producción de betalactamasas es uno de los mecanismos principales, son enzimas capaces de hidrolizar a las penicilinas y todas las cefalosporinas, (menos a las cefamicinas), las monobactamasas, pero no las carbapenemasas, se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.^{8, 20} En Alemania en el año de 1983 se describen por primera vez las BLEE, estas enzimas son producidas por enterobacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, describiéndose que se dan con mayor frecuencia en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.^{20, 26}

Las BLEE comienza en 1983 en Alemania con el aislamiento de diversas enterobacterias portadoras de la betalactamasa SHV-2, que hidroliza las oximino-cefalosporinas y deriva de SHV por mutaciones, luego descubrieron otras enzimas las de TEM-1 y TEM-2, que presentan una o

más reemplazos en la secuencias de aminoácidos, por ello aumenta su espectro de hidrolisis a las penicilinas y cefalosporinas de 3G y 4G y a los monobactámicos.^{26, 33}

En España se encontraron por primera vez en 1988, las BLEE que más frecuentan son de tipo SHV y a los finales de los años 80 se descubre la familia de BLEE, la CTX-M presentando muchas especies de bacterias y en los años 90 se encontraron en diferentes especies de bacterias y el año 2000 se encontraron con mayor frecuencia en casi todo el mundo.^{26, 27}

La frecuencia de las infecciones debidas a bacilos que producen BLEE se distingue según la institución de salud implicada y el área geográfica. En Latinoamérica no se había reportado BLEE hasta 1985. En Chile se informó de la primera cepa de *Klebsiella pneumoniae* generadora de BLEE derivada de SHV y se la denominó SHV-5.^{21,27, 33}

En el Perú, hay muy pocos estudios que han evaluado relacionado a este tema, en un estudio realizado en niños de comunidades rurales de la selva peruana que no se exponen a antibióticos, se determinó que las *Escherichia coli* comensales en heces presentan resistencia a ceftriaxona, asimismo se determinó la presencia de BLEE CTX-M.^{21, 26}

La vigilancia de resistencia en hospitales, se realiza de manera in vitro mediante métodos fenotípicos, donde se puede determinar la resistencia o sensibilidad antibiótica, la detección oportuna de estos microorganismos nos permite la implementación de medidas de control de infección para impedir su diseminación y lo más importante, brindar una terapia apropiada a quienes sufren de infección por las bacterias que son productoras de BLEE.²⁶

2.1.6. Inhibidores betalactámicos

El uso de inhibidores de betalactamasas (sulbactam, ácido clavulánico, y tazobactam), son eliminados por filtración glomerular y secreción tubular a excepción de ácido clavulánico, es recomendable ajustar la dosis en pacientes con insuficiencia renal moderada o grave.^{29, 30}

La asociación de un betalactámico con un inhibidor de betalactamasa representa una alternativa en la terapia permitiendo la inactivación de betalactamasas producidas por bacterias Gram negativos y Gram positivos, aerobios y anaerobios^{28, 29}

Existen tres factores que influyen en la eficacia de un inhibidor; el número de moléculas del inhibidor que hidrolizan hasta inactivar la enzima, la velocidad de inactivación de la enzima, y la estabilidad de la enzima inactivada, por ejemplo el ácido clavulánico en menos de 1 minuto logra que el 50% de la betalactamasa TEM-2 ser transitoriamente inhibidas y a los 15 minutos quedarse irreversiblemente inhibida.²⁸

Los inhibidores betalactámicos más importantes se pueden clasificar en:

a. Inhibidores reversibles

Son aquellos inhibidores que después de la unión con la enzima no inactivan una vez retirado los inhibidores pudiendo esta recobrar su actividad, es decir que no modifican la actividad enzimática de la enzima.^{18, 28} Existen de dos tipos:

- **No competitivos.** Se unen a un locus diferente del centro activo de la enzima y por ello no revierte su acción aumentando la concentración de sustrato, influyen en la eficacia de un inhibidor determinando la velocidad de inactivación de la enzima.²⁸

- **Competitivos.** El sustrato de la enzima, que es seguida por la reacción química más lenta tras la unión al centro catalítico, que da lugar a una inactivación transitoria o permanente de la enzima. Estos inhibidores compiten por el mismo centro activo que el sustrato; la inhibición desaparece en presencia de concentraciones elevadas de sustrato.^{28,32}

b. Inhibidores irreversibles

En este caso el inhibidor se fija a la enzima un tiempo suficiente para que el antibiótico actúe sobre la bacteria, estos inhibidores modifican uno o más grupos funcionales de la enzima, de modo que ésta es incapaz de catalizar nuevamente la conversión de sustrato en producto.²⁸ Los hay de tres tipos diferentes:

- **Inhibidores del centro activo:** Estructuralmente semejantes al sustrato, pero con un grupo funcional muy reactivo que se une a la enzima de forma irreversible (aztreonam).^{28, 31, 33}

- **Modificadores de aminoácidos:** reaccionan covalentemente con un aminoácido susceptible de la enzima produciendo la inactivación de la misma.^{28, 31, 33}

- **Inhibidores suicidas:** son poco reactivos, pero al unirse al centro activo provocan un cambio catalítico que inactiva la enzima. Su actividad como antibiótico es escasa, pero son potentes inhibidores.^{28, 32, 33}

2.1.7. Mecanismo de inhibición

Los inhibidores de betalactamasas para ser eficaces deben atravesar los canales porínicos y alcanzar el espacio periplásmico en los bacilos gram negativos a concentraciones adecuadas lográndose la inactivación de las betalactamasas, hecho imprescindible para que el betalactámico así protegido llegue a la PBP diana. Inicialmente los inhibidores de las

betalactamasas actúan por inhibición competitiva por analogía al sustrato de la enzima, que es seguida de una reacción química más lenta tras la unión al centro catalítico, que da lugar a una inactivación transitoria o permanente de la enzima (inhibición no competitiva).^{24, 33}

2.1.8. Detección de BLEE en el laboratorio de Microbiología

Se han desarrollado diversas pruebas fenotípicas mediante las cuales se puede detectar la presencia de una BLEE. La mayoría se basan en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico²⁷.

En el año 1998, el NCCLS recomendaba el método de difusión y el método de aplicación al estudio de sinergia entre ácido clavulánico (10ug) más cefotaxima y/o ceftazidima a una distancia de 20 mm descrito por Jarlier. Si la bacteria en estudio resulta productora de BLEE, el halo de inhibición aumenta de tamaño en la zona de interconexión entre el disco de ácido clavulánico y el disco de cefalosporina.^{27, 34, 42}

La detección de BLEE en el laboratorio no es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica y eso depende de la cantidad de enzima que produce la bacteria y la presencia o no de mecanismos de resistencia, su detección depende de la capacidad de hidrolizar a las cefalosporinas de 3G, 4G y a los monobatámicos, disminuyendo la sensibilidad de las bacterias.^{18, 28}

El examen de difusión de disco, la prueba E-test y la prueba de extrapolación de MIC (concentración inhibitoria mínima), se usan con diversos criterios y pruebas con diferentes niveles de sensibilidad y especificidad. También podemos mencionar que existen sistemas automáticos como Phoenix, Vitek y, entre otros. Desde 1999 la CLSI estableció criterios para la detección de BLEE, combinando las pruebas de difusión en disco y las de MIC. La CLSI es un comité regulador que recomienda cinco antibióticos (aztreonam, cefotaxima, cefpodoxima,

ceftazidima y ceftriaxona) para la prueba su detección, con diámetros de zonas de inhibición mucho más altos que los utilizados en forma rutinaria en los laboratorios.^{12,17, 32}

Son sospechosas de BLEE positivo cuando hay una MIC 2 µg/ml y la identificación definitiva es determinada por el método de difusión en doble disco o CIM, usando cefalosporinas de 3G (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima) con y sin ácido clavulánico. La adición del ácido clavulánico a uno de los discos de cefalosporinas que resulte un halo igual o mayor a 5 mm o en una inhibición de 3 µg/ml de MIC.^{18, 30}

2.1.9. Métodos para la detección de las Betalactamasas.

Técnica de Antibiograma. El estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos se realiza por técnica de dilución o difusión, en las técnicas de dilución se obtiene resultados cuantitativos (MIC) y la técnica de difusión nos proporciona resultados cualitativos (sensible, intermedio, resistente). El estudio de sensibilidad antimicrobiana tiene como objetivo guiar a los clínicos en la elección del mejor tratamiento y ver la evolución de la resistencia bacteriana con la finalidad de evaluar el espectro del antibacteriano.^{34, 35}

Los métodos fenotípicos que determinan la MIC usando medio sólido (agar), o medio líquido (caldo) para disolver las diferentes concentraciones del antibacteriano, para realizar el antibiograma se utiliza el medio estandarizado agar Mueller Hinton, en la prueba en medio líquido consiste en preparar una serie de tubos con un caldo adecuado, al que se agrega concentraciones crecientes de un determinado antibiótico³⁵. Posteriormente, se siembra con una suspensión calibrada del microorganismo a estudiar, se incuba a 35 +/- 2°C por 18 a 24 horas, donde se controla la aparición de turbidez, la MIC es la dilución más baja del antimicrobiano en la que no se observa crecimiento bacteriano. Los sistemas automatizados comerciales adoptan un sistema de dilución en

caldo que suele realizarse en micro método (micro dilución), en paneles multipocillos para determinar la sensibilidad antibacteriana y la lectura de los valores de MIC y la interpretación de los resultados obtenidos.^{38, 39}

2.1.10. Determinación de la sensibilidad por el método de difusión en disco según la O.M.S.

Las pruebas de sensibilidad son de tipo cuantitativas indicadas para cualquier microorganismo, por lo cual se evalúa la capacidad de un antimicrobiano para inhibir el crecimiento in vivo de una cepa bacteriana, ayudando al clínico a orientar el tratamiento terapéutico.⁴⁰ Se considera que el medio para realizar las pruebas de sensibilidad es el agar Mueller Hinton ya que contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina; siendo adecuado para el desarrollo de la mayoría de gérmenes patógenos.^{35, 40}

La selección de los agentes microbianos apropiados para el test de difusión, es una decisión de cada laboratorio, la sensibilidad del microorganismo se manifiesta por el tamaño de la zona o halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco. Se mide el diámetro del halo de inhibición, cuyo tamaño depende no sólo de la sensibilidad de la cepa bacteriana al antimicrobiano sino de la carga del disco, la temperatura, el medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano.^{12, 35, 36}

Medio de cultivo. El medio de elección es el agar Mueller Hinton ajustado con cationes, el cual contiene 10 – 12 mg de magnesio, 20 – 25 mg de Calcio y debido a que no presenta inhibidores es apto para cualquier microorganismo. Se prepara el medio disolviendo 37 g de Mueller Hinton en polvo con un litro de agua destilada con un pH 7.2 – 7.4, se deja hervir hasta disolver por completo, luego se esteriliza en autoclave. Posteriormente se coloca en placas Petri con un espesor de 4mm del medio, dejar enfriar y conservar en refrigeración de 4 – 8 °C.^{34, 35, 36}

Preparación del inóculo. Se seleccionan de 3 a 5 colonias bien aisladas de igual tipo de morfología, a partir de la placa de cultivo. Se prepara una suspensión en 4 – 5 ml de solución caldo apropiado como soya tripticasa o solución salina isotónica, se toca la colonia por arriba con un asa estéril, se alcanza la turbidez del estándar de 0.5 McFarland, esto resulta una suspensión que contiene aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ml.^{36, 37, 38}

Para *E. coli* se utiliza la cepa de control negativo ATCC 25922. Para *Klebsiella spp.* Cepa ATCC 700603 para el control positivo. El ajuste de la densidad del inóculo se puede realizar utilizando equipos fotométricos o por comparación visual contra el estándar.^{12, 36, 37, 38}

Inoculación de las placas. En un lapso de tiempo de 15 minutos luego de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, con un hisopo estéril se sumerge en ella, el hisopo debe ser presionada varias veces contra la pared del tubo para remover el exceso de inóculo, se inocula la superficie de una placa de agar Mueller Hinton por el método de estría (estera) Se debe dejar abierta la tapa de la caja de agar durante 3 a 5 minutos no exceder más de 15 minutos y luego aplicar los discos.^{37, 38}

Aplicación de los discos a las placas inoculadas. Los discos se dispensan sobre la superficie del agar para ellos se utiliza una pinza estéril o un dispensador automático, deben ser ligeramente presionados para asegurar el contacto con la superficie del agar, deben ser distribuidos a 24 mm de distancia entre ellos. No dispensar más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 5 discos por placa de 100mm. Algunas drogas difunden casi al instante, un disco no debe ser reubicado una vez que haya tocado la superficie del agar. Las placas son invertidas y colocadas en una incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 18 – 24 horas.^{37, 38}

Lectura de las placas inoculadas. Luego de 18 – 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de incubar, las placas son examinadas el crecimiento debe ser

homogéneo, si aparece colonias aisladas, la prueba debe ser repetida. Se mide el diámetro de la zona o halos de inhibición, las placas Petri deben de colocarse en un fondo oscuro con una luz que ilumine.³⁷

Interpretación de los resultados de la prueba. Existen tablas específicas NCCLS, que indican los criterios a interpretar los diámetros de los halos de inhibición. Las categorías para interpretar son:

- **Sensible:** indica que la cepa puede ser tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para este tipo de infección.
- **Intermedio:** incluye aislamiento con agentes antimicrobianos con un MIC (concentración mínima inhibitoria) promedio lo cual va llevar a una velocidad de respuesta más lenta que la de los aislamientos susceptibles.⁵⁸
- **Resistente:** las cepas resistentes no son inhibidas, y es altamente probable que no responda a cualquier dosis empleada.^{37, 38}. Figura N° 02

Cuando se usan los nuevos criterios de interpretación, la prueba de rutina de BLEE no es necesario antes de reportar el resultado. **“no es necesario editar los resultados para resultados de penicilina, cefalosporinas o aztreonam de susceptible a resistible”** Sin embargo hasta que el laboratorio implemente los nuevos criterios, la prueba de BLEE puede ser realizada como recomienda CLSI.⁷⁷

2.1.11. Métodos fenotípicos para la identificación de BLEE.

Los organismos que producen BLEE tienen importantes implicaciones clínicas debido a su resistencia a los antibióticos que incluyen: cefalosporinas de tercera generación, penicilinas de espectro extendido y monobactámicos. Las tasas de susceptibilidad son variables para fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cefalosporinas de cuarta generación. Los carbapenémicos son los únicos antibióticos activos contra BLEE en la

actualidad. Desafortunadamente, la utilización de carbapenémicos ha incrementado en un 67% la aparición de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. Las enzimas de clase A, en especial las series TEM, SHV y CTX se expresan en forma predominante en *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, confiriéndoles niveles de resistencia contra la mayoría de antibióticos usados.^{21, 26} Son de especial interés por su presencia mayoritaria en clínicas y hospitales, principalmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI).^{33, 51}

Prueba tamizaje BLEE recomendada por CLSI

La prueba tamizaje y las pruebas confirmatorias para la detección de BLEE está recomendada para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* y cuando no se han implementado los nuevos criterios de interpretación.^{52, 65} Figura N° 03

2.1.11.1 E-test (Épsilon - Test)

Utiliza tiras de plástico no poroso de 5 cm de largo y 5 mm de ancho en lugar de discos, la tira que contienen concentraciones de antimicrobiano en gradiente que permite determinar la MIC al antimicrobiano en estudio.^{8, 30} Para ello, se prepara un inóculo al 0.5 de la escala de McFarland en una placa previamente inoculada, luego se procede a colocar las tiras E-test que contienen la combinación de CAZ y CAZ/ácido clavulánico con rangos de CIM de 32 - 0,50 µg/ml y de 4 - 0,064 µg/ml, respectivamente. También se utiliza la tira de CTX y CTX/ácido clavulánico con rango de MIC de 16-0,25µg/ml y 1-0,016 mg/m, posteriormente incubar.^{31, 36, 37}

La MIC se determina en el punto en que la elipse de inhibición intercepta la escala de la tira. Para confirmar la producción de BLEE se obtiene la razón de dividir la MIC del antimicrobiano solo (sin inhibidor) para la MIC del antimicrobiano con ácido clavulánico. Si esta razón es igual a 8 o más, se confirma la producción de BLEE.^{39, 52}

2.1.11.2. SISTEMAS AUTOMATIZADOS (Vitek[®], MicroScan[®], Phoenix[®])

Son equipos que manejan información demográfica de los pacientes y permiten realizar informes epidemiológicos de gran riqueza, brindando información cuantitativa o semicuantitativa (concentraciones indicadoras) dependiendo de la configuración antibiótica del dispositivo y organismo, estos sistemas automáticos responden perfectamente a las necesidades de la bacteriología actual, apoyando a automatización y aportan mayor seguridad, suprimiendo las manipulaciones repetidas y la rapidez de respuestas permitiendo obtener resultados más fiables.^{39, 40}

Utilizan una determinación turbidimétrica de la rapidez de crecimiento del microorganismo en presencia de agentes antimicrobianos para obtener un análisis de regresión lineal y posteriormente determinar un algoritmo derivado de la MIC (concentración inhibitoria mínima)^{40, 41}

El procedimiento se empieza por recepción de la muestra biológica, dependiendo del tipo de muestra se siembra en placas de agar, luego son incubadas por 18 - 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.¹⁰ Luego se observa el crecimiento de colonias en las placas anteriormente sembradas, se seleccionan las colonias a investigar haciendo una dilución a 0.5 de la escala de McFarland en caldo con las cuales se procede a la inoculación en tarjetas de identificación bioquímica y de susceptibilidad.¹² Ambas tarjetas son ingresadas al equipo computarizado para iniciar el análisis, el cual automáticamente realiza lecturas de las muestras, indicando los resultados finales.³¹

2.1.11.3. Método de tamizaje para detección de β -lactamasas de espectro extendido según CLSI.

Método de disco difusión en agar Mueller Hinton mediante la técnica de Kirby-Baüer, se determinan las MIC de los discos de susceptibilidad antimicrobiana de ATM (30 μ g), CTX (30 μ g), CAZ (30 μ g) y CRO (30 μ g); se utilizó como criterios de sospecha los diámetros: ATM \leq 27 mm; CTX \leq 27 mm; CAZ \leq 22 mm; y CRO \leq 25 mm.^{27, 30} Se considera sospechoso de BLEE que presentan una disminución de la MIC igual o mayor a 3 concentraciones al doble para cefotaxima y/o ceftazidima en combinación con ácido clavulánico con respecto a la MIC del antibiótico solo.^{31, 53}

2.1.11.4. Método confirmatorio de disco combinado (CLSI)

En este método las placas de agar Mueller Hinton son inoculadas con las aislamientos de colonias sospechosas, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, colocándose discos de susceptibilidad antimicrobiana de CAZ (30 μ g), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) (30/10 μ g), CTX (30 μ g), cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CXT-CLA) (30/10 μ g).^{27, 31} Una diferencia mayor o igual a 5 mm en los halos de inhibición entre los discos de CAZ-CLA y CAZ solos o CXT-CLA y CTX, es interpretada como resultado positivo.^{51, 53} Figura N° 04

La prueba de disco combinado se observa la diferencia de halos de inhibición entre los discos Cefotaxima (12mm) y Cefotaxima/ácido clavulánico (29mm) y Ceftazidima (18mm) y Ceftazidima/ácido clavulánico (26mm). Se considera BLEE positivo cuando existe la diferencia igual o mayor 5mm

2.1.11.5. Método de Jarlier

Para realizar este método, se debe inocular una placa de Mueller Hinton con la cepa sospechosa, con una turbidez similar a la suspensión de 0.5 de la escala de McFarland, se coloca un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10 µg) en el centro de una placa de Petri con agar Mueller Hinton y a una distancia de 20 mm de distancia, discos de ceftazidima (CAZ 30 µg/dL), cefotaxima (CTX 30 µg), incubar por un tiempo de 18 – 24 horas a 35 – 37°C, posteriormente se realizó la lectura.^{8,37} La presencia de BLEE se manifiesta por el efecto de sinergia del inhibidor y los discos de cefalosporina. Este fenómeno es llamado “efecto de huevo”, “cola de pez” o “balón de futbol americano”.^{39, 42, 43} Figura N° 05

2.1.11.6. Método de Hodge para la determinación de BLEE.

En este método inicialmente se realiza una suspensión de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, esta cepa es utilizada como siembra base de la placa por su característica de ser sensible a cefalosporinas y carbapenémicos con turbidez a 0,5 de la escala de Mac Farland, esta suspensión se inocula en una placa de agar Mueller Hinton.^{8, 39} Colocar en una placa al centro el disco (CTX, CRO, ATM, FEP, CAZ), usando una placa por cada disco. Con un asa de 10ul sembrar en línea hacia el antimicrobiano las cepas en estudio y las cepas controles, desde el centro hacia afuera del disco luego incubar a 35 +/- 2 °C por 18 – 24 horas.^{8, 39} El resultado positivo se observa la formación de una punta de flecha por el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en la inserción entre en el halo de inhibición y la estría de la cepa productora de BLEE.^{43, 44, 52} Figura N° 06

2.1.12. Infecciones de Tracto Urinario

La orina normal es estéril, su recolección se hace en forma aséptica, se acepta la presencia de 10^5 bacilos y 10^4 leucocitos /ml, la mayoría de los gérmenes que producen infección del tracto urinario (ITU) son enterobacterias, los más frecuentes son la *Escherichia coli*.^{45, 47}

Las infecciones de tracto urinario constituyen la segunda causa de infección de origen comunitario y es la primera en el ámbito hospitalario. El género femenino padecen de ITU con mucha más frecuencia que el género masculino, se estima que un 20% de las mismas padecerá a lo largo de su vida, siendo con más frecuencia en el embarazo y en pacientes diabéticos la frecuencia aumenta de 2 – 3 veces más.^{6, 45, 46}

En mujeres pre menopáusicas se relaciona con la actividad sexual, el uso de diafragmas, espermicidas y los antecedentes de acontecimientos anteriores.³¹ En las pacientes menopáusicas los cambios fisiológicos y anatómicos junto con factores de riesgo (sondaje vesical, diabetes mellitus, antecedente de ITU) implican al aumento de los eventos.^{45,}

El término ITU engloba varias formas clínicas de presentación en relación con su localización anatómica, que podemos resumir en: cistitis, ITU complicada, pielonefritis aguda, prostatitis, entre otros.⁵⁵

Cistitis: es una forma de infección urinaria de la vías bajas, sintomática, se dice que toda mujer tendrá cistitis al menos una vez en su vida. El cuadro clínico que presenta con disuria, tenesmo vesical y polaquiuria. A este conjunto de síntomas también se le denomina síndrome miccional. En ocasiones se acompaña de dolor suprapúbico y hematuria.³¹ En mujeres y fundamentalmente en ancianos es frecuente la incontinencia urinaria asociada. Es importante recordar que alrededor del 30% de los pacientes con clínica de cistitis padecen infección silente del parénquima renal.⁴⁶

Hay un caso particular que se conoce como la “cistitis de luna de miel” se presenta en mujeres de recién casadas, dada la pasión de esos días y la frecuencia sexual elevada, la uretra y la vejiga se ven traumatizadas y generan síntomas muy parecidos al de una infección urinaria sin realmente existir.⁵⁵

Infección del Tracto Urinario Complicada: aquellas que se presentan sobre tractos urinarios con alteraciones anatómicas o funcionales, en individuos con anomalías metabólicas, inmunodepresión o participación de patógenos inusuales o resistentes. Las infecciones urinarias en los niños, en los varones y en las embarazadas también se deben considerar como complicadas.^{47,48}

Pielonefritis Aguda: durante el embarazo es una enfermedad grave que puede progresar a sepsis y parto prematuro, es la infección del parénquima renal con presencia de bacteriuria acompañada de signos y síntomas como fiebre, escalofríos, dolor de los flancos, vómitos, náuseas.⁴⁶ En el recién nacido y en el anciano los síntomas no son tan característicos y el motivo de consulta puede ser deterioro del estado general, confusión, síntomas abdominales, respiratorios o descompensación de una diabetes.⁴⁸

Se presenta cerca del 2% en las mujeres embarazadas y el 23% tendrá recurrencia.⁴⁹

Prostatitis: comprende un amplio espectro de síntomas inespecíficos del tracto genitourinario inferior caracterizado por el dolor y perineal, suele acompañarse de cierto grado de disfunción sexual, disuria o polaquiuria.⁵⁴ La prostatitis constituye la infección urinaria parenquimatosa as habitual en el varón entre la segunda y cuarta década de la vida. En varones jóvenes con clínica de cistitis sin factores de riesgo ni antecedentes de manipulación urológica debemos descartar prostatitis.^{46, 56}

2.1.12.1. Diagnostico

La sospecha de ITU se basa fundamentalmente en la historia clínica y la exploración física para un diagnóstico y tratamiento precoces para reducir la probabilidad de daño renal, pero en determinadas circunstancias está indicado realizar estudios analíticos, microbiológico (examen completo de orina, urocultivo) y pruebas de imagen.⁵⁷

Examen microscópico de la orina. Es una práctica de mucha utilidad a pesar de su sencillez y su escasa complejidad, para poder efectuar un análisis representativo, es necesario tener en cuenta varios aspectos como: la muestra debe ser recolectada por micción espontánea con la técnica de chorro intermedio, cateterismo vesical o punción percutánea supra púlica de la vejiga en un recipiente estéril y se examina dentro de los 45 minutos de ser emitida, luego de ser centrifugada la muestra se procede a observar en el microscopio.³¹

Podemos sospechar de la existencia de ITU pero no es diagnóstico por sí solo. La presencia de leucocitos en la orina centrifugada debe ser igual o mayor a 10 leucocitos/mm³, nos indica la presencia de inflamación a nivel del tracto urinario, pero también la podemos encontrar leucocitos por contaminación de la muestra o en pacientes con nefritis intersticiales.⁴⁵ Por otro lado hay que reseñar que entre el 30 y el 52% de la población anciana puede presentar bacteriuria sin piuria.^{46, 47}

Urocultivo. Tiene un valor predictivo positivo del 88%, una sensibilidad de 95% usando un conteo de 100 colonias de bacterias/ml, se realiza el diagnóstico correcto por la historia y la clínica en un 80% de los casos.⁴⁵

El urocultivo es una prueba para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática en pacientes con riesgo de

infección permitiendo el aislamiento y el recuento cuantitativo desde 10.000 a 100.000 UFC/ml sembrado con un asa calibrada de 1ul, en agar sangre o McConkey, en la lectura de los resultados se deberá informar el número de colonias, el nombre del microorganismo y el antibiograma, en caso de aislar más de dos gérmenes patógenos se debe informar “Cultivo mixto” y solicitar nueva muestra por posible contaminación.⁴⁷

Las pruebas de imágenes (urografía intravenosa o ecografía renal). Están indicadas en todas las ITU en varones, en las mujeres con infección urinaria recidivante o con sospecha de patología urológica con síntomas de dificultad en la micción, dolor cólico, incontinencia, hematuria.^{47, 50}

2.1.12.2. Etiología

La uretra distal está formada por flora bacteriana como estreptococos no hemolíticos, estafilococos coagulasa negativo, Lactobacillus, difteroides (*Corynebacterium sp*) y bacterias anaerobias. La orina es un excelente medio de crecimiento para muchos microorganismos, las ITU con frecuencia son ocasionadas por un grupo limitado de microorganismos patógenos.⁴⁸ Más del 90% de las ITU están causadas por una única especie bacteriana. *Escherichia coli* causa entre el 75-95 % de los episodios de cistitis aguda no complicada, las restantes son producidas por *Klebsiella sp*, *proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, enterococos.^{41, 59}

Los microorganismos que se aíslan de orina van a variar según las circunstancias del paciente y sus enfermedades de base. La etiología de las ITU se ve modificada por factores como la edad, la obstrucción del tracto urinario, las lesiones de médula espinal la diabetes, y la cateterización urinaria.⁴⁵ Los microorganismos causales de las ITU asociadas a sondaje vesical proceden de la flora fecal endógena del propio paciente, modificada por la presión selectiva antibiótica.^{47, 48, 59}

2.2. Antecedentes

2.2.1. Antecedentes Internacionales

Mena et al. (2009) determinaron la producción de BLEE a 3883 cepas de *Enterobacteriaceae* aisladas en cultivos en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo del Hospital Universitario de Maracaibo, durante el periodo enero 2006 - diciembre 2007, las enterobacterias distribuidas en 14 especies diferentes. Para la detección de BLEE se utilizó como método preliminar el de Kirby-Bauer, siguiendo las normas del CLSI; se adicionaron exámenes confirmatorios como el método del disco combinado, método de E-Test ESBL y sinergia del doble disco. Del total de enterobacterias estudiadas 951 (24,49%) fueron productoras de BLEE. 26/60 *K. oxytoca* (43,33%), 389/970 *K. pneumoniae* (40,10%), y 141/447 *E. cloacae* (31,54%), 324/1761 *E. coli* (18,34%), 19/277 *P. mirabilis* (6,86%) 15/158 *M. morganni* (9,49%), fueron los microorganismos con mayor producción de BLEE. No se detectó producción de BLEE en cepas de *P. penneri* y *C. koseri*.⁵⁹

Tsering et al. (2009) durante el período comprendido entre junio de 2007 y de 2008, se recogieron 1489 muestras de pacientes con sospecha de infección nosocomial, identificaron los aislamientos basados en la morfología de la colonia y la reacción bioquímica. En bacilos Gram negativo bacilos resistentes a las cefalosporinas de tercera generación se determinó el BLEE mediante la prueba de sinergia de doble disco (DDST-una prueba de detección) y la prueba de confirmación luego fenotípica. Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se realizaron por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer modificado. De la muestra de 238 bacilos Gram negativos, aislamos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* y *Enterobacter cloacae*. Después de los dos métodos, el 34% eran aislamientos BLEE positivo. Las cepas productoras de BLEE fueron significativamente resistentes ($p < 0,01$) a la ampicilina, piperacilina, piperacilina / tazobactam, trimetoprim / sulfametoxazol,

tetraciclina, ciprofloxacina y gentamicina en comparación a los productores no de BLEE. La multirresistencia fue significativamente ($p < 0,01$) más alto (69,14%) en aislamientos positivos BLEE que aislados no BLEE (21,66%). Demostraron alta prevalencia de BLEE en nuestro hospital, los productores de ESBL se pueden detectar mediante DDST y prueba de confirmación fenotípica con igual eficacia. La sensibilidad de la prueba de detección mejorada con el uso de más de un antibiótico y la adición de uno o dos antibióticos no aumentaría coste y mano de obra.⁶⁰

Zykov et al. (2015) evaluaron la actividad antimicrobiana de mecilinam, nitrofurantoína, temocillin y fosfomicina, así como para llevar a cabo un análisis comparativo de los patrones de resistencia en una colección nacional de ESBL por *E. coli*. La colección nacional fue de 105 aislados clínicos de BLEE, los cuales se analizaron para producción de resistencias de la Organización Noruega para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (NORM) durante 2010-2011. La detección e identificación de ESBL genes -Encoding se realizaron por PCR y secuenciación para la confirmación de ESBL variantes de blaTEM y blaSHV (2.010) o microarray (2011). Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) o correlatos MIC se determinaron mediante pruebas de gradiente micrófono o VITEK 2, respectivamente. Se realizó un análisis comparativo de los patrones de resistencia. Todos los aislamientos fueron sensibles a fosfomicina, temocillin (tracto urinario punto de interrupción) y meropenem. Para mecilinam y nitrofurantoína, 6% y 9% de los aislamientos, respectivamente, fueron no susceptibles. Un alto nivel de susceptibilidad también se observó para amikacina (95%). En contraste, las proporciones no susceptibilidad a la ampicilina (100%), cefotaxima (97%), ceftazidima (77%), aztreonam (87%), gentamicina (42%), tobramicina (52%), ciprofloxacina (76%) y trimetoprim-sulfametoxazol (71%) fueron mayores. En general, la sensibilidad *in vitro* a la nitrofurantoína, fosfomicina, mecilinam y temocillin fue alta, lo que indica que estos fármacos son buenas opciones para el tratamiento no complicadas del tracto urinario infecciones causadas por *E. coli* BLEE positivo.⁶¹

Pistiki et al. (2015) evaluaron la actividad de los antimicrobianos más antiguos, como cefprozil y cefixima contra una reciente amplia colección de enterobacterias de orina de 2012 y 2013. Las concentraciones inhibitorias mínimas y las concentraciones bactericidas mínimas de cefprozil, cefixima y ciprofloxacina se determinaron contra 293 *Escherichia coli* (40 BLEE productores), 54 *Klebsiella pneumoniae* (10 BLEE productores) y 53 *Proteus mirabilis* aislamientos. Los resultados indican que Cefprozil fue más activo que la ciprofloxacina contra no BLEE -producir *E. coli* (93,7% vs 80,2%, $p < 0,0001$); esto no fue el caso para la cefixima (85,7% frente a 80,2%, $p: 0,125$). En general, cefprozil y cefixima inhibieron el 80-90% de los aislados ciprofloxacina resistente de todas las especies estudiadas. Sin embargo, eran activos contra menos de 20% de ESBL aislamientos -producir. Los resultados sugieren que cefprozil y cefixima siguen siendo una buena alternativa terapéutica contra enterobacterias orina en particular en caso de patógenos ciprofloxacino resistentes. Su actividad contra BLEE patógenos -producir es limitada.⁶²

Wu et al. (2015) determinaron la tasa de prevalencia, distribución bacteriana, y la susceptibilidad antimicrobiana de infección urinaria en niños pequeños febriles en un hospital universitario en el norte de Taiwán. Desde enero de 2011 a diciembre de 2011, todas las muestras de urocultivo aislados de casos sospechosos de infección urinaria en niños pequeños febriles de edades comprendidas desde 1 día hasta 36 meses que visitan la Sala de Emergencia Pediátrica del Hospital Chang Gung Children, Taoyuan, Taiwán fueron identificados por métodos convencionales. La susceptibilidad a los antibióticos se determinó según el Clinical and Laboratory Standards Institute. Un total de 5.470 (78%) a partir de 7009 los niños elegibles se inscribieron en el estudio, y 619 (11,3%) tenían un diagnóstico de infección urinaria. La bacteria más frecuente fue *Escherichia coli* (68%) seguido de *Klebsiella pneumoniae* (8,1%) y *Proteus mirabilis* (6,8%). La ampicilina, piperacilina y trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX) mostró una tasa mayor resistencia en las tres bacterias predominantes. Todas las bacterias

probadas mostraron una mayor resistencia a la ampicilina (79,3%) y TMP-SMX (44,1%), y menor resistencia a la cefazolina (17,7%) y gentamicina (13,0%). El catorce por ciento de los aislamientos produjo espectro extendido β -lactamasas (BLEE), entre los cuales 93.33% fueron aislados de E. coli. La prevalencia general de infección urinaria en este estudio fue mayor que la reportada previamente en niños febriles. Resistencia a los antimicrobianos Superior fue encontrada en la ampicilina y TMP-SMX. Entre los antibióticos de uso común, cefazolina y gentamicina se recomiendan para tratar la infección del tracto urinario en niños febriles de < 3 años sin signos de localización.⁶³

Pilmis et al. (2015) Evaluaron la incidencia de enterobacterias que producen betalactamasa de espectro extendido relacionado en receptores de trasplante renal, e identificar los factores asociados con infección BLEE y factores de riesgo de recidiva. Se incluyeron todos los receptores de trasplante renal ingresados en nuestro hospital entre enero de 2009 y enero de 2012 que tenía enterobacterias productoras de BLEE en UTI o bacteriuria. Durante el período de estudio, 659 pacientes fueron sometidos a trasplante de riñón; 72 pacientes tenían BLEE bacteriuria - PE, lo que representa una prevalencia del 10,9%, y entre los segundos 34 (47,2%) presentaron enterobacterias que producen BLEE relacionados con ITU. Catorce pacientes (41,2%) experimentaron una recaída de UTI asociado con dos factores: edad avanzada ($p = 0,032$) y persistente bacteriuria 48 h después de la terapia antibiótica apropiada ($p = 0,04$). En esta población específica, en relación con el riesgo de recaída que existe una necesidad urgente de estudios prospectivos para probar la mejor estrategia de tratamiento.⁶⁴

2.2.2. Antecedentes Nacionales

Lezameta et al. (2010) Compararon la eficacia de cuatro métodos fenotípicos para la identificación de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de urocultivo positivos entre los meses de enero y febrero de 2009 en el Instituto Nacional de Salud del Niño. Realizaron un estudio comparativo de corte transversal; se analizó un total de 147. 130 cepas de *E. coli* (88.4%), 11 de *K. pneumoniae* (7,5%) y 6 de *P. mirabilis* (7,1%) las cuales fueron sometidas a una prueba de tamizaje, en aquellas que resultaron positivas se realizaron pruebas confirmatorias mediante los cuatro métodos fenotípicos evaluados. De las 147 cepas, 43 (29,3%) resultaron sospechosas en las pruebas de tamizaje. Con el método descrito por CLSI usado como “patrón de oro” para el estudio, resultaron 27 positivas (62,8%) fueron confirmadas para la producción de BLEE. Con resultado similar a lo encontrado con el método de Jarlier con una sensibilidad y especificidad del 100%, Por otro lado con los métodos de Hodge y el tridimensional de las 43 cepas estudiadas, 23 (53,5%) resultaron positivas para BLEE, con lo que se calculó una sensibilidad de 85.1% y una especificidad del 100%. Concluyen que los métodos evaluados mostraron en todos los casos una alta eficacia, sin presentar diferencias significativas, por lo que podrían utilizarse según las facilidades del laboratorio clínico involucrado; sin embargo dada las ventajas no técnicas, como facilidad, factibilidad de su aplicación y costos, se recomienda el empleo del método de Jarlier.⁸

Rivera-Jacinto et al. (2010) Identificaron enterobacterias en reservorios intrahospitalarios, y evaluaron su sensibilidad a betalactámicos y su capacidad de producir BLEE, en el Hospital Regional de Cajamarca. Obtuvieron muestras mediante hisopado de mesas, grifos, camas, lavatorios, y tablillas de historia clínica en las áreas de pediatría y cirugía; se aislaron e identificaron 45 cultivos de enterobacterias de importancia clínica: 14 *Enterobacter cloacae*, 11 *Escherichia coli*, 5 *Citrobacter freundii*, 4 *Klebsiella pneumoniae* y 11 de otros géneros. En veinte

muestras no se obtuvo crecimiento. Se determinó la sensibilidad antimicrobiana a los antibióticos betalactámicos: Cefotaxima, ampicilina, cefoxitina, cefalotina, ceftriaxona, ceftazidima, amoxicilina-clavulanato, aztreonam e imipenem. Teniendo en cuenta los diámetros críticos de tamizaje, se realizó el test confirmatorio para BLEE. De los 45 cultivos aislados 34 fueron resistentes a ampicilina, 34 a cefalotina, 14 a cefoxitina, 12 a cefotaxima, 11 a ceftriaxona, 5 a ceftazidima, 19 a amoxicilina-clavulanato y 15 a aztreonam. Doce cultivos presentaron resistencia por BLEE a cefalosporinas de tercera generación y/o monobactámicos, cuatro *E. coli* y cuatro *E. cloacae* fueron los más relevantes. Todos fueron sensibles a imipenem. Dada la capacidad de algunos de estos cultivos de producir BLEE existe el riesgo de brotes intrahospitalarios que pueden complicarse cuando son originados por microorganismos multirresistentes. La aparición de cepas resistentes contribuye a los mayores problemas en los hospitales de todo el mundo dificultando el tratamiento de las enfermedades infecciosas.²⁹

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño del Estudio:

Estudio comparativo de corte transversal, prospectivo y descriptivo

3.2. Población:

Estuvo constituido por 691 aislamientos de Enterobacterias en muestras de urocultivo positivos proveniente del laboratorio de Microbiología del Hospital Docente Madre Niño “San Bartolomé” (HONADOMANI SB), ubicado en el distrito de Cercado de Lima, Ciudad de Lima, Departamento de Lima, Perú. Las muestras fueron recolectadas de diciembre 2014 a noviembre 2015.

3.2.1. Criterios de Inclusión:

- Aislamientos de Enterobacterias de urocultivo positivos.
- Muestras adecuadamente conservadas, libres de contaminación, con un tiempo menor de 2 horas
- Muestras de urocultivo ingresados al área de microbiología del periodo diciembre 2014 a noviembre 2015

3.2.2. Criterios de Exclusión:

- Urocultivo de pacientes no provenientes del servicio de microbiología.
- Aislamientos de cocos Gram positivos
- Aislamientos de cocos Gram negativos
- Bacilos Gram negativos no fermentador

3.3. Muestra:

El tamaño muestral para el periodo de estudio fue de 246 aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE y no productoras de BLEE derivados del Servicio de Microbiología del HONADOMANI SB.

3.4. Operacionalización de Variables

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala de Medición	Forma de Registro
Principal: BLEE	Enzima que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas	Halo inhibición: Negativo: < a 5mm, Positivo: ≥ a 5mm.	Cualitativa, nominal, dicotómica.	Positivo Negativo
Secundarias: Sensibilidad	Indica la capacidad de nuestro método para dar como casos positivos los casos que realmente se encuentre la enzima BLEE.	Resultado positivo en enterobacterias que presentan BLEE.	Cuantitativa Continua	Números decimales
Especificidad	Indica el porcentaje de verdaderos negativos o la probabilidad de que la prueba sea negativa si la enzima BLEE no está presente.	Resultado negativo en enterobacterias que no presentan BLEE	Cuantitativa Continua	Números decimales
Valor Predictivo Positivo	Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos	Resultado positivo en enterobacterias que presentan BLEE.	Cuantitativa Continúa.	Números decimales
Valor Predictivo Negativo	Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba	Resultado negativo en enterobacterias que no presentan BLEE	Cuantitativa Continúa.	Números decimales
Concordancia	Capacidad para manifestar la relación que existe entre los dos métodos en la detección de enterobacterias productoras de BLEE	Se compara los resultados que coinciden en ambos métodos	Cuantitativa Continua	Números decimales
Enterobacteria	Bacteria gran negativo que tiene la capacidad de adquirir rápidamente resistencia a los antibióticos	Identificación por batería bioquímica	Discreta	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. mirabilis</i> <i>K. oxytoca</i> <i>C. Koseri</i>
Sexo	Condición orgánica que hace diferencia natural o biológicas de género	Caracteres sexuales secundarios	Cualitativa nominal dicotómica	• Masculino • femenino
Edad	Tiempo de vida de la persona, en años.	Tiempo transcurrido	Cuantitativa Discreta	• Números enteros

3.5. Procedimientos y Técnicas:

La detección de BLEE en los aislamientos se realizó mediante 3 métodos: el método de tamizaje (CLSI), el método disco combinado (CLSI) y el método de disco pre difusión

El procedimiento de los métodos se dividió en tres etapas: pre analítica, analítica y post analítica.

3.5.1. Etapa pre analítica:

Las muestras para el urocultivo se recolectaron en frascos de boca ancha con tapa rosca, estériles, rotulados en el frasco y en la tapa con el nombre del paciente, fecha, hora de obtención de la muestra. Las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente no por más de dos horas, o mantener a 4°C por menos de cuatro horas, evitando la proliferación de las bacterias.³⁸

El material biológico se procedió al sembrado de las muestras en placas de medios de cultivo: Agar Sangre y Agar MacConkey (Merck, Darmstadt, Germany) a temperatura ambiente, con un asa estéril descartable calibrado de 1uL, manteniendo la esterilidad del medio. Se incubó en una estufa a 35 +/- 2°C en condiciones aeróbicas durante 18 - 24 horas.^{37,52} Adicionalmente, se sembraron muestras para el urocultivo en agar CLED, durante el horario nocturno en el área de Emergencia y Bioquímica del HONADOMANI "San Bartolomé".

3.5.2. Etapa analítica:

Se realizó la evaluación a las 24 horas, de no encontrarse el crecimiento bacteriano se dejó incubar hasta las 48 horas, la evaluación consiste en realizar el recuento de colonias, cuyo resultado se multiplica por el factor de dilución para obtener las UFC por ml. Considerándose positivos los cultivos $\geq 100,000$ UFC/ml.⁵³ La identificación de la bacteria de colonias sospechosas, se realizará mediante la coloración Gram y posteriormente

se sembró en una batería bioquímica de identificación Agar TSI (Triple Sugar Iron), Agar Lisina (LIA), Agar Ornitina Indol Movilidad (MIO), Agar Citrato (CITRATO) y Agar Urea (UREA) (todos de Merck, Darmstadt, Germany), dejándose incubar por un tiempo de 18 – 24 horas.³⁶

Se consideró los resultados que den positivos para Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, entre otras).

Las cepas sospechosas fueron procesadas y clasificadas con el sistema automatizado VITEK Compact (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) donde se determinaron las pruebas bioquímicas y el antibiograma para determinar la presencia de cepas productoras de BLEE.³⁵

3.5.2.1. Métodos fenotípicos para la identificación de cepas productoras BLEE

La detección de BLEE por pruebas fenotípicas examinando las dos características principales de las BLEE: sensibilidad disminuida a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam (ATM) e inhibición de la resistencia por ácido clavulánico (CLA).³⁵

Método confirmatorio de disco combinado

Para el antibiograma y determinación de resistencia se utilizó el medio Mueller Hinton donde se inocularon las colonias sospechosas con los siguientes discos de susceptibilidad antimicrobiana (Oxoid, Hampshire, England): Ceftazidima CAZ (30 µg), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) (30/10 µg), CTX (30 µg), cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CXT-CLA) (30/10 µg); de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por el CLSI.⁵² Donde una diferencia ≥ 5 mm en los halos de inhibición entre los discos de CAZ-CLA y CAZ solos o CXT-CLA y CTX, son interpretados como resultado positivo.^{38, 52} Figura N° 04

Método de disco pre difusión

En el método de disco pre difusión se determinaron los halos de inhibición del desarrollo bacteriano obtenido con cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) solos y en combinación con amoxicilina/ácido clavulánico (AMC). Dado que los discos (CTX-CLA) y (CAZ/-CLA) no son de fácil acceso comercial para la realización de la prueba de disco combinado y además, varios laboratorios microbiológicos no suelen contar con los inhibidores, la prueba de disco pre difusión sería una alternativa para el uso en los laboratorio de microbiología.⁸ La prueba de disco pre difusión realizada en este trabajo de investigación fue diseñada en el HONADOMANI “San Bartolomé”, y está basada en la técnica conocida como disco pre difusión tal como se describe a continuación:

En primer lugar, se coloca dos discos de AMC sobre una placa de agar Mueller Hinton (Merck, Darmstadt, Germany) sin inocular y se dejó a temperatura ambiente por un lapso de dos horas. Posteriormente, se retiraron los discos de AMC, luego se inoculo la placa mediante hisopado de una suspensión 0,5 de la escala de McFarland de las colonias aisladas en estudio y se colocaron dos discos de cefotaxima (CTX), y ceftazidima (CAZ), en los mismos lugares donde habían estado los discos de AMC y en otro lugar diferente los dos discos de cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ) en forma paralela a los discos anteriores.⁹ Pasos para realizar el método disco pre difusión. Figura N° 07

Las placas se incuban en estufa a entre 35 - 37 °C durante 18 - 24 horas posteriormente se midieron los halos de inhibición correspondientes. Se consideró un resultado positivo en este ensayo a la diferencia de ≥ 5 mm entre el halo de inhibición del cefotaxima mas inhibidor (CTX/AMC) respecto del halo de cefotaxima (CTX) y Una diferencia de ≥ 5 mm entre el halo de inhibición del ceftazidima mas inhibidor (CAZ/AMC) respecto del halo de ceftazidima (CAZ).³⁷ Figura N° 08

3.5.3. Etapa post analítica:

Los resultados para la identificación de BLEE en las cepas sospechosas analizados bajo Método de disco pre difusión frente al método confirmatorio de disco combinado se reportaron en el libro de reportes del servicio, en la hoja de cálculo de MS-Excel 2010 para Windows (Redmond, USA). Los resultados fueron entregados a los pacientes en los tiempos estipulados.

3.5.4. Control de Calidad:

Para asegurar la calidad de los resultados, se consideraron todos los requerimientos necesarios en la preparación del agar Mueller Hinton (Merck, Darmstadt, Germany). Asimismo, para la validación de los métodos fenotípicos para la identificación de cepas productoras BLEE se utilizaron cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) de *E. coli* 25922 como control negativo, *K. pneumoniae* 700603 control positivo (Manassas, VA, USA) y *Enterococcus faecalis* 29212 para la detección de niveles adecuados de timinia/timidina en agar Mueller Hinton probando SXT³⁸

3.6. Plan de Análisis de Datos:

El análisis de datos se realizaron en tres procesos básicos: codificación, tabulación y construcción de tablas y gráficos. Dentro de la matriz de codificación en MS-Excel se describieron las diferencias entre los halos de inhibición de los discos de ambos métodos (≥ 5 mm) para determinar las cepas productoras de BLEE.⁵²

El análisis estadístico se realizó en IBM SPSS versión 21 (Armonk, USA) donde se utilizó estadística inferencial. Se utilizó la prueba de kappa de Cohen interprueba, la prueba diagnóstica con los intervalos de confianza al 95%.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS ESTADÍSTICOS

4.1. Resultados

TABLA N° 01

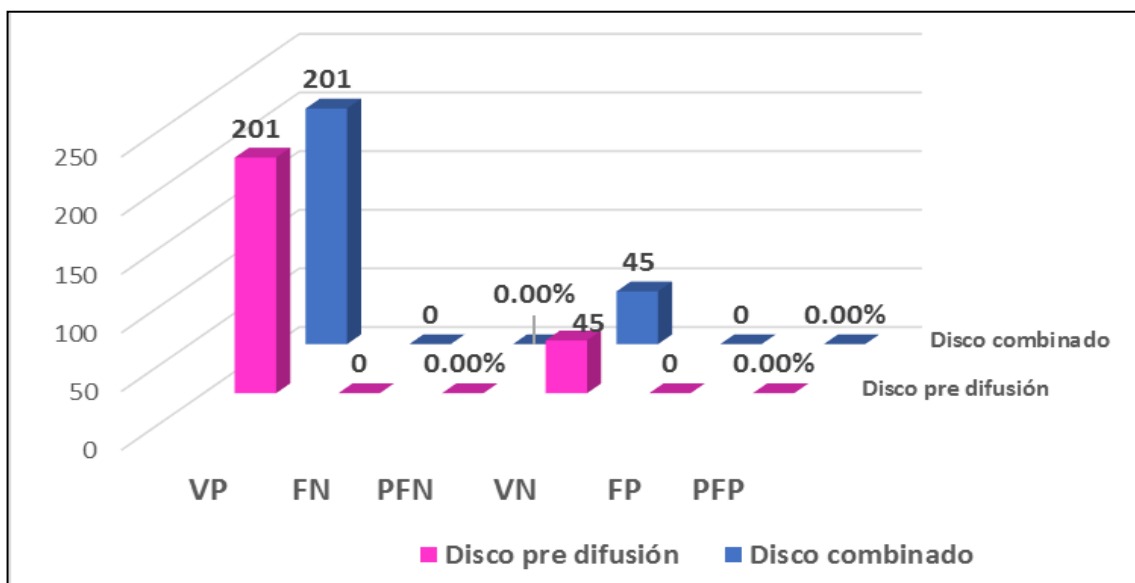
DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL METODO DE DISCO PRE DIFUSION Y EL METODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO

Método	VP	FN	Sens (IC 95%)	PFN	VN	FP	Espe (IC 95%)	PFP
Disco pre difusión	201	0	100% (98.1% a 100%)	0.00%	45	0	100% (94.3% a 100%)	0.00%
Disco combinado	201	0	100% (98.2% a 100%)	0.00%	45	0	100% (94.2% a 100%)	0.00%

VP: verdaderos positivos; **FN:** falsos negativos; **Sens:** sensibilidad; **PFN:** proporción de falsos negativos; **VN:** verdaderos negativos; **FP:** falsos positivos; **Espe:** especificidad; **PFP:** proporción de falsos positivos.

GRAFICO N° 01

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL METODO DE DISCO PRE DIFUSION Y EL METODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO



ANALISIS E INTERPRETACION

En el periodo de estudio se procesaron 246 aislamientos de enterobacterias productoras y no productoras de BLEE derivados del Servicio de Microbiología del HONADOMANI SB, donde resultó 201 enterobacterias productoras de BLEE para ambos métodos (disco pre difusión y disco combinado) y 45 enterobacterias no productoras de BLEE para ambos métodos. No se encontró una diferencia significativa entre ambos métodos. (Véase también en figura N° 09) ($p=0.035$).

TABLA Nº 02

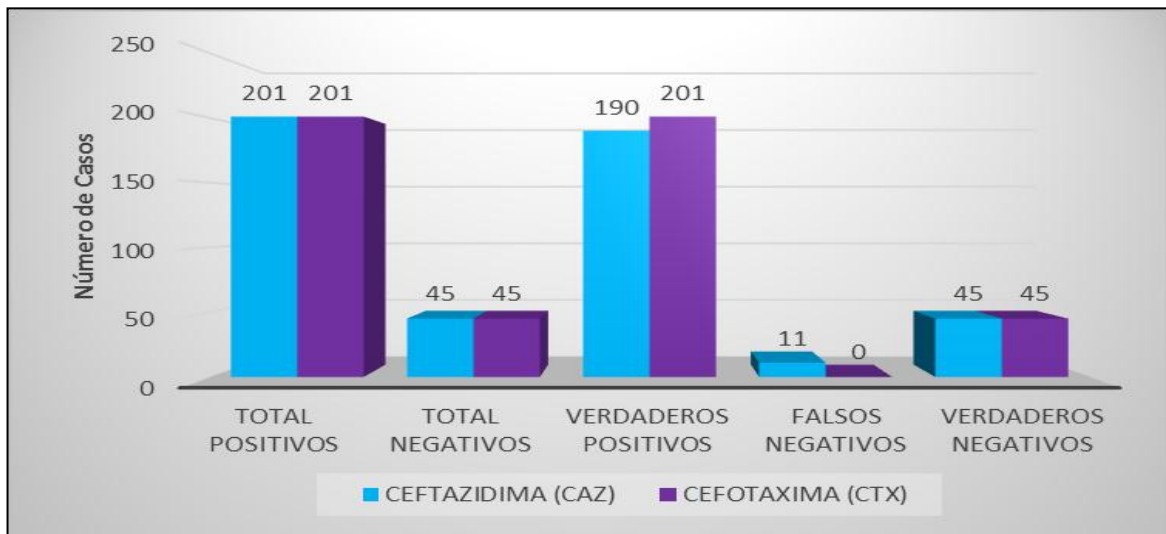
EVALUACIÓN DEL DISCO DE CEFTAZIDIMA Y CEFOTAXIMA PARA LA DETECCIÓN DE BLEE EN EL METODO DISCO PRE DIFUSION

Disco de antibiograma	TP	TN	VP	FN	Sens (IC 95%)	PFN	VN	FP	Espe (IC 95%)	PFP
Ceftazidima (CAZ)	201	45	190	11	94.5% (98.4% a 100%)	5.47%	45	0	100% (95.5% a 100%)	0.00%
Cefotaxima (CTX)	201	45	201	0	100% (98.3% a 100%)	0.00%	45	0	100% (95.6% a 100%)	0.00%

TP: total de positivos; TN: total de negativos; VP: verdaderos positivos; FN: falsos negativos; Sens: sensibilidad; PFN: proporción de falsos negativos; VN: verdaderos negativos; FP: falsos positivos; Espe: especificidad; PFP: proporción de falsos positivos.

GRAFICO Nº 02

EVALUACIÓN DEL DISCO DE CEFOTAXIMA Y CEFTAZIDIMA PARA LA DETECCIÓN DE BLEE EN EL METODO DISCO PRE DIFUSION



ANALISIS E INTERPRETACION

Se evaluó el disco ceftazidima (CAZ) del total (nº 246) se obtuvo una sensibilidad de 94.5% y una especificidad de 100%, con un total de positivos 201, verdaderos positivos 190, falsos negativos 11, y un total de negativos 45. En la evaluación de cefotaxima (CTX) se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% con un total de positivos 201, total de negativos 45, verdaderos positivos 201, falsos negativos 0. (p=0.301).

TABLA Nº 03

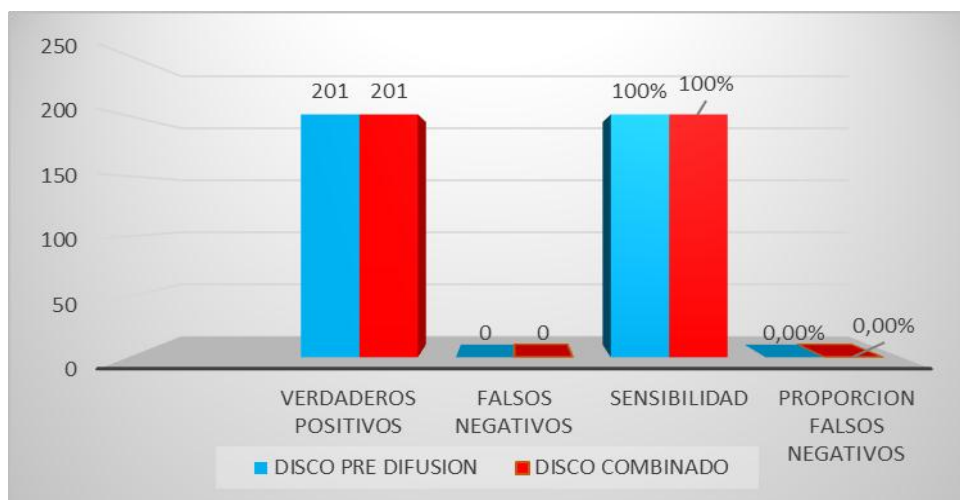
EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DISCO PRE DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO

MÉTODO	VP	FN	SENSIBILIDAD (IC 95%)	PFN
Disco pre difusión	201	0	100 % (98.1% - 100%)	0.00 %
Disco combinado	201	0	100% (98.2 – 100%)	0.00%

VP: verdaderos positivos; FN: falsos negativos; PFN: proporción de falsos negativos

GRAFICO Nº 03

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DISCO PRE DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO



ANALISIS E INTERPRETACION

La evaluación de sensibilidad se realizó con referencia a la prueba confirmatoria del VITEK como patrón estándar en la detección de BLEE de un total de 201 ensayos donde los verdaderos positivos fueron 201, falsos negativos 0, se obtuvo una sensibilidad del 100%

TABLA N° 04

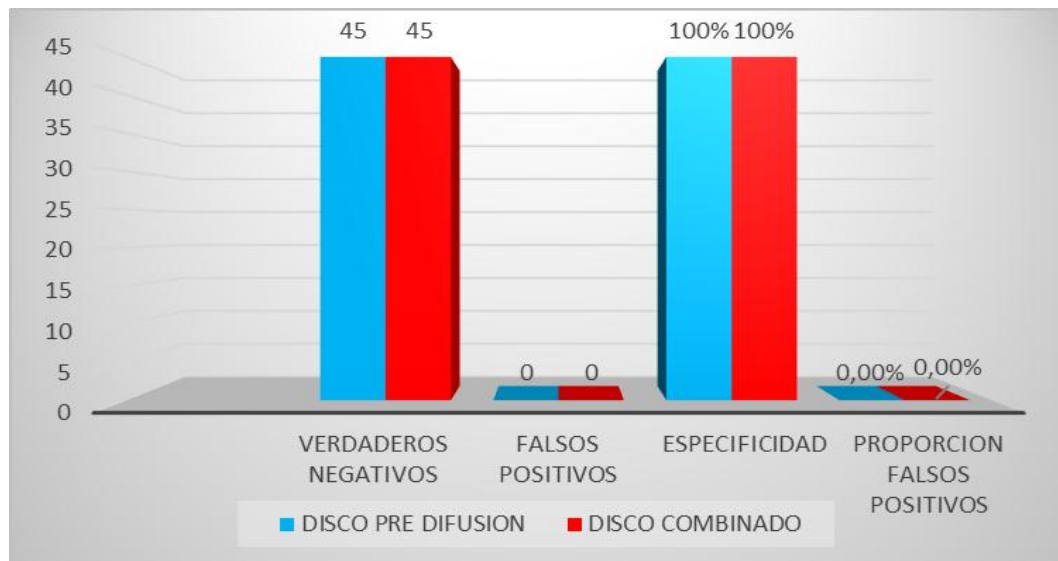
EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO DISCO PRE DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE COMBINADO

MÉTODO	VN	FP	ESPECIFICIDAD (IC 95%)	PFP
Disco pre difusión	45	0	100 % (98.1% - 100%)	0.00 %
Disco combinado	45	0	100% (98.2 – 100%)	0.00%

VN: verdaderos negativos; FP: falsos positivos; PFP: proporción de falsos positivos

GRAFICO N° 04

EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO DISCO PRE DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE COMBINADO



ANALISIS E INTERPRETACION

La evaluación de la especificidad se realizó con referencia a la prueba confirmatoria del VITEK como patrón estándar en la detección de BLEE de un total de 45 ensayos donde los verdaderos negativos fueron 45, falsos negativos 0, se obtuvo una especificidad del 100%

TABLA Nº 05

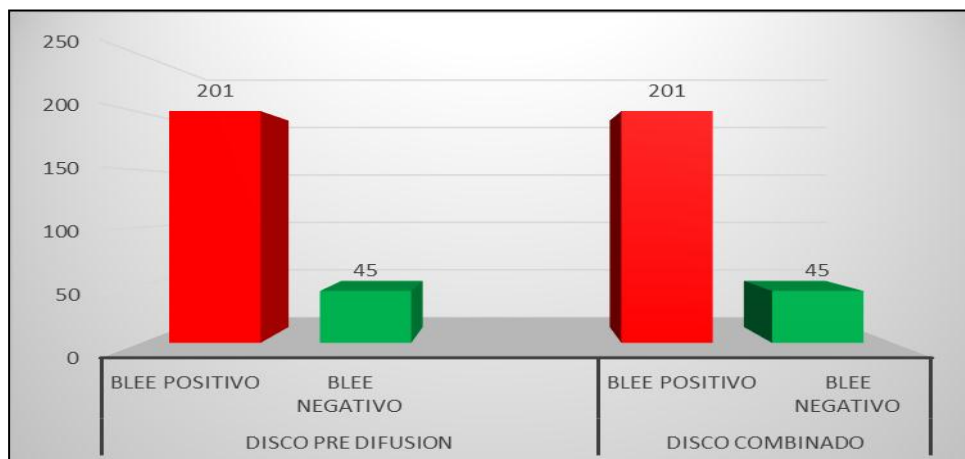
DETERMINACIÓN DE LA CONCORDANCIA ENTRE EL MÉTODO DE DISCO PRE DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO

MÉTODO	CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO			TOTAL
		BLEE POSITIVO	BLEE NEGATIVO	
DISCO PRE DIFUSION	BLEE POSITIVO	201	0	201
	BLEE NEGATIVO	0	45	45
TOTAL		201	45	246

INDICE DE KAPPA	ERROR ESTANDAR	I.C 95 %	Fuerza de la concordancia
1.000	0.000	(1.000 , 1.000)	Muy buena

GRAFICO Nº 05

DETERMINACIÓN DE LA CONCORDANCIA ENTRE EL MÉTODO DE DISCO PRE DIFUSIÓN Y EL MÉTODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO



ANALISIS E INTERPRETACION

El índice de Kappa del método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado es 1.00, con un acuerdo esperado de 0.6336; según la escala de Landis y Koch. El grado de concordancia entre los dos métodos evaluados es casi perfecto.

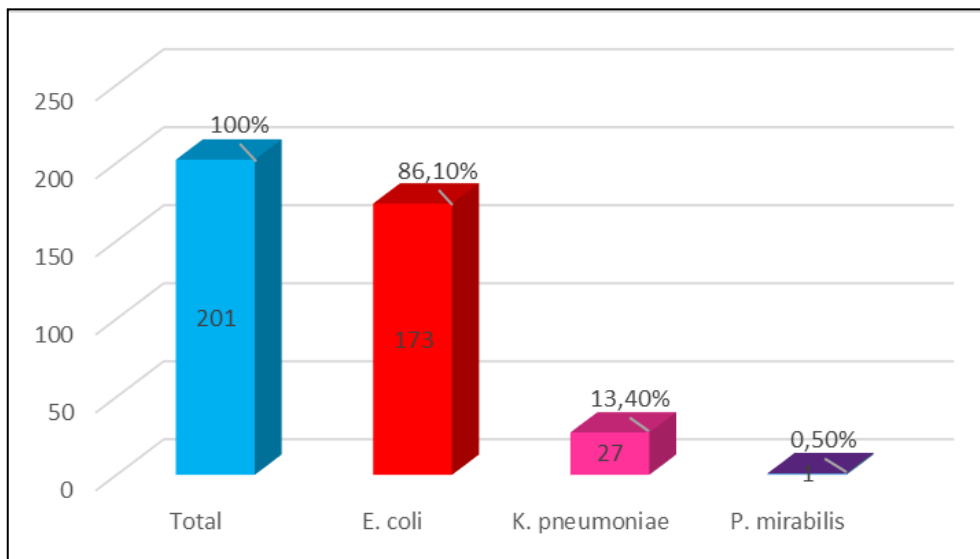
TABLA Nº 06

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIA PRODUCTORAS DE BLEE

ENTEROBACTERIA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Escherichia coli</i>	173	86.1%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27	13.4%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0.5%
Total	201	100%

GRAFICO Nº 06

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIA PRODUCTORAS DE BLEE



ANALISIS E INTERPRETACION

De 201 aislamientos, la enterobacteria productora de BLEE más frecuente fue *Escherichia coli* con 173 (86.1%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* con 27 (13.4%) y *Proteus mirabilis* con 1 (0.5%)

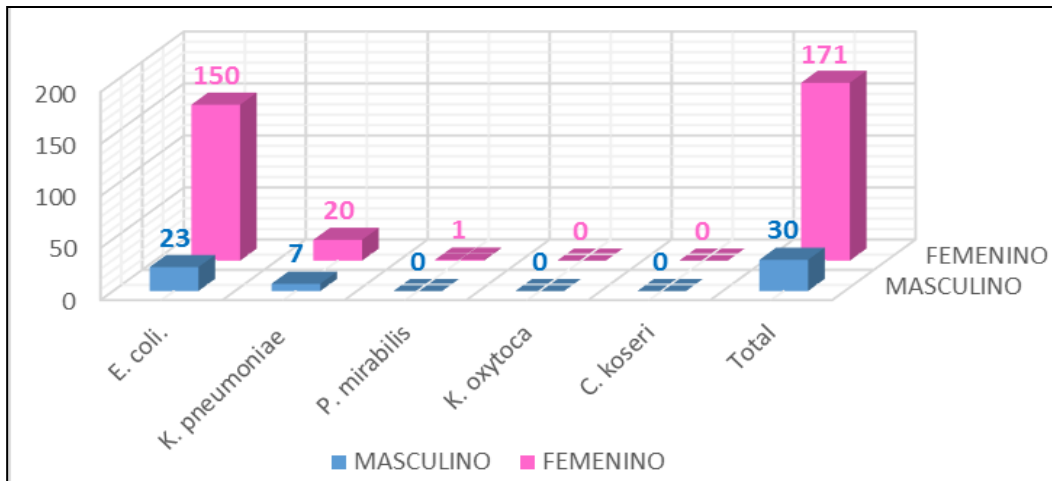
TABLA Nº 07

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GÉNERO

GENERO	ENTEROBACTERIA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
FEMENINO	<i>E. coli.</i>	150	74.6 %
	<i>K. pneumoniae</i>	20	9.9 %
	<i>P. mirabilis</i>	01	0.6 %
	<i>K. oxytoca</i>	0	0 %
	<i>C. koseri</i>	0	0 %
	Total	171	85.1%
MASCULINO	<i>E. coli.</i>	23	11.4%
	<i>K. pneumoniae</i>	7	3.5%
	<i>P. mirabilis</i>	0	0%
	<i>K. oxytoca</i>	0	0%
	<i>C. koseri</i>	0	0%
	Total	30	14.9%
Total		201	100 %

GRAFICO Nº 07

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GÉNERO



ANALISIS E INTERPRETACION

Se observó que la enterobacterias productoras de BLEE más frecuente fue en el género femenino con 171 (85.1%), seguido por el género masculino con 30 (14.9%)

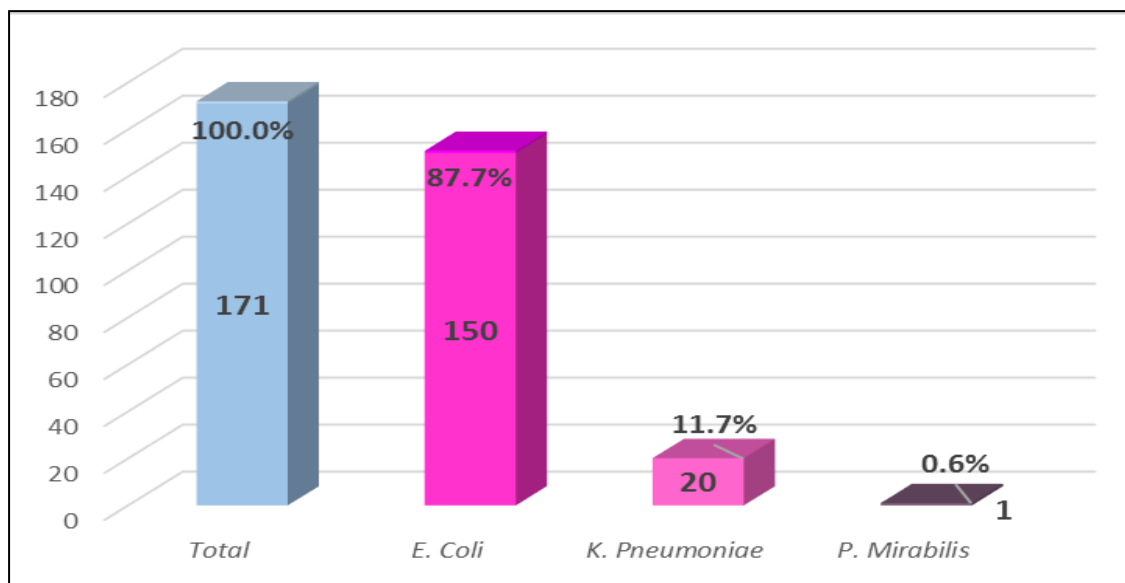
TABLA N° 08

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GÉNERO FEMENINO

ENTEROBACTERIA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Escherichia coli</i>	150	87.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	11.7
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0.6
total	171	100

GRAFICO N° 08

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GÉNERO FEMENINO



ANALISIS E INTERPRETACION

Se observó que en el género femenino la enterobacteria más frecuente es *E. coli* con 150 (87.7%), seguido de *K. pneumoniae* con 20 (11.7%), *P. mirabilis* con 1 (0.6%)

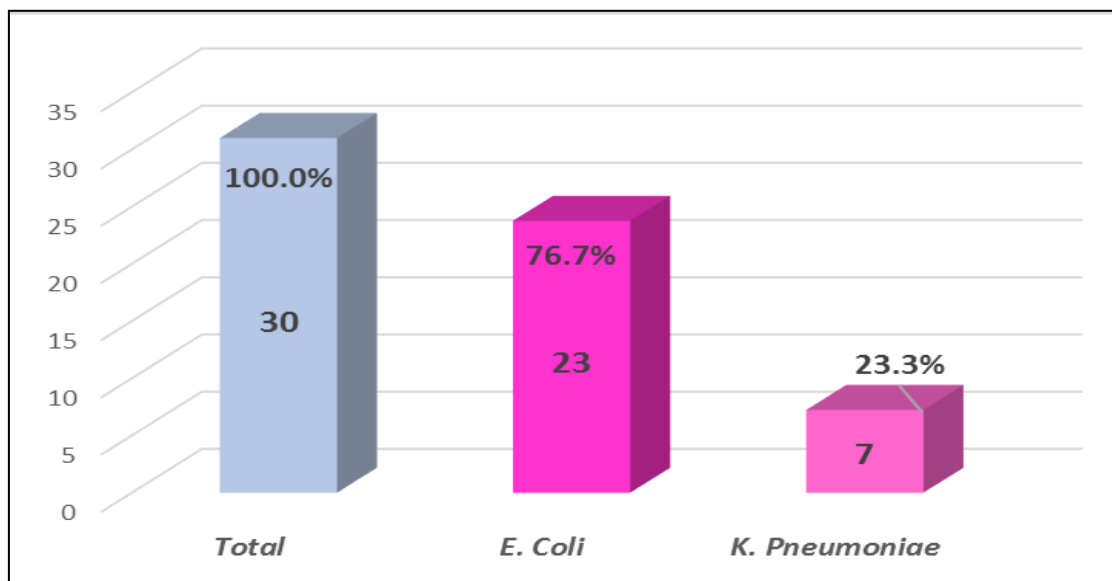
TABLA N° 09

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GÉNERO MASCULINO

ENTEROBACTERIA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Escherichia coli</i>	23	76.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	23.3
total	30	100

GRAFICO N° 09

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GÉNERO MASCULINO



ANALISIS E INTERPRETACION

Se observó en el género masculino la enterobacteria productora de BLEE más frecuente es *E. coli* con 23 (76.7%), seguido de *K. pneumoniae* con 7 (23.3%).

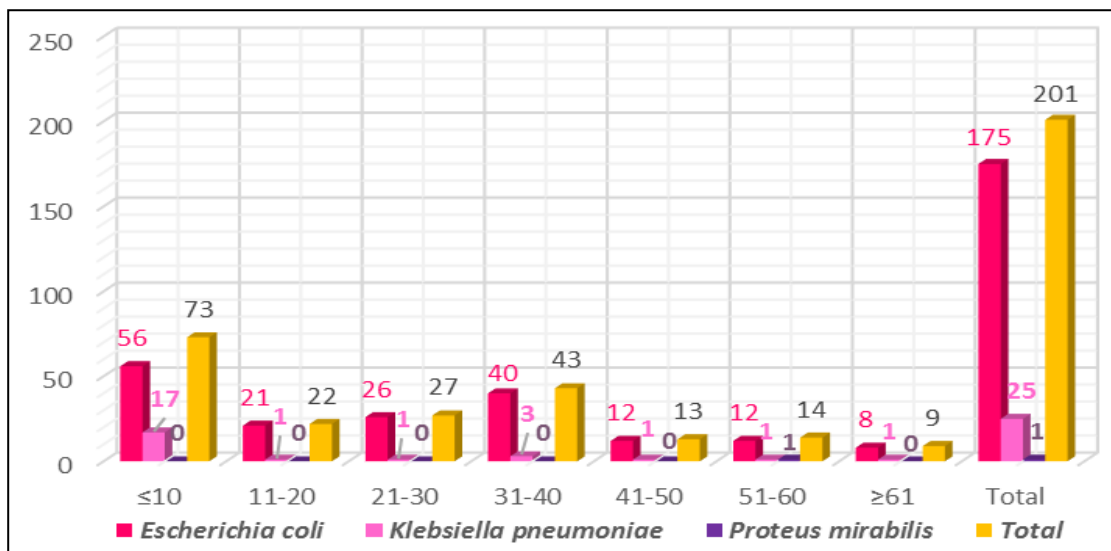
TABLA Nº 10

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIA PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GRUPO ETARIO

ENTEROBACTERIA	GRUPO ETARIO (AÑOS)							Total
	≤10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	≥61	
<i>Escherichia coli</i>	56	21	26	40	12	12	8	175
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	1	1	3	1	1	1	25
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
Total	73	22	27	43	13	14	9	201
% del total	36.3%	10.9%	13.4%	21.4%	6.5%	7.0%	4.5%	100%

GRAFICO Nº 10

FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIA PRODUCTORAS DE BLEE SEGÚN EL GRUPO ETARIO



ANALISIS E INTERPRETACION

Con mayor frecuencia se aislaron enterobacterias productoras de BLEE según el grupo etario fue en las edades igual o menores de 10 años, con 36.3%.

4.2. Discusión de resultados

Los resultados del método de disco pre difusión en 201 urocultivos positivos para BLEE confirmados por el sistema Vitek no se encontró diferencias significativas y se demostró una alta concordancia diagnóstica (Tabla N° 01, 05). La interpretación de la prueba como positiva indica la producción de BLEE en las enterobacterias aislados, de manera inherente, de la identificación fenotípica de BLEE, los cuales se pueden confirmar, corroborar y evaluar con pruebas moleculares.^{71,72,73}

La prueba de correlación de Kappa de Cohen muestra la concordancia entre dos métodos, los valores < de 0 indican una carencia de concordancia, un Kappa de 0 a 0,19 indica concordancia muy débil, valores de Kappa de 0.20 a 0.39 indican concordancia débil, valores de Kappa de entre 0.40 a 0.59 señalan concordancia moderada, valores de Kappa de entre 0.60 a 0.79 indican concordancia muy buena, y los valores de Kappa superiores a 0.80 indican concordancia muy buena inter-prueba.⁶⁶ En este estudio se determinó una correlación inter-prueba de Kappa = 1.00 (IC95%:1.00 a 1.00%) entre ambos métodos. Esto señala que los dos métodos diagnósticos tienen un alto grado de concordancia, pudiéndose aplicarse el método de disco pre difusión en la determinación fenotípica de BLEE en muestras de urocultivo.

De la misma manera, se demostró la misma eficacia entre ambos métodos diagnósticos. El estudio demostró que el método de disco pre difusión es un medio ideal la identificación fenotípica de BLEE en urocultivo al tener 100% de especificidad, 100% de sensibilidad y una exactitud de 100% (Tabla N° 03, 04). Este alto rendimiento se basa en modificación de la prueba confirmatoria de disco combinado mediante el proceso de pre difusión, así, este novedoso método para determinar BLEE en urocultivo sería importante y muy aplicable en poblaciones con alta prevalencia de bacterias BLEE positivo, dado que su mínima proporción de falso positivos y negativos (0.0%), como las poblaciones de Latinoamérica.^{74,75} Con esta interpretación, los resultados del presente estudio son comparables con otros investigaciones realizados por Nicola *et al.* (2012), Herrera *et al.* (2011), de Castillo *et al.* (1998) y la prueba de

confirmación fenotípica.^{10,,61,67} Asimismo, los resultados hallados en esta investigación demuestran mejor rendimiento que lo evaluado por Schumacher *et al.* (2001) que demuestran altas proporciones de resultados falsos positivos.⁶⁸ Además, todas los asilamiento BLEE positivos determinado por el sistema comercial Vitek (concentraciones inhibitorias mínimas–CIM) coincidieron con los resultados del método de disco pre difusión. La proporción de concordancia esperada al azar fue de 0.63 y la proporción total de concordancia observada fue de 1.00, esto señalan mayor concordancia que la que se esperaría por el puro azar (Tabla N° 05).

Los resultados que pueden ser extrapolables a determinaciones directamente de muestras clínicas, como se ha demostrado con anterioridad en diferentes estudios que señalan alta concordancia entre la determinación fenotípica de BLEE en muestras clínicas y directamente de cultivo.^{8,16,19}

Si bien es cierto que hay estudios que hayan aplicado el método de disco pre difusión para otros fines, cabe señalar que en nuestro país, actualmente y durante el periodo que se hizo el estudio, no existe reportes que comparen la concordancia diagnóstica del método de disco pre difusión y con el método confirmatorio de disco combinado para la evaluación de cepas productoras de BLEE, por lo que los resultados de este estudio, coincidentes con el método *gold standard*, demuestran su utilidad como método fenotípico para la determinación de cepas productoras de BLEE.

En el estudio de Lezameta *et al.* (2010) se demostró alta eficacia entre métodos fenotípicos (método de Jarlier, método americano, métodos de Hodge y el tridimensional) los cuales deberían de ser comparados también con el método de disco pre difusión, siendo relevante demostrar y comparar su facilidad, factibilidad de su aplicación y costos, que en este estudio fueron suficientes.

Por otro lado caber resaltar, que la proporción de asilamiento de cepas productoras de BLEE fue considerablemente menor que lo reportado por Tsering *et al.* (2009) y Mena *et al.* (2009) que indicaron un 34% y 25% de prevalencia, respectivamente; pero mayores que el reportado por Wu *et al.*

(2015) y Pilmis et al. (2015), que indicaron 14% y 10.9% de prevalencia de aislados BLEE positivos, respectivamente.^{59,60,63} En cuanto a las especies más frecuentemente aisladas, nuestros resultados son coincidentes con los de Tsering *et al.* (2009), Wu et al. (2015) y Lezameta et al. (2010) que señalan a *E.coli* y *K. pneumoniae* como las principales cepas productoras de BLEE, en trasplante de órganos y en urocultivo, respectivamente.^{8,60,63}

El aumento progresivo de la resistencia antibiótica durante las últimas tres décadas está poniendo en riesgo la integridad de los medicamentos en la terapéutica microbiana. Al someterse a una presión de selección evolutiva inherente, con el uso no racional y muchas veces inadecuado de antibióticos, se están acrecentando las tasas de crecimiento de bacterias resistentes. En ese sentido, diversas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud, están comprometidas en la lucha, prevención y control de las superbacterias dentro de la era “Post-antibiótica”.^{69,70} Este acontecimiento ya está siendo considerado un problema de Salud Pública a nivel mundial, ya que la eliminación de las cepas sensibles implica diseminación de las resistentes.⁷⁶

Este problema se ve reflejado en las infecciones de tracto urinario (ITU) por enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), donde el uso inapropiado de antibióticos debido, principalmente a la no detección de este mecanismo de resistencia constituyen un problema sanitario tanto para los pacientes como para las instituciones de salud.

4.3 Conclusiones

Al evaluar la variación en el tamaño de los halos para el método de disco pre difusión en comparación con el método confirmatorio de disco combinado para CTX / CTX-CLA no se encontró una diferencia significativa entre ambos métodos

El análisis de la prueba diagnóstica evidencia una sensibilidad de 100.0% (IC95%: 98.1% a 100.0%), una especificidad de 100.0% (IC95%: 94.3% a 100.0%), un Valor Predictivo Positivo de (VPP) 95.4% (IC95%: 98.1% a 100.0%), un Valor Predictivo Negativo de (VPN) 96.5% (IC95%: 94.3% a 100.0%).

Se determinó una muy buena concordancia diagnóstica entre el método de disco pre difusión en comparación con el método confirmatorio de disco combinado para CTX / CTX-CLA

En el periodo de estudio se procesaron 246 aislamientos de enterobacterias, de los cuales, 201 resultaron positivos para BLEE y 45 fueron negativos para BLEE.

La proporción de aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE por el método de disco Pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado fue 201 de los cuales la más frecuente fue *Escherichia coli* con 173 (86.1%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* con 27 (13.4%) y *Proteus mirabilis* con 1 (0.5%)

Las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes que se aislaron pacientes que acudieron al servicio de microbiología del HONADOMANI "San Bartolomé" según el grupo etario fue entre las edades igual o menor de 10 años correspondiente a 36.3 %.

Se determinó que la enterobacteria productora de BLEE más frecuente se encontró en el género femenino con 171 (85.1%), seguido por el género masculino con 30 (14.9%)

Se determinó la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE en el género femenino fue *Escherichia coli* con 150 (87.7%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* con 20 (11.7%), *Proteus mirabilis* con 1 (0.6%)

Se determinó en el género masculino la enterobacteria productora de BLEE más frecuente es *Escherichia coli* con 23 (76.7%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* con 7 (23.3%).

4.4. Recomendaciones

Se recomienda usar este método, ya que los discos de sensibilidad de la prueba confirmatoria no están al alcance comercialmente.

Se debe de evaluar la concordancia diagnóstica entre el método de pre difusión y método de Jarlier del Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología en cepas productoras de BLEE en urocultivo.

Evaluar este método disco pre difusión con otros microorganismos como *Enterobacter*, *Citrobacter*.

Evaluar el método disco pre difusión con ampicilina sulbactam y piperacilina tazobactam

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Carmen Fariñas María, Martínez-Martínez Luis. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2013;31(6): 402-409
2. Stephan D, Fihn M D. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. Clinical Practice. 2003; 349(9): 259-66.
3. Albarado Ysasis Luzmila Sofía, García José, Rodríguez Eliosmar, et al. Frecuencia de enterobacterias nosocomiales productoras de b-lactamasas de espectro extendido, Cumaná, Venezuela. NOVA. 2009; Vol.7 : 52-59
4. Barcelona Laura, Marín Marcelo, Stamboulian Daniel. Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas. Amoxicilina-sulbactam. Medicina (B. Aires). 2008; v.68: 65-74.
5. Pérez-Cano HJ, Robles-Contreras A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Rev. Med MD. 2013; 4 (3): 186 -191.
6. García-Hernández A, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero JA, Gómez J. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Esp Quimioter. 2011; 24(2):57-66.
7. Ramos GA, Hernández PW, Nodarse HR, Padrón SA, De Armas AE, Del Rosario CL. Detección Precoz de Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido en pacientes graves. Rev Cub Med Int Emerg. 2006; 5(1):294-301.

8. Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, JH Tamariz. Comparison of four phenotypic methods to detect extended-spectrum betalactamases. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2010; 27(3): 345-51.
9. Thomsen VF. The value of prediffusion in the determination of the correlation of dilution and diffusion methods in tests of bacterial sensitivity. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl*. 1962; Suppl154: 299-302.
10. Herrera ME, Mobilia LN, Posse GR. Sensibilidad de *Acinetobacter* a la colistina evaluada mediante los métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima. Detección de aislamientos eterorresistentes. *Rev Argent Microbiol*; 2011; 43: 115-9.
11. FG Nicola, J Nievas, J Smayevsky. Evaluation of phenotypic methods for the detection of KPC carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Argent Microbiol*. 2012; 44: 290-302.
12. Chiriboga Urquizo, Marcelo, Araujo López, Catalina. [Nuevo método alternativo para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella spp*] Quito, Ecuador, Universidad Central Del Ecuador; 2012. 09 Junio del 2015: disponible en : <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/644>
13. Cué Brugueras Manuel, Morejón García Moisés. Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr* .1998; 14(4):347-61
14. Camacho Volfredo J. Los Antimicrobianos en la Práctica Médica.[sitio en internet] consultado: 29 de julio del 2015 .Disponible en : <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/urgencia/antibioticos.pdf>
15. Marín Mar; Gudiol Francesc. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* .2003; 21:42-54.
16. Alvarado Pullaguari Cecilia Yajaira. Resistencia Bacteriana de bacilos Gram Negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes del Hospital del Día y Clínica Maternidad Julia Esther

Gonzales durante el periodo agosto-noviembre 2013. [Tesis para optar título de Bioquímico Farmacéutico] Loja, Ecuador, Universidad Técnica Particular de Loja; 2014 .6 de julio del 2015. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9193/1/Cecilia%20Yajaira%20Alvarado%20Pullaguari.pdf>

17. Echevarria Zarate, Juan, Iglesias Quilca, David. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Med Hered. 2003. 30 de julio del 2015; 14 (4): 195-203.
18. V. Seija, R. Vignoli. Principales grupos de antibióticos. BacteCEFA.2008; 34: 631-641.
19. K Poole. Multidrug resistance in gram-negative bacteria. Curr Opin Microbiol 2001; 4(5):500-508.
20. Nakano Viviane, Sishiyama Sheila, Ávila Mario. Betalactamasas, su importancia en la Resistencia bacteriana. Universidad de Sao Paulo. Departamento de microbiología. 2012; 1: 1-7.
21. Abreu Rodríguez, Rossana. Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), en exudados rectales de pollos de engorde en granjas avícolas en la isla de tenerife [Doctorado en Medicina Veterinaria] España; Universidad de La Laguna; 2013. disponible en: <http://www.triptolemos.org/catalogo/tesis/prevalencia-de-enterobacterias-productoras-de-betalactamasas-de-espectro-extendido-blee-en-exu>.
22. Ambler RP, Coulson AF. A standard numbering scheme for the class a beta-lactamases. Biochem J 1991; 276(1): 269-70.
23. Matagne A, Lamote J, Free J, Catalytic properties of Class A beta lactamases: efficiency and diversity. Biochem J. 1998; 330:581-98.

24. Medeiros A. Quality and Resistance. Clinical Microbiology and Infection. Update b-lactamases. Elsevier Inc 1997; 3:452-459.
25. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum –beta-lactamase-producing isolates? Eur J Clin Microbiol Inf Dis. 1996; 15:361.
26. Arce Gil Zhandra, Llontop Nuñez José, Alarcón Benavides Edwin, López-López Elmer. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de Escherichia coli β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo- Perú. RCM; 2014:7:27-30
27. Calvo Jorge; Cantón Rafael; Fernández Felipe; Cuenca Beatriz; Ferran Navarro Mirelis [Sitio de internet].consultado:12-08-15. Disponible:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
28. Giner Almaraz; Cabedo Canós; Rodilla Calvelo; Ferrer Gómez. Valoración De Los Inhibidores De Las Betalactamasas. Farm Hosp.1996; 20 (4): Paginas: 225-235
29. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Huayán-Dávila G, Mercado-Martínez P. Beta-lactam susceptibility and resistance by extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae environmental isolations at a general hospital in Cajamarca Perú. Med Hered 2011; 22: 69-75.
30. Morejón García Moisés. Extended spectrum Beta-lactamase (ESBL). Scielo. 2013; 52(4):272-280.
31. Hernández Álvarez Elena. *Escherichia coli* Productores de BLEE Aislados de Urocultivo: Implicaciones en el Diagnóstico y Tratamiento de la Infección Urinaria [Grado de Doctor] Madrid, España, Universidad Complutense De Madrid; 2010.11 de noviembre del 2015. Disponible en : <http://eprints.ucm.es/10442/1/T31499.pdf>

32. Abarca Gabriela, Herrera Marco Luis. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños Dr. Carlos Herrera .2001;36(1) :1-2
33. Chávez PJ. Caracterización Molecular del Gen de la Betalactamasa SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae*. [Tesis]. Barcelona, España, Universidad de Barcelona; 2014 .15 de noviembre del 2015
34. Zemelman Raúl; Valenzuela Lissette; Domínguez Mariana; Bello Helia; González Gerardo; Zemelman Claudia. Detección de β -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. Rev Chil Infect. 2002; 19: 92-95.
35. Malbran Carlos. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos – Ministerio de Salud [Sitio en internet]. Consultado 20 de setiembre del 2015 .Disponible en: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Level1/Manual_procedimientos.pdf
36. Muñoz Delgado Ángela, Duarte Valderrama Carolina. [Sitio en internet] Consultado: 18 Enero del 2016. Disponible en : <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/determinacin%20de%20%20susceptibilidad%20%20antimicrobiana/MANUAL%20DE%20PROCEDIMIENTOS%20%20DETERMIN%20SUSCEPTIBILIDAD%20PATOGENOS%20IMPACTO%20HOSPITALARIO.pdf>
37. Muñoz Delgado Ángela, Duarte Valderrama. Manual de Procedimientos para la Determinación de Susceptibilidad Antibiótica en Patógenos de Importancia Hospitalaria [sitio en internet] Consultado: 23 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/determinacin%20de%20%20susceptibilidad%20%20antimicrobiana/MANUAL%20DE%20PROCEDIMIENTOS%20%20DETERMIN%20SUSCEPTIBILIDAD%20PATOGENOS%20IMPACTO%20HOSPITALARIO.pdf>

20SUSCEPTIBILIDAD%20PATOGENOS%20IMPACTO%20HOSPITALARIO.pdf

38. Prat M. Soledad. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana por Difusión en Agar; ISP. 2004; 24: (1-18)
39. Instituto Nacional de Salud MINSA. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. [sitio en internet]. Consultado: 25 de julio del 2016. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilidad.pdf
40. Stephen J. Cavalieri et al, Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. [Sitio en internet]. Consultado: 03 de enero del 2016. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=%20Fecha%20de%20Acceso:%202015-05-2015.
41. R James, Knox. Extended-Spectrum and Inhibitor-Resistant TEM-Type b-Lactamases: Mutations, Specificity, and Three-Dimensional Structure. Antimicrobial Agents And Chemotherapy.1995 ; Vol. 39(12): 2593-2599
42. Padilla Chumacero Marlha, Jaime Mendoza. Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae mediante método de Jarlier. Arch. Boliv. Med. 2011; v. 16(84): 7-11.
43. Colquechagua Aliaga Fabiola, Sevilla Andrade Carlos, Gonzales Escalante Edgar. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. Med. Exp. Salud pública.2015; vol.32 no.1:1-11
44. Cuadra Jarpa Stephan, Vigilancia nacional de cabapenemasas en enterobacterias. Departamento laboratorio biomédico. [Sitio en

internet]. Consultado 15 de Febrero del 2016 .Disponible en :
<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2014/05/Carbapenemasas%20klebsiella%202014%20ISP.pdf>

45. Rabanaque Mallén Gloria, Borrell Palanca Alberto, Ramos Plá Manuel, García Domingo Concepción, Plá Torres María Isabel, Infecciones Del Tracto Urinario. [Sitio en internet]. Consultado: 11 de abril del 2016. Disponible en:
<http://www2.san.gva.es/docs/dac/guiasap022infecurinaria.pdf>
46. Andreu Domingo Juana, Coira Nieto Cacho Amparo, Lepe Jiménez José Antonio. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Seimc*.2010; 14:5-40.
47. M.A. García Viejo, A. Noguero Asensio. La infección del tracto urinario en los servicios de Medicina Interna. *Rev. Clin. Esp.* 2010; 210(11): 537-544
48. Meza Mejía Lizbeth Magdalena. Complicaciones y frecuencias de las infecciones urinarias en adolescentes embarazadas. [Tesis para obtener título de obstetra] Guayaquil, Ecuador, Universidad Estatal de Guayaquil. 2013. 02 de febrero del 2016 .Disponible en :
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1868/1/TESIS%20LIZBETH%20MEZA%20PDF.pdf>
49. Hernández JR, Pascual A, Canton R, Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). *Publmed. Gov.* 2003; 21(2): 77-82.
50. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* .American Society for Microbiology. 2004 ; 48:1-14
51. Menon T, Bindu D, Kumar CP, Nalini S, Thirunarayan MA. Comparison of double disc and three dimensional methods to screen

for ESBL producers in a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol. 2006;24(2):117-20

52. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement M100-S19. [Sitio en internet]. Consultado: 25 de Abril del 2016 .Disponible en: <http://www.businesswire.com/news/home/20090129006132/en/CLSI-Publishes-2009-Antimicrobial-Susceptibility-Testing-Standards>.
53. Ruiz de Alegría C, Perea López B. Indicaciones y valoración clínica del urocultivo y coprocultivo. [Sitio en Internet]. Consultado : 16 de Abril del 2016 :Disponible en : http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Urocultivo_coprocultivo_indicaciones_Medicine2010.pdf
54. Andreu Antonia, Planells Irene y Grupo Cooperativo Español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patógenos Urinarios. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de Escherichia coli a los antimicrobianos de primera línea. Medicina Clínica .2008; 130: 481-486.
55. Fernando Jiménez Juan, Broseta Rico Enrique E. Clasificación, Etiología, Diagnóstico y Tratamiento de la Prostatitis. Enferm Infecc Microbiol Clin .2005 ; 23(4) : 47-56
56. Fernando J, Broseta E. Clasificación, Etiología, Diagnóstico y Tratamiento de la Prostatitis. Servicio de Urología. Hospital Universitario la Fe. Valencia. Enferm Infecc Microbiol Clin. España 2010;23(Supl. 4):47-56
57. Gonzales Rodríguez JD, Rodríguez Fernández LM. Infección de la Vías Urinarias en la Infancia. Protoc diagn ter pediatr. 2014; 1: 91-108.

58. Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, et al, Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. Rev. argent. Microbiol. 2005 ;37(1) :57-68
59. Alós Juan Ignacio. Epidemiología y Etiología de la Infección Urinaria Comunitaria en Adultos. Sensibilidad Antimicrobiana de los Principales Uropatógenos y Significado Clínico de la Resistencia. Salvat .2005 ;25(4) :7-13
60. Perozo Mena, Armindo José, Castellano González, Maribel Josefina, Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. [Sitio en internet]. Consultado: 15 de junio del 2016. Disponible en: file:///C:/Users/MI/Downloads/4837-4844-1-PB.pdf
61. Tsering DC, Shyamasree D, Adhiakari L, Ranabir P, Takhellambam SK. Extended Spectrum Beta-lactamase Detection in Gram-negative Bacilli of Nosocomial Origin. J Glob Infect Dis. 2009; 1(2): 87–92
62. Zykov IN, Sundsfjord A, Smabrekke L, Samuelsen. The antimicrobial activity of mecillinam, nitrofurantoin, temocillin and fosfomicin and comparative analysis of resistance patterns in a nationwide collection of ESBL-producing Escherichia coli in Norway 2010-2011. Infect Dis 2015;28:1-9
63. Pistiki A, Tsaganos T, Galani I, Giamarellos-Bourboulis EJ. In Vitro Activity of Oral Cephalosporins (Cefprozil and Cefixime) Against Ciprofloxacin-Resistant Enterobacteriaceae from Community-Acquired Urinary-Tract Infections. Infect Dis Ther. 2015 ; 4(4) : 425-432
64. Wu CT, Lee HY, Chen CL, Tuan PL, Chiu CH. High prevalence and antimicrobial resistance of urinary tract infection isolates in febrile young children without localizing signs in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2016; 49(2): 243-248
65. Pilmis B, Scemla A, Join-Lambert O, Mamzer MF, Lortholary O, Legendre C, Zahar JR. ESBL-producing enterobacteriaceae-related

- urinary tract infections in kidney transplant recipients: incidence and risk factors for recurrence. *Infect Dis (Lond)*. 2015; 47(10):714-718.
66. Secretaria Distrital De Salud, Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y Normas CLSI M100 – S20. [sitio en internet]. 01 de junio del 2016 : Disponible en : http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf
67. Altman G Douglas. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall. Londres, Reino Unido:Chapman & Hall/CRC;1991.
68. De Castillo MC, De Saab OA, De Nader OM, De Ruiz HAP. In vitro Comparison of Disk Diffusion and Agar Dilution Antibiotic Susceptibility Test Methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(4): 517-522.
69. Helga Schumacher, Steen Hoffmann, Charlotte Holmboe et al. A procedure for evaluation and documentation of susceptibility test methods using the susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to ciprofloxacin as a model. *J Antim Chemt* 2001; 48:493-500.
70. García-Hernández Ana María, García-Vázquez Elisa, Hernández-Torres Alicia et al. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).significación clínica y perspectivas actuales. *Rev. Esp Quimioter* .2011; 24(2):57-66.
71. Viens MA Littmann J. Is Antimicrobial Resistance a Slowly Emerging Disaster? *Public Health Ethics*. 2015; 8(3):255-265.
72. A Poulou, E Grivakou, G Vrioni, et al. Modified CLSI Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Confirmatory Test for Phenotypic Detection of ESBLs among Enterobacteriaceae Producing Various β -Lactamases. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(5): 1483–1489.
73. M Gazin, Paasch F, H Goossens, Surbhi Malhotra-Kumar on behalf of the MOSAR WP2 and SATURN WP1 Study Teams. *Current Trends in*

- Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum--Lactamase-Harboring and Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4): 1140-1146.
74. KS Thomson. Extended-Spectrum--Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1019-1025.
75. Villegas MV, JN Kattan, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 (1):154-8.
76. Machuca Jesús, Agüero Jesús, Miró Elisenda et al. Prevalencia en España de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;10:2-5
77. B Nerlich, R James. “The post-antibiotic apocalypse” and the “war on superbugs”: catastrophe discourse in microbiology, its rhetorical form and political function. *Public Understand Sci.* 2009; 18(5): 574-590.
78. Grupo Para El Control De La Resistencia Bacteriana De Bogotá, Manual De Actualización En Resistencia Bacteriana Y Normas CLSI M100 – S20 2010. [Sitio en internet]. Consultado: 14 de junio del 2016. Disponible en:http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf
79. Oliver Antonio, Cantón Rafael. Enterobacterias Productoras de B-lactamasas Plasmídicas de Espectro Extendido. *CCS.* 2003;1:2.

ANEXOS

ANEXO N° 01

Diferentes grupos de β -lactamasas 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 Antonio, Cantón Rafael. *Enterobacterias Productoras de B-lactamasas Plasmídicas de Espectro Extendido. CCS. 2003;1:2.*

ANEXO N° 02

Clasificación de la B-lactamasas de *Bush, Jacoby y Medeiros*

Cuadro. Clasificación de las β-lactamasas de *Bush, Jacoby y Medeiros*

Grupo funcional y subgrupo	Clase molecular (Ambler)*	Características
1	C	Cefalosporinas, a menudo cromosómicas, pero pueden ser plasmídicas. Resistencia a todos los β-lactámicos, excepto carbapenémicos (a no ser que coexistan alteraciones en las porinas). No inhibidas por el ácido clavulánico.
2	A, D	Penicilinasas, cefalosporinas o ambas. La mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico (salvo casos de hiperproducción o subgrupos determinados).
2a	A	Penicilinasas. Incluye las de <i>Enterococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> . Resistencia a penicilinas. Inhibidas por ácido clavulánico.
2b	A	β-lactamasas de amplio espectro (penicilinasas y cefalosporinas), incluyendo TEM-1 y SHV-1.
2be	A	β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Resistencia a oximino-cefalosporinas y a monobactámicos (aztreonam).
2br	A	β-lactamasas tipo IRT (<i>Inhibitor Resistant TEM</i>). Resistentes a los inhibidores de β-lactamasas ácido clavulánico y sulbactam, pero sensibles a tazobactam.
2c	A	Enzimas hidrolizantes de carbenicilina fundamentalmente, con algún efecto sobre cloxacilina.
2d	D	Enzimas hidrolizantes de cloxacilina (oxacilina) fundamentalmente, con algún efecto sobre carbenicilina. Inhibidas escasamente por ácido clavulánico. Algunas son BLEE (BLEE tipo OXA).
2e	A	Cefalosporinas y aztreonamasas. Inhibidas por ácido clavulánico.
2f	A	Serina-β-lactamasas. Carbapenemasas. Inhibidas por ácido clavulánico.
3a, 3b, 3c	B	Metallo (Zn)-β-lactamasas. Resistencia a carbapenémicos y a todos los β-lactámicos, excepto los monobactámicos. No inhibidas por ácido clavulánico.
4		Miscelánea. Penicilinasas no incluidas en los otros grupos. No inhibidas por ácido clavulánico

Fuente: Morejón García Moisés. Extended spectrum Beta-lactamase (ESBL). Scielo. 2013; 52(4):272-280.

ANEXO N° 03

OPCIONES TERAPEUTICAS EN LAS INFECCIONES POR MICROORGANISMOS 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 Ertapenem	aparición de resistencia en otros patógenos
Aminoglucósidos		Necesario estudio de sensibilidad
Quinolonas		Incremento reciente de la resistencia
Otros	Fosfomicina	No suelen existir resistencias cruzadas
	Nitrofurantoína	No suelen existir resistencias cruzadas
	Colistina	Descontaminación intestinal

FUENTE: Oliver Antonio, Cantón Rafael. Enterobacterias Productoras de B-lactamasas Plasmídicas de Espectro Extendido. CCS. 2003; 1:2.

ANEXO Nº 03

FORMULARIO PARA EL ENVIÓ DE MUESTRAS PARA CULTIVOS



DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLINICA

SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

FORMULARIO PARA EL ENVIÓ DE MUESTRAS PARA
CULTIVO

SERIE: _____
No. LAB _____
FECHA _____

I.-DATOS DEL PACIENTE

APELLIDO PATERNO			APELLIDO MATERNO			NOMBRES								
EDAD	AÑO(S)	MES(ES)	DIA(S)	SEXO: M	<input type="checkbox"/>	F	<input type="checkbox"/>	HISTORIA CLINICA No.:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DPTO MEDICO:	<input type="checkbox"/>	MEDICINA PED.		<input type="checkbox"/>	CIRUGIA PED.		<input type="checkbox"/>	GINECO-OBST.						
SERVICIO:	_____			CONSULTORIO EXT.:			_____							
TIPO DE PACIENTE	<input type="checkbox"/>	AMBULATORIO		<input type="checkbox"/>	HOSPITALIZADO		CAMA: _____							
	<input type="checkbox"/>	SINTOMATICO		<input type="checkbox"/>	ASINTOMATICO		GESTANTE: S I <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>							
SINTOMAS Y/O SIGNOS: _____														
TERAPIA ANTI BIOTICA PREVIA: S I <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			DIAGNOSTICO CLINICO:											
1.- _____			1.- _____			2.- _____			2.- _____			3.- _____		
2.- _____			3.- _____			3.- _____								
3.- _____														

(ESPECIFIQUE CUAL Y CUANDO)

II. TIPO DE MUESTRA

<input type="checkbox"/> SANGRE	<input type="checkbox"/> ASPIRADO BRONQUIAL	<input type="checkbox"/> SECRECION VAGINAL
<input type="checkbox"/> HECES	<input type="checkbox"/> LOQUIO	<input type="checkbox"/> SECRECION URETRAL
<input type="checkbox"/> HISOPADO RECTAL	<input type="checkbox"/> HERIDA / PIEL	<input type="checkbox"/> SECRECION CERVICAL
<input type="checkbox"/> ORINA (CHORRO MEDIO)	<input type="checkbox"/> ABSCESO	<input type="checkbox"/> SECRECION ENDOMETRIAL
<input type="checkbox"/> ORINA (PUNCION SUPRAPUBICA)	<input type="checkbox"/> LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO	<input type="checkbox"/> SECRECION FARINGEA
<input type="checkbox"/> ORINA (CATETERIZADA)	<input type="checkbox"/> LIQUIDO AMNIOTICO	<input type="checkbox"/> SECRECION NASAL
<input type="checkbox"/> MEDULA OSEA	<input type="checkbox"/> LIQUIDO PLEURAL	<input type="checkbox"/> SECRECION NASOFARINGEA
<input type="checkbox"/> CATETER INTRAVENOSO	<input type="checkbox"/> LIQUIDO PERITONEAL	<input type="checkbox"/> SECRECION OTICA
<input type="checkbox"/> TUBO ENDOTRAQUEAL	<input type="checkbox"/> LIQUIDO ARTICULAR	<input type="checkbox"/> SECRECION OCULAR
<input type="checkbox"/> ESPUTO	<input type="checkbox"/> LIQUIDO SEMINAL	<input type="checkbox"/> _____
(ESPECIFICAR)		
MICROORGANISMO EN SOSPECHA:		
<input type="checkbox"/> AEROBIOS	<input type="checkbox"/> ANAEROBIOS	<input type="checkbox"/> HONGOS

III. EXAMEN (ES) SOLICITADO (S)

<input type="checkbox"/> CULTIVO	<input type="checkbox"/> COLORACION DE BK	<input type="checkbox"/> COAGLUTINACION BACTERIANA
<input type="checkbox"/> ANTIBIOGRAMA	<input type="checkbox"/> TINTA CHINA	<input type="checkbox"/> TEST DE VAGINOSIS
<input type="checkbox"/> RECUENTO DE COLONIAS	<input type="checkbox"/> EX. DIRECTO (HONGOS)	<input type="checkbox"/> ESTREPTOCOCCO A (ANTIGENO)
<input type="checkbox"/> COLORACION DE GRAM	<input type="checkbox"/> EX. DIRECTO (TRICHOMONAS)	<input type="checkbox"/> _____
(ESPECIFICAR)		

OBSERVACIONES: _____

MEDICO SOLICITANTE

APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES
------------------	------------------	---------

COLEGIO MEDICO No. :

FIRMA : _____

DIA MES AÑO

FIGURAS

Figura N° 01

MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS BETALACTÁMICOS



Fuente: Pamela A. Farmacología Clínica Básica. 2010 Junio; 1(1). Disponible en <http://farmaclinic.blogspot.pe/2010/06/farmacos-aminoglicosidos.html>

Figura N° 02

CRITERIO DE INTERPRETACIÓN DE DIFUSIÓN DE DISCOS Y LA MIC

Antimicrobiano	Criterios de Interpretación					
	Difusión en disco (mm)			Concentración Inhibitoria Mínima µg/mL		
	S	I	R	S	I	R
Cefotaxima	≥ 26	23-25	≤ 22	≤ 1	2	≥ 4
Cefriaxona	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Ceftazidima	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
Ceftizoxima	≥ 25	22-24	≤ 21	≤ 1	2	≥ 4
Aztreonam	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16

Fuente: Grupo Para El Control De La Resistencia Bacteriana De Bogotá, Manual De Actualización En Resistencia Bacteriana Y Normas Clsi M100 – S20 2010. [Sitio en internet]. Consultado: 14 de junio del 2016. Disponible en: http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf

Figura N° 03

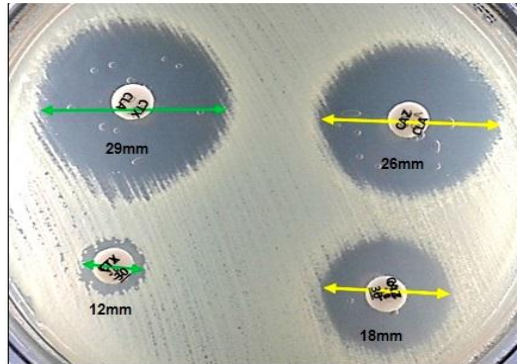
PRUEBA DE TAMIZAJE Y CONFIRMACIÓN DE BLEE

Método de Difusión en disco		
Indicaciones	Prueba tamiz inicial	Prueba confirmatoria fenotípica
Agar Mueller Hinton	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca y E. coli</i> Cefpodoxima 10µg Ceftazidima 30µg Ceftriaxona 30µg Cefotaxima 30µg Aztreonam 30µg <i>Proteus mirabilis</i> Cefpodoxima 10µg Cefotaxima 30µg Ceftazidima 30µg	Cefotaxima 30µg Cefotaxima + Ácido clavulánico 30µg/10µg Ceftazidima 30µg Ceftazidima + Ácido clavulánico 30µg/10µg
Inóculo	Estándar 0.5 McFarland	Estándar 0.5 McFarland
Incubación	35±2 en aerobiosis 16 a 18h	35±2 en aerobiosis 16 a 18h
Potenciales BLEE	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca y E. coli</i> Aztreonam ≤ 27 Cefotaxima ≤ 27 Cefpodoxima ≤ 17 Ceftazidima ≤ 22 Ceftriaxona ≤ 25 <i>Proteus mirabilis</i> Cefotaxima ≤ 27 Cefpodoxima ≤ 22 Ceftazidima ≤ 22	Incremento de ≥5 mm en el diámetro halo para ceftazidima o cefotaxima cuando se combina con Ácido clavulánico

Fuente: Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement M100-S19. [Sitio en internet]. Consultado: 25 de Abril del 2016 .Disponible en: <http://www.businesswire.com/news/home/20090129006132/en/CLSI-Publishes-2009-Antimicrobial-Susceptibility-Testing-Standards>

Figura N° 04

MÉTODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO



La prueba de disco combinado se observa la diferencia de halos de inhibición entre los discos Cefotaxima (12mm) y Cefotaxima/ácido clavulánico (29mm) y Ceftazidima (18mm) y Ceftazidima/ácido clavulánico (26mm). Se considera BLEE positivo cuando existe la diferencia igual o mayor 5mm

Fuente: Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, JH Tamariz. Comparison of four phenotypic methods to detect extended-spectrum betalactamases. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2010; 27(3): 345-51.

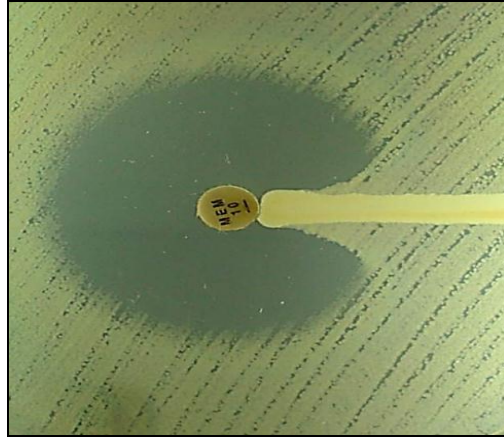
Figura N° 05

MÉTODO DE JARLIER



Fuente: Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, JH Tamariz. Comparison of four phenotypic methods to detect extended-spectrum betalactamases. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2010; 27(3): 345-51.

Figura N° 06
MÉTODO DE HODGE



Fuente: Lezameta L, Gonzáles-Escalante E, JH Tamariz. Comparison of four phenotypic methods to detect extended-spectrum betalactamases. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2010; 27(3): 345-51.

FIGURA Nº 07

PASOS PARA REALIZAR EL MÉTODO DE DISCO PRE DIFUSIÓN.

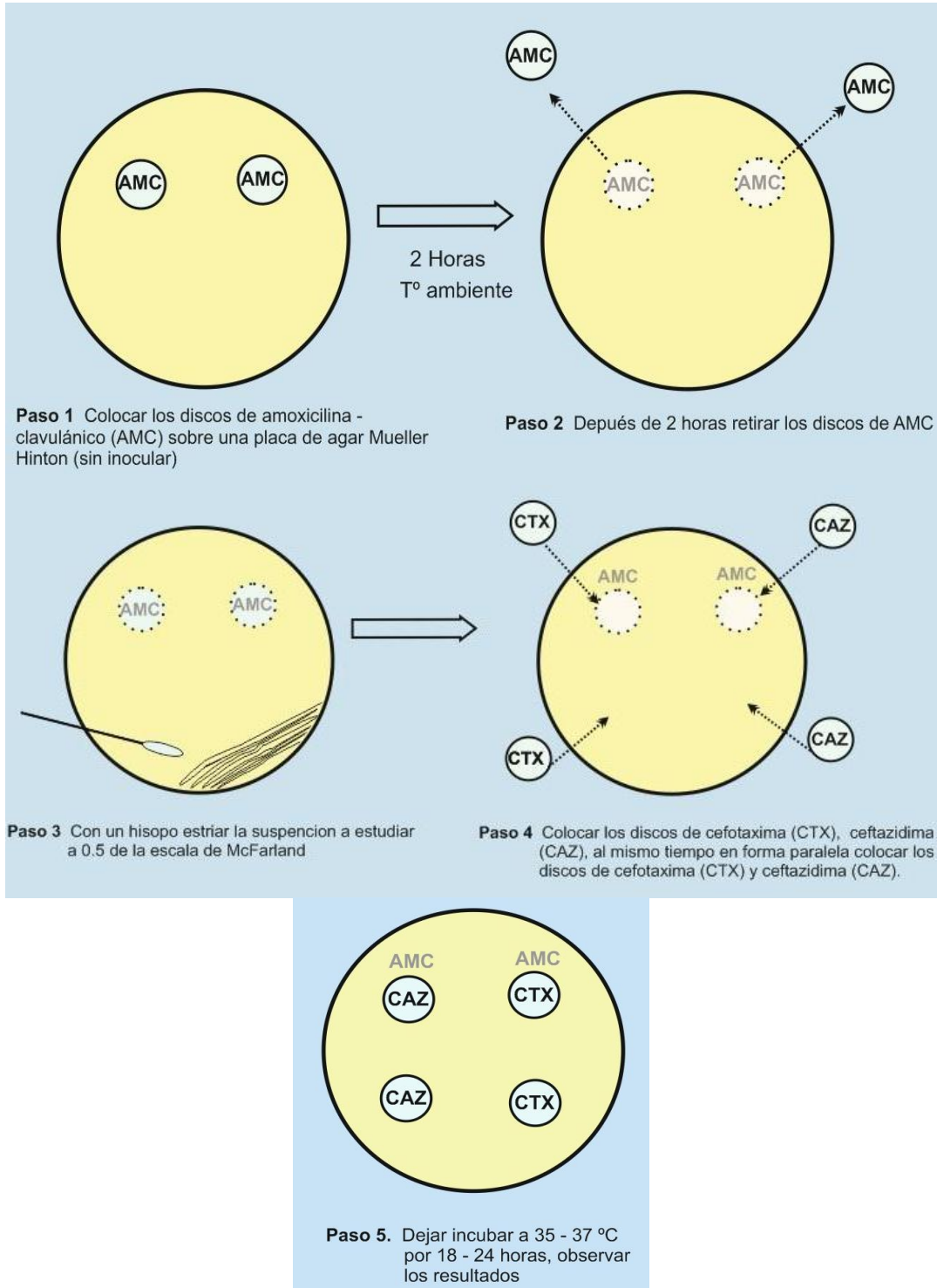
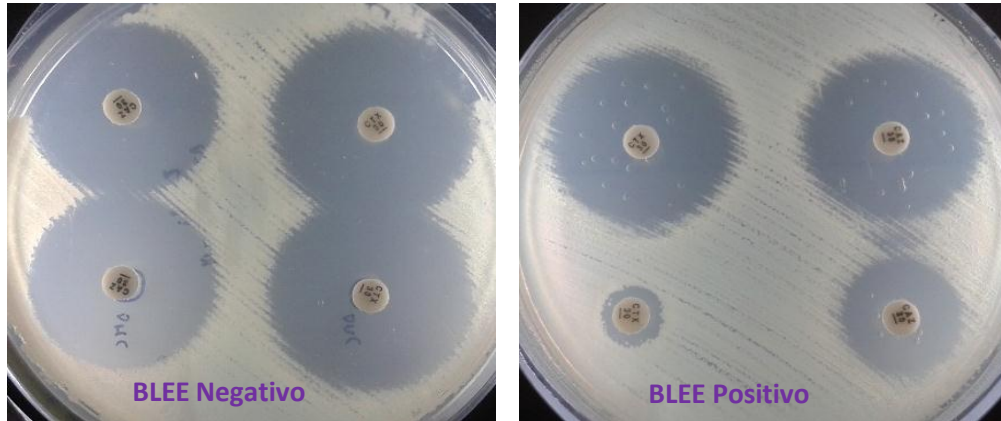


Figura N° 08

MÉTODO DE DISCO PRE DIFUSIÓN

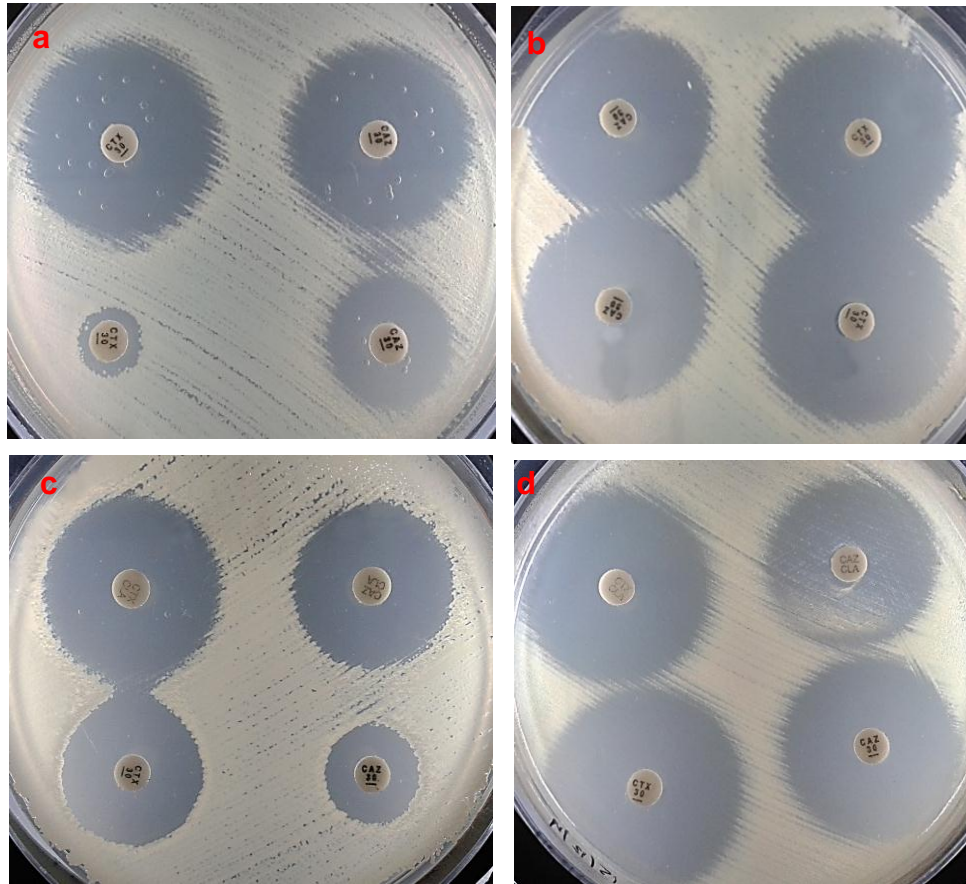


BLEE NEGATIVO: Diferencia de halos es $< 5\text{mm}$

BLEE POSITIVO: Diferencia de halos es $\geq 5\text{mm}$

Figura Nº 09

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA



Prueba de susceptibilidad antimicrobiana con el método de disco pre difusión y la prueba de confirmatoria de disco combinado. **a)** Método de disco pre difusión BLEE Positivo, **b)** Método de disco pre difusión BLEE Negativo, **c)** Prueba confirmatoria de disco combinado BLEE Positivo, **d)** Prueba confirmatoria de disco combinado BLEE Negativo (N=246)

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: COMPARACION DEL METODO DE DISCO PRE DIFUSION FRENTE AL METODO CONFIRMATORIO DE DISCO COMBINADO PARA LA DETECCION DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

<u>PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN</u>	<u>OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</u>	<u>HIPÓTESIS</u>	<u>OPERACIONALIZACIÓN</u>		<u>MÉTODOLÓGIA</u>
			<u>VARIABLES</u>	<u>ESCALA DE MEDICIÓN</u>	
<p>Problema General: ¿Existe diferencias significativas entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?</p>	<p>Objetivo General: Determinar las diferencias significativas entre el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.</p>	<p>Hipótesis General: No existe diferencia significativa entre el método de disco pre difusión frente al método confirmatorio de disco combinado para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido.</p>	<p>Principal: BLEE</p>	<p>Cualitativa Nominal, Dicotómica.</p>	<p>TIPO DE INVESTIGACIÓN Estudio comparativo de corte transversal, prospectivo y descriptivo</p> <p>NIVEL DE INVESTIGACIÓN Aplicativo porque se realizará sobre hechos concretos y específicos, de carácter netamente utilitarios, orientados a la resolución de problemas específicos.</p> <p>POBLACIÓN: Estará conformada por 691 aislamientos de Enterobacterias en muestras de urocultivo del laboratorio de Microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé” - Lima Perú.</p> <p>MUESTRA: Está conformada por 246 aislamientos de enterobacterias productoras y no productoras de BLEE.</p>
<p>Problemas Específicos: ¿Cuánto es la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo del método disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?</p>	<p>Objetivos Específicos: Determinar la sensibilidad y especificidad valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo del método disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.</p>		<p>Sensibilidad</p>	<p>Cuantitativa, Continua</p>	
<p>¿Cuánto es la concordancia entre el método disco pre difusión y el método de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?</p>	<p>Determinar la concordancia entre el método disco pre difusión y el método de disco combinado, para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.</p>		<p>Especificidad</p>	<p>Cuantitativa, Continua</p>	
<p>¿Cuál es la enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?</p>	<p>Determinar qué enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.</p>		<p>Valor Predictivo Positivo</p>	<p>Cuantitativa, Continua</p>	
<p>¿Cuál es la enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el género, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?</p>	<p>Determinar qué enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el género, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.</p>		<p>Valor Predictivo Negativo</p>	<p>Cuantitativa, Continua</p>	
<p>¿Cuál es la enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el grupo etario, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015?</p>	<p>Determinar qué enterobacteria productora de betalactamasa de espectro extendido es más frecuente según el grupo etario, identificado por el método de disco pre difusión y el método confirmatorio de disco combinado en muestras de urocultivo en el HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo de diciembre 2014 a noviembre 2015.</p>		<p>Concordancia</p>	<p>Cuantitativa, Continua</p>	
			<p>Enterobacteria</p>	<p>Discreta</p>	
			<p>Sexo</p>	<p>Cualitativa Nominal, Dicotómica.</p>	
			<p>Edad</p>	<p>Cuantitativa, Discreta</p>	
